

اثرات عصاره هیدروالکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره بر شاخص‌های ایمنی موكوسى در ماهى گورخرى (*Danio rerio*)

- **فاطمه واحدی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
 - **رقیه صفری*:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
 - **علی شعبانی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
 - **سیدحسین حسینی‌فر:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
 - **حامد کلنگی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
 - **شبنم نژادمقدم:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۸۷-۴۹۱۷۵
- تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶

چکیده

باتوجه به افزایش روزافزون مقاومت باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی داروهای شیمیایی، گرایش به استفاده از گیاهان دارویی افزایش یافته است. این مطالعه باهدف بررسی اثرات جیره‌غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) بر شاخص‌های ایمنی موكوسى (آلكالين فسفاتاز، پروتئين كل و ایمونوگلوبین) ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام شد. بدین‌منظور تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی حدود 0.1 ± 0.03 گرم در ۱۲ آکراریوم (۴ تیمار) تقسیم و با جیره غذایی حاوی ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره به‌مدت ۶۰ روز مورد تغذیه قرار گرفتند. در ارزیابی ایمنی موكوسى میزان ایمونوگلوبولین در سطح ۱٪ بیش‌ترین افزایش را داشته ولی در الكالين فسفاتاز و پروتئين كل در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). تغییرات شاخص الگوی پروتئینی، دامنه بین ۱۱ تا ۶۳ کیلودالتون را نشان داد. تیمار ۱٪ نسبت به سایر تیمارها بیش‌ترین ضخامت باند را نشان داد. براساس نتایج این تحقیق استفاده از عصاره گیاهی آنغوزه در سطح ۱٪ جهت بهبود شاخص‌های ایمنی موكوسى در ماهی گورخری پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: آنغوزه، ماهی گورخری، ایمنی موكوس، محرک ایمنی



مقدمه

خشن و فیبری می‌باشد (Mehrabi و Khosravi، ۲۰۰۷). ترکیبات اصلی این گیاه شامل رزین (۴۶-۴۰٪)، صمغ (۲۵٪) و روغن‌های فرار (۱۷-۱۰٪) می‌باشد (Takeoka، ۲۰۰۱). رزین آن حاوی فرولیک اسید و استرها‌های آن شامل سزکوئیت‌ترین‌ها، 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، ۲۰۰۶). گیاه آنغوزه دارای خواص دارویی، آنتی‌اکسیدان، ضدