

اثرات عصاره هیدرو الکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره بر شاخص‌های ایمنی موکوسی در ماهی گوره‌خری (*Danio rerio*)

- **فاطمه واحدی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - **رقیه صفری*:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - **علی شعبانی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - **سیدحسین حسینی‌فر:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - **حامد کلنگی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
 - **شبلم نژادمقدم:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: 49175-487
- تاریخ دریافت: اسفند 1395
تاریخ پذیرش: خرداد 1396

چکیده

با توجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، گرایش به سمت استفاده از گیاهان دارویی سوق پیدا کرده است. این مطالعه باهدف بررسی اثرات جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) بر شاخص‌های ایمنی موکوسی (آلکالین فسفاتاز، پروتئین کل و ایمونوگلوبین) ماهی گوره‌خری (*Danio rerio*) انجام شد. بدین منظور تعداد 360 قطعه ماهی با میانگین وزنی حدود $0/3 \pm 0/01$ گرم در 4 تیمار به صورت کاملاً تصادفی و هر تیمار با 3 تکرار شامل تیمار شاهد (جیره غذایی بدون عصاره)، تیمارهای با جیره غذایی حاوی عصاره (2/5، 5 و 10 گرم بر کیلوگرم) به صورت تصادفی در آکواریوم‌های پرورش تقسیم و به مدت 60 روز مورد تغذیه قرار گرفتند. ارزیابی ایمنی موکوس، میزان ایمونوگلوبولین در سطح 5 گرم بر کیلوگرم بیشترین افزایش را داشته ولی در الکالین فسفاتاز و پروتئین کل در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p < 0/05$). تغییرات شاخص الگوی پروتئینی، دامنه بین 11 تا 63 کیلو دالتون را نشان داد. به طوری که تیمار 5 گرم بر کیلوگرم نسبت به همه تیمارها بیشترین ضخامت را در باندها نشان داد. بر اساس نتایج این تحقیق استفاده از عصاره گیاهی آنغوزه در سطح 5 گرم بر کیلوگرم جهت بهبود شاخص‌های ایمنی موکوسی در ماهی گوره‌خری پیشنهاد می‌شود. کلمات کلیدی: آنغوزه، ماهی گوره‌خری، ایمنی موکوس، محرک ایمنی

مقدمه

با توجه به نقش آبی‌پروری در بهبود کیفیت تغذیه‌ای، امروزه در بسیاری از کشورها این صنعت رشد چشمگیری داشته است (Bohlouli و همکاران، 2012) با توجه به رشد این صنعت در سال‌های اخیر، بنا به افزایش تراکم آبیان برای دستیابی به تولیدات بیشتر، موجب افزایش شیوع بیماری و در نتیجه خسارت‌های مالی زیادی به این صنعت شده است. عواملی مانند افزایش تراکم، دستکاری و تغییرات ناگهانی دما، کاهش کیفیت آب و غذا منجر به تغییرات فیزیولوژی ماهی از جمله استرس یا تضعیف سیستم ایمنی می‌شود که حساسیت به عوامل بیماری‌زا را افزایش دهد. علاوه بر این افزایش تراکم ماهی و کاهش کیفیت آب سبب گسترش عوامل بیماری‌زا و مرگومیر ماهی می‌شود (Quesada و همکاران، 2013). یکی از روش‌های جلوگیری از ضررهای حاصل از بیماری، پیشگیری و کنترل آن می‌باشد و

در طی سالیان گذشته استفاده پیشگیرانه و درمانی از آنتی-بیوتیک‌ها مرسوم بود. استفاده از آنتی‌بیوتیک و پیشگیری‌کننده‌های شیمیایی، مشکلات عمده‌ای همچون ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌ها، تجمع و باقی ماندن این مواد در بدن ماهیان پرورشی، ایجاد خطرات بهداشتی برای مصرف‌کنندگان و نیز آلودگی محیط زیست را به دنبال دارد (Tangestani و همکاران، 2011). از سوی دیگر شواهدی مبنی بر اثرات منفی آنتی‌بیوتیک‌ها در مهار و یا کشتن باکتری‌های مفید دستگاه گوارش نیز وجود دارد که باید در استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها دقت بیشتری شود (Michael و همکاران، 2014)، لذا در بسیاری از کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به واسطه وضع قوانین، محدود و یا ممنوع شده است (Cabello، 2006) که به دنبال آن استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی از جمله محرک‌های گیاهی برای کنترل بیماری، افزایش پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهی‌ها در کشورهای مختلف توسعه یافته است (Guardiola

نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی پارامترهای مذکور در ماهی گورمخری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به‌منظور تعیین اثر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه بر ایمنی غیراختصاصی ماهی گورمخری در یک دوره 60 روزه در شهریورماه سال 1395 در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد 360 قطعه ماهی گورمخری با میانگین وزنی حدود $0/3 \pm 0/01$ گرم از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلا استان گلستان خریداری شد. در ابتدای آزمایش به مدت 2 هفته جهت سازگاری ماهیان با شرایط پرورش و پس از اتمام دوره سازگاری به‌صورت تصادفی در 4 تیمار و هر تیمار با 3 تکرار توزیع شدند. پرورش در آکواریوم با حجم آب 50 لیتر و تراکم 30 قطعه در هر آکواریوم صورت گرفت. گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) از شهرستان بیارجمند استان سمنان در بهار 1395، ایران جمع‌آوری شد و مورد تأیید اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه گلستان قرار گرفت. در این مطالعه به‌منظور تهیه عصاره، بخش‌های هوایی گیاهان جمع‌آوری و به‌صورت تازه قطعه‌قطعه شد و 100 گرم از آن با 1000 میلی‌لیتر الکل 96%، مخلوط و سپس درون قیف دکانتور منتقل شد تا کاملاً عصاره‌ی سبزرنگ آن خارج گردد. در خاتمه، محلول فوق، صاف و توسط دستگاه تغلیظ کننده (evaporator) غلیظ و بعد از استریل کردن، درون ظروف شیشه‌ای بارنگ تیره تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند (Citarasu و همکاران، 2006). به‌منظور آماده‌سازی تیمارهای آزمایشی با عصاره 2/5، 5 و 10 گرم بر کیلوگرم به جیره پایه اضافه شد. غذای ماهیان آزمایشی طی دوره آزمایش به میزان 5 درصد وزن بدن و 4 الی 5 مرحله در روز انجام گردید. به‌منظور ایجاد شرایط مطلوب در محیط پرورش لارو ماهیان پارامترهای محیطی از جمله: درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH اندازه‌گیری و ثبت گردید. در این آزمایش در طول دوره پرورش میانگین دمای آب 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رنج pH 7-8 و میانگین اکسیژن 7 میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری موکوس: جهت جمع‌آوری موکوس در انتهای دوره غذایی به مدت 24 ساعت قطع گردید. موکوس با استفاده از 5 میلی‌لیتر محلول نمک (مرک آلمان) 50 میلی‌مولار از 15 ماهی در طی زمان 3 دقیقه در پلاستیک جمع‌آوری و توسط دستگاه سانتریفیوژ (5810R Eppendorf, Engelsdorf, Germany) با دور 1500g به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتریفیوژ شدند، سپس مایع سطحی جمع‌آوری و به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایش‌ها بعدی در دمای 80- نگهداری شدند (Ross و همکاران، 2000).

سنجش شاخص‌های ایمنی موکوس: اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول و ایمونوگلوبولین با استفاده از روش بیورت (Guobing و همکاران، 2001) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی تعیین شد.

و همکاران، 2016). مطالعات متعددی در زمینه تعیین آثار مثبت گیاهان دارویی بر بهبود عملکرد سیستم ایمنی ماهی در صنعت آبی‌پروری صورت گرفته است. که می‌توان به بررسی اثرات گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر ماهی تیلاپیا (*Oreochromis Niloticus*) (Aly و Mohamed، 2010) و ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) (Guz و همکاران، 2011)، گیاه آلونهورا (*Aloe vera*) بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Alishahi و همکاران، 2010)، گیاه ریحان (*Ocimum sanctum*) (Rakesh Das و همکاران، 2013)، گیاه چتر گندمی (*Minor bupleurum decoction*) بر میگو وانامی (*Litopenaeus vannamei*) (Wu و همکاران، 2017) اشاره نمود.

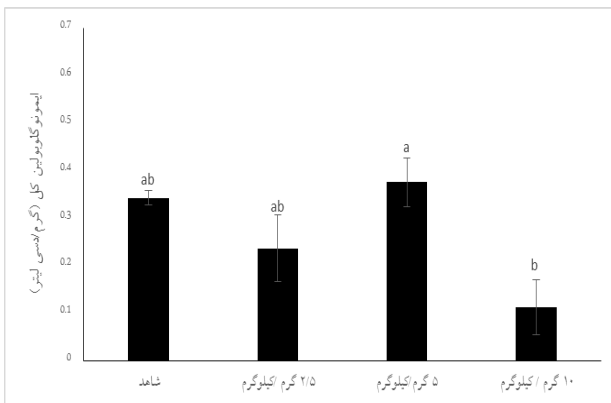
گیاه آنغوزه با نام علمی *Ferula assafoetida* یکی از گیاهان دارویی ارزشمند می‌باشد، که متعلق به تیره چتریان و دارای ساقه‌های قوی، خشن و فیبری می‌باشد (Mehrabi و Khosravi، 2007). ترکیبات اصلی این گیاه شامل رزین (46-40 درصد)، صمغ (25 درصد) و روغن‌های فرار (17-10) درصد می‌باشد (Takeoka، 2001). رزین آن حاوی فرولیک اسید و استرهای آن شامل سزکوئیترپن‌ها، کومارین‌ها و سایر ترپنوئیدها است. صمغ آن محتوی گلوکز، گالاکتوز، رامنوز، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها و روغن‌های فرار آن حاوی ترکیبات سولفور و ترپنوئیدها می‌باشد (Bandyopadhyay و همکاران، 2006). گیاه آنغوزه دارای خواص دارویی از جمله: آنتی‌اکسیدان، ضدنفخ، ضدانگل، ضدانقباض، ضدتشنج، کاهش فشارخون و داروی مسکن می‌باشد (Akaberi و Iranshahy، 2014). در مطالعات انجام شده Safari و همکاران (2016) افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی، رشد و آنتی‌اکسیدانی در جیره حاوی پودر گیاه آنغوزه در ماهی کپور و بهبود عملکرد سیستم ایمنی را گزارش نمودند. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت زدایی کبد در موش‌های دریافت‌کننده آنغوزه توسط Mallikarjuna و همکاران (2003) نیز گزارش شد. با این حال استفاده از آن در صنعت آبی‌پروری چندان مورد توجه نبوده است.

ماهی زبرا گورمخری (*Danio rerio*) یک ماهی با اندازه کوچک (معمولاً کمتر از 40 میلی‌متر) از گونه‌های آب شیرین مناطق گرمسیری بومی پاکستان و هند و ساکن آب‌های کم‌عمق می‌باشد (Lessman، 2011). این ماهی یکی از ماهیان مورد پسند پرورش‌دهندگان ماهیان زینتی، گونه‌ای صلح‌جو، مقاوم از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشد. بدن دوکی‌شکل و از پهلوها فشرده، دهان انتهایی (مورب و روبه بالا) و دارای چشم مرکزی می‌باشد. ماهی زبرا دارای ویژگی‌هایی می‌باشد که موجب شده تا به راحتی برای کارهای آزمایشی مورد استفاده قرار گیرد. ماهیانی کوچک با مقاومت بسیار بالا که می‌توان تعداد زیادی از آن را به راحتی و با هزینه بسیار پایین در محیط آزمایشگاه نگهداری نمود و در تمام طول سال می‌توان آن‌ها را تکثیر نمود و در بسیاری از آزمایشات (ژنتیک مولکولی و تحقیقات زیست‌پزشکی) از آن به‌عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده کنند (Shin و Fishman، 2002). از آنجا که تاکنون مطالعه‌ی جامعی در رابطه با اثر تغذیه‌ای عصاره گیاه آنغوزه بر شاخص‌های ایمنی موکوسی مربوط به ایمنی ماهی گورمخری صورت

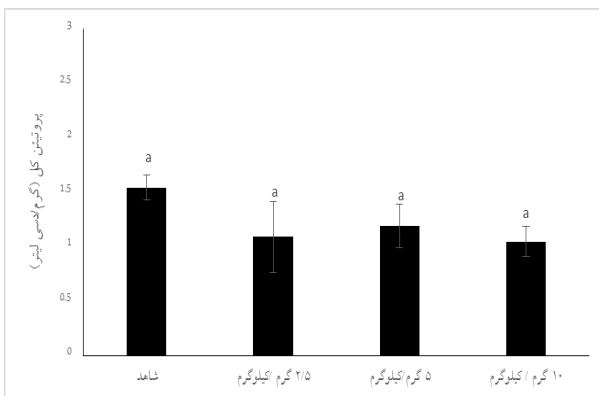


ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌ی حاوی عصاره‌ی هیدرو الکلی گیاه آنغوزه تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد از خود نشان ندادند ($p>0/05$).

آنالیز الگوی پروتئینی: نتایج حاصل از آزمایشات صورت گرفته جهت مقایسه الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی گوره- خری تغذیه شده با عصاره‌ی هیدرو الکلی گیاه آنغوزه به صورت اشکال زیر نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت قابل توجهی در تراکم باندها بین الگوی پروتئینی تیمارها مشهود می- باشد و پروتئین‌های مشاهده شده بین 11 تا 63 کیلو دالتون می- باشد. همچنین باندهایی با وزن مولکولی پایین تر از 11 کیلو دالتون در الگوی پروتئینی ماهی در هر چهار تیمار مشاهده شد که تفاوت محسوسی در تراکم آن‌ها در تیمار تغذیه شده با عصاره 5 g/kg مشاهده شد. به طوری که باندهای مشخص شده در تیمار تغذیه‌شده با عصاره 5 g/kg نسبت به سایر تیمارها بیشترین ضخامت را نشان داد. اما در تیمار تغذیه‌شده با عصاره‌ی 2/5 g/kg نسبت به شاهد تغییرات محسوسی مشاهده نشد. بر اساس مطالعات Najafian و Babji (2012) پپتیدهای آنتی‌باکتریال معمولا دارای کمتر از 50 آمینو اسید و وزن کمتر از 10 کیلودالتون هستند و احتمال می‌رود افزایش محسوس تراکم باندهای دارای وزن مولکولی کمتر از 10 کیلو دالتون سبب بهبود سیستم ایمنی غیراکتسابی نیز شود (شکل 4).



شکل 1: میزان فعالیت ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره‌ی هیدرو الکلی گیاه آنغوزه به مدت 60 روز



جهت تعیین سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلبیایی از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت‌های تولیدشده توسط شرکت پارس آزمون استفاده گردید. طبق دستورالعمل از نمونه موکوس به مقدار 20 میکرو لیتر و از معرف‌های مخلوط شده شماره 1 و 2 به مقدار 1000 میکرو لیتر با هم مخلوط شد، مقدار جذب نوری را بعد از یک دقیقه قرائت کرده و پس از 1، 2 و 3 دقیقه، اختلاف جذب نوری از دقیقه قبل تعیین شد، باهم جمع شد و بر عدد 3 تقسیم و میانگین به‌دست‌آمده در فاکتور 2757 ضرب گردید.

الگوی پروتئینی: ارزیابی الگوی پروتئینی SDS PAGE بر اساس روش Laemmli (1970) انجام شد با کمی اصلاحات آنالیز شد. نمونه‌های موکوس (10 میلی‌گرم پروتئین خام) به نسبت 1 : 4 با بافر نمونه (4% اس‌دی‌اس، 50 میلی‌لیتر بر مول تریس اسیدکلریدریک، 2% مرکاپتواتانول، 12% گلیسرول و 5% بروموفنول بلو) حل کرده و به مدت 5 دقیقه در حرارت 95 درجه سانتی‌گراد حرارت داده و مدت 3 دقیقه با دور 1000 سانتریفیوژ کرده سپس از محلول صاف‌شده رویی جهت الکتروفورز استفاده گردید. 25 میکرو لیتر از هر نمونه به همراه یک مارکر وزن مولکولی بر روی ژل پلی اکریل‌امید 18% و ژل انباری 5% (استکینگ ژل) لود شد. الکتروفورز در 120 ولت تا زمانی که مارکر بروموفنول بلو از استکینگ ژل عبور کند تنظیم شد، سپس در 200 ولت به مدت 7 ساعت با بافر الکتروفورز 5 ایکس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص کردن باندهای پروتئینی، ژل‌ها به وسیله‌ی 5% کوماسی- بلو (G 250) به مدت 2 ساعت رنگ‌آمیزی گردید و سپس طی 2 مرحله به وسیله محلول رنگبری کوماسی-بلو به مدت 4 ساعت رنگبری انجام گرفت. عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه اسکنر انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی موکوس، ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف بررسی شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها برای مقایسه بین تیمارهای آزمایشی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح احتمال 5 درصد ($p<0/05$) از نرم‌افزار SPSS-13 استفاده گردید.

نتایج

اثرات استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه (0، 2/5، 5 و 10 گرم در کیلوگرم غذا) بر میزان فعالیت ایمونوگلوبولین موکوس ماهی گوره‌خری در شکل شماره 1 ارائه شده است. با توجه به نتایج مذکور اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت ایمونوگلوبولین موکوس بین گروه شاهد و تیمار تغذیه‌شده با عصاره 2/5 گرم در کیلوگرم غذا مشاهده نشد ($p>0/05$). همچنین بالاترین میزان ایمونوگلوبولین در ماهیانی مشاهده شد که با عصاره 5 گرم بر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند ($p<0/05$). نتایج حاصل از بررسی اثرات عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه بر میزان پروتئین موکوس پوست ماهی گوره‌خری (شکل 2) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی تغذیه‌شده با عصاره گیاهی آنغوزه مشاهده نشد ($p>0/05$). همچنین در بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس (شکل 3)،

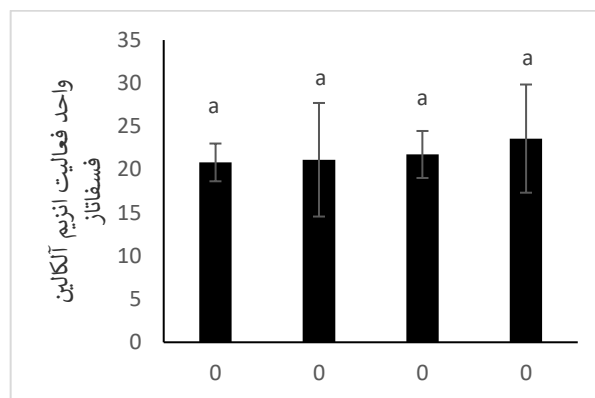


بهبوددهنده عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد (Sadraei و همکاران، 2003). بنابراین این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک محرک ایمنی طبیعی و ارزان‌قیمت در آبی‌پروری مورد توجه قرار گیرد.

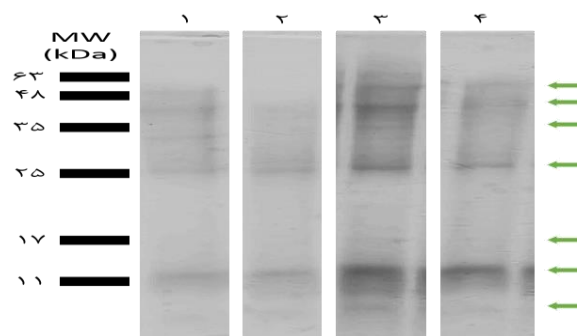
موکوس پوست ماهیان به‌عنوان نخستین سد دفاعی ماهی، به دلیل ترشح و جایگزینی مداوم مانع از تثبیت انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا بر سطوح خارجی بدن ماهی می‌گردد (Esteban، 2012). موکوس اپیدرم حاوی چندین ترکیب ترش‌کننده از جمله گلایکوپروتئین‌ها، آگلوتین‌ها، لکتین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوانوئیدها، ایمونوگلوبولین‌ها، لیزین، لیزوزوم، پروتئین فاز حاد و آنتی‌بادی‌های طبیعی می‌باشد که نقش دفاعی مهمی را علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. (McIntosh و Austin، 1988). کیفیت و کمیت ترکیبات موکوس گونه‌های مختلف ماهی متفاوت بوده و متأثر از فاکتورهای ژنتیکی مربوط به گونه ماهی، سن، تغذیه، فاکتورهای محیطی و وجود یا عدم وجود فاکتورهای استرس‌زا در قبل یا در زمان نمونه‌برداری موکوس است (سلطانی، 1377) افزایش شاخص‌های ایمنی موکوس در بسیاری از گونه‌ها در اثر تغذیه با جیره غذایی حاوی مکمل‌های گیاهی نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای، تأثیر جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر نعناع (*Mentha piperita*) بر الگوی پروتئینی و برخی پارامترهای ایمنی ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جیره حاوی پودر نعناع اثرات مثبتی بر شاخص‌های رشد، الگوی پروتئینی و پارامترهای ایمنی موکوس پوست ماهی کلمه داشته است (رستگاری، 1395). (Hoseinifar و همکاران، 2015)، در بررسی اثر عصاره میوه خرما بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی گزارش نمودند که اضافه کردن این مکمل گیاهی به جیره غذایی بچه ماهیان، موجب بالا بردن فاکتورهای ایمنی موکوس از جمله آنزیم‌های آلكالین فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم می‌شود. در مطالعه Olimanian و همکاران (2016) اثر پودر سیر با سطوح مختلف 5، 10 و 15 گرم در کیلوگرم به مدت 8 هفته در جیره غذایی ماهی کلمه مورد بررسی قرار گرفت. بعد از پایان دوره آزمایش، نتایج حاصل نشان داد که پودر سیر موجب افزایش میزان آلكالین فسفاتاز و سطوح پروتئین محلول موکوس پوست شده است.

ایمونوگلوبین‌ها در غیاب محرک آنتی‌ژنی خارجی به‌صورت کاملاً تنظیم‌شده تولید می‌شوند و جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی می‌باشد. ایمونوگلوبین‌ها به جهت محافظت سریع در برابر عوامل بیماری‌زا، به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی به شمار می‌رود. تغییر در سطوح ایمونوگلوبین سرم خون در مطالعات بسیاری به‌تبع استفاده از محرک‌های ایمنی گزارش شده است (Nayak و همکاران، 2007). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره هیدرو الکلی آنغوزه به جیره غذایی ماهی گورمخری منجر به افزایش معنی‌دار سطح ایمونوگلوبین تیمار با میزان 5 گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد گردید ($p < 0/05$) که نشان‌دهنده اثرات مثبت گیاه آنغوزه بر ایمنی موکوس پوست ماهی گورمخری است. در مطالعه Verma و همکاران (2012) اثر تغذیه‌ای مکمل‌های گیاهی گیاه لور (*Ficus benghalensis*) و گیاه علف *Cynodon dactylon*) بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی *Channa*

شکل 2: میزان فعالیت پروتئین کل موکوس پوست ماهی گورمخری تغذیه شده با عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه به مدت 60 روز



شکل 3: میزان فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز موکوس پوست ماهی گورمخری تغذیه شده با عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه به مدت 60 روز



شکل 4: الگوی پروتئینی موکوس ماهی گورمخری تغذیه شده با عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه به مدت 60 روز

بحث

آبزیان به دلیل وجود طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در محیط آبی، ارتباط نزدیکی با محیط اطراف خود دارند (Vallejos-Vidal و همکاران، 2016). از جهتی افزایش تولید و تراکم ماهی در واحد سطح موجب تشدید عوامل استرس‌زای زیادی می‌گردد که بر سلامت ماهی تأثیر منفی می‌گذارند. این شرایط موجب ضعف فیزیولوژیک و افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا و در نتیجه بروز بیماری می‌شود. تنظیم و افزایش کارایی سیستم ایمنی در ماهیان از طریق دست‌کاری جیره‌های غذایی ابزاری قدرتمند و مؤثر جهت حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات می‌باشد (Alishahi و همکاران، 2010). در کشورهای مختلف استفاده از محرک‌های گیاهی به دلیل آثار جانبی کمتر بر موجود زنده و محیط‌زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایدار و در دسترس بودن، جهت پیش‌گیری و کنترل بیماری ماهی توسعه یافته است (Guardiola و همکاران، 2016). یکی از ترکیبات اصلی گیاه آنغوزه که 12/2 درصد آن را تشکیل می‌دهد، آلفاپینن است. این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و

موکوس ماهی گورمخری تأثیرگذار می‌باشد. بنابراین استفاده از این مکمل خوراکی به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی آبیان توصیه می‌شود. هر چند که، انجام مطالعات بیشتر به‌منظور تعیین مدت‌زمان، دوز و نحوه مصرف محرک‌های ایمنی و همچنین گونه ماهی موردنظر باید مدنظر قرار گرفته شود.

منابع

1. رستگاری، س.، 1385. تأثیر سطوح مختلف پودر نعنای بر پارامترهای رشد و الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کلمه (*Rutilus caspicus*). (پایان‌نامه کارشناسی ارشد)، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان - دانشکده مرتع و آبخیزداری و شیلات و محیط زیست.
2. سلطانی، م.، 1377. ویژگی‌های ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره 2، صفحات 34 تا 30.
3. Akaberi, M. and Iranshahy, M., 2014. Review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of giant fennel (*Ferula communis* L. subsp. *communis*). Iran. J. Basic Med. Sci. Vol. 18, No. 11, pp: 1052-1062.
4. Aly, S.M. and Mohamed, M.F., 2010. Echinacea purpurea and Alliumsativum as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., Vol. 94, pp: 31-39.
5. Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Jalali, M.R., 2010. Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research. Vol. 4, No. 3, pp: 85-91.
6. Austin, B. and McIntosh, D., 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases. Vol. 11, pp: 275-277.
7. Bandyopadhyay, D.; Basak, B.; Chatterjee, A.; Lai, T. K.; Banerji, A. and Banerji, J., 2006. Saradaferin, a new sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assa foetida*. Natural Product Research. Vol. 20, No. 10, pp: 961-965.
8. Bohlouli, O.S.; Tahmasebi, K.A.; Parseh, A.; Salati, A.P. and Sadeghi, E., 2012. Effects of dietary administration of Echinacea purpurea on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Physiol Biochem. Vol. 38, NO. 4, pp: 1029-34.
9. Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology. Vol. 8, pp: 1137-1144.
10. Citarasu, T.; Sivaram, V.; Immanuel, G.; Rout, N. and Murugan, V., 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (wssv) infection in black tiger shrimp, (*Penaeus monodon*) with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and shellfish immunology. Vol. 21, pp: 372-384.
11. Esteban, M.A., 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. Fish Immunol. Vol. 1, pp: 1-29.
12. Ghehdarijani, M.S.; Hajimoradloo, A.; Ghorbani, R. and Roohi, Z., 2016. The effects of garlic supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry, Fish. Shellfish Immunol. Vol. 49, pp: 79-83.
13. Guardiola, F.A.; Porcino, C.; Cerezuela, R.; Cuesta, A.; Faggio, C. and Esteban, M.A., 2016. Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish and Shellfish Immunol. Vol. 52, pp: 298-308.

punctatus را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی 5 g/kg این گیاهان سطوح ایمونوگلوبین بالاتری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند. افزایش سطح پروتئین‌های موکوس و سرم به‌عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی غیراختصاصی ماهیان مطرح می‌باشد. سلول‌های کیسه‌ای شکل در اپیدرم ماهیان، با ترشح پروتئین‌هایی ماهیان را در برابر عفونت‌های ناشی از انگل‌های خارجی حفظ می‌کنند بعضی از این پروتئین‌ها به همراه فاکتورهای دیگر موکوس به هنگام هجوم پاتوژن‌ها نقش آلوئینه کردن آن‌ها را بر عهده دارند (Suzuki و همکاران، 2003). بر اساس نتایج کسب شده در بررسی حاضر میزان پروتئین کل بین گروه شاهد و تیمار تغذیه‌شده با عصاره گیاهی آنگوزه مشاهده نشد ($p>0/05$). آنزیم فسفاتاز قلیایی به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی محسوب می‌شود که با افزایش فعالیت هیدرولیتیکی منجر به افزایش اثرات ضدباکتریایی و مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف می‌گردد (Ige و Abraham، 1990) تاکنون گزارشی در خصوص اثرات احتمالی گیاه آنگوزه گزارش نشده است. در بررسی‌های حاصل از این مطالعه، اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم فسفاتاز موکوس بین گروه شاهد و تیمار تغذیه‌شده با سطوح مختلف عصاره گیاهی آنگوزه مشاهده نشد ($p>0/05$). در مقابل در تحقیقات صورت گرفته در خصوص اثر گیاه زنجبیل در ماهی روهو (Sukumaran و همکاران، 2016) و سیر در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (Ghehdarijani و همکاران، 2016) نشان‌دهنده افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس پوست در این ماهیان می‌باشد.

اس‌دی‌اس پیچ به‌طور گسترده در مطالعات زیادی برای شناسایی تفاوت الگوی پروتئینی بسیاری از گونه‌ها استفاده شده است (Lortal و همکاران، 1997؛ Kamikouchi و همکاران، 2004؛ Khatta و Sherif، 2011 و 2014) در بررسی الگوی پروتئینی، سطح پروتئین را در محدوده‌ی پایین‌تر از 65 کیلو دالتون نشان داد که نشان‌دهنده تراکم بالای پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از 65 کیلو دالتون در موکوس ماهی گورمخری است. اختلاف در الگوی پروتئینی یک موجود زنده به دلیل شرایط داخلی و خارجی، انواع بافت‌ها و مراحل مختلف تکامل می‌باشد (Shepherd و همکاران، 1994). احتمالاً باند‌های 29/7-25/9 و 25-28 کیلو دالتون، به ترتیب نشان‌دهنده‌ی پروتئین‌های پروتازوم سوویت آلفا و پروتئین‌ها می‌باشند (Guardiola و همکاران، 2015). بالاترین شدت تراکم در تیمار تغذیه شده با گیاه آنگوزه در سطح 5 g/kg مشاهده شد. البته در تیمار شماره 4 که با عصاره‌ی 10g/kg تغذیه‌شده بیانگر این موضوع می‌باشد ولی باند تشکیل نسبت به تیمار سوم کمتر است. رستگاری (1395) تغییر در الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کلمه تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی نعنای با استفاده از اس‌دی‌اس پیچ گزارش نمود. نتایج، تفاوت‌های واضحی بین الگوی پروتئینی نمونه‌های تیمار و شاهد را نشان داد، که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر تأثیر عصاره گیاهی آنگوزه بر الگوی پروتئینی معکوس پوست ماهی گورمخری همسو است.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره هیرو الکی گیاه آنگوزه در ماهی گورمخری به‌ویژه در سطح 5 g/kg جیره، بر برخی از شاخص‌های ایمنی



- veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones. Journal of Food Science. Vol. 78, pp: 321-1333.
31. **Rakesh Das, R.; Raman, R.P.; Saha, H. and Singh, R., 2013.** Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*. Quaculture Research. pp: 1-11.
 32. **Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Jojnson, S.C., 2000.** Changes in hydrolytic enzyme activities of Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin mucus due to infection with the Salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and cortisol implantation. Disease of Aquatic Organisms. Vol. 41, pp: 43-51.
 33. **Sadraei, H.; Ghannadi, A. and Malekshahi, K., 2003.** Composition of the essential oil of *Ferula assa foetida* and its spasmolytic action. Saudi Pharmaceutical Journal. Vol. 11, pp: 136-140.
 34. **Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Nejadmoghadam, S. and Jafar, A., 2016.** Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary *Ferula* (*Ferula assafoetida*). Fish & shellfish immunology. Vol. 55, pp: 242-248.
 35. **Shepherd, K.L., 1994.** Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Vol. 4, pp: 401-429.
 36. **Shin, J.T. and Fishman, M.C., 2002.** From zebrafish to human: modular medical models. Annual Review of Genomics and Human Genetics. Vol. 3, pp: 311-40.
 37. **Soleimani, S.M.; Sajjadi, M.M.; Falahatkar, B. and Yazdani, M.A., 2016.** Fish meal replacement powder Earthworm (*Eisina foetidae*) in diet for Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) and its effect on growth performance, feed efficiency and carcass composition. Journal of Aquatic Ecology. Vol. 5, pp: 21-30.
 38. **Sukumaran, V.; Park, S.C. and Giri, S.S., 2016.** Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 57, pp: 362-370.
 39. **Suzuki, Y.; Tasumi, S.; Tsutsui, S.; Okamoto, M. and Suetake, H., 2003.** Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comparative Biochemistry and Physiology. Vol. 136, pp: 723-730.
 40. **Takeoka, G., 2001.** Volatile constituents of asafoetida. Aroma active compounds in foods, Journal of the American Chemical Society. Vol. 794, pp: 33-44.
 41. **Tangestani, R.; Alizade dughikolaei, E.; Ebrahimi, E. and Zare, P., 2011.** Effect of garlic (*Allium sativum*) essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, Vol. 66, pp: 209-214.
 42. **Vallejos-Vidal, E.; Reyes-Lopez, F.; Teles, M. and MacKenzie, S., 2016.** The response of fish to immunostimulant diets. Fish. Shellfish Immunol. Vol. 56, pp: 34-69.
 43. **Verma, V.K.; Rani, K.V.; Sehgal, N. and Prakash, O., 2012.** Immunostimulatory response induced by supplementation of *Ficus benghalensis* root powder, in the artificial feed the Indian freshwater murrel, *Channa punctatus*. Fish Shellfish Immunol. Vol. 33, pp: 590-596.
 44. **Wu, Y.S.; Lee, M.C.; Huang, C.T.; Kung, T.C.; Huang, C.Y. and Nan, F.H., 2017.** Effects of traditional medical herbs "minor bupleurum decoction" on the non-specific immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish & Shellfish Immunology. Vol. 64, pp: 218-225.
 14. **Guardiola, F.A.; Dioguardi, M.; Parisi, M.G.; Trapani, M. R.; Meseguer, J.; Cuesta, A. and Esteban, M.A., 2015.** Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish and shellfish immunology. Vol. 45, pp: 112-123.
 15. **Guobing, Xu.; Lili, J.; Ihua, Z. and Tician, X., 2001.** Application of an improved biuret method to the determination of total protein in urine and cerebrospinal fluid without concentration step by use of Hitachi 7170 auto-analyzer. Journal of clinical laboratory analysis. Vol. 15, No. 4, pp: 161-164.
 16. **Guz, L.; Sopinska, A. and Oniszczuk T., 2011.** Effect of *Echinacea purpurea* on growth and survival of guppy (*Poecilia reticulata*) challenged with *Aeromonas bestiarum*. Aquacult Nut. Vol. 17, pp: 695-700.
 17. **Hoseinifar, S.H.; Khalili, M.; Rufchaei, R.; Raeisi, M.; Attar, M. and Cordero, H., 2015.** Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Fish and Shellfish Immunol. Vol. 47, pp: 706-711.
 18. **Iger, Y. and Abraham, M., 1990.** The process of skin healing in experimentally wounded carp. Journal of Fish Biology. Vol. 36, pp: 421-437.
 19. **Kamikouchi, A.; Morioka, M. and Kubo, T., 2004.** Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. Zoological science. Vol. 21, pp: 53-62.
 20. **Khattab, S.; El Sherif, F.; El-Garhy, H.A.; Ahmed, S. and Ibrahim, A., 2014.** Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. Journal of Gene. Vol. 533, pp: 313-321.
 21. **Khattab, S. and El Sherif, F., 2011.** Effect of growth regulators on *Carpobrotus edulis* rapid micropropagation and molecular analysis. Journal of American Science. Vol. 7, pp: 511-520.
 22. **Khosravi, H. and Mehrabi, A., 2006.** Economic study of *Ferula* harvesting in Tabass region. Journal of Basic Medical Sciences. Vol. 58, No. 4, pp: 933-44.
 23. **Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Journa. Vol. 227, pp: 680-685.
 24. **Lessman, C.H.A., 2011.** The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews. Vol. 93, No. 3, pp: 268-280.
 25. **Lortal, S.; Valence, F.; Bizet, C. and Maubois, J.L., 1997.** Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species, Research in microbiology. Vol. 148, pp: 461-474.
 26. **Mallikarjuna, G.; Dhanalakshmi, S.; Raisuddin, S. and Rao, A.R., 2003.** Chemomodulatory influence of eruga asafoetida on mammary epithelial differentiation, hepatic drug metabolizing enzymes, antioxidant profiles and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in rats. Breast cancer research and treatment, Vol. 81, No. 1, pp: 1-10.
 27. **Michael, E.T.; Amos, S.O. and Hussaini, L.T., 2014.** A review on probiotics application in aquaculture. Fisheries and Aquaculture Journal. Vol. 50, No. 4, pp: 1-3.
 28. **Najafian, L. and Babji, A.S., 2012.** A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. Peptides. Vol. 33, pp: 178-185.
 29. **Nayak, S.; Swain, P. and Mukherjee, S., 2007.** Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major Carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 23, pp: 892-896.
 30. **Quesada, S.P.; Paschoal, J.A.R. and Reyes, F.G.R., 2013.** Considerations on the aquaculture development and on the use of



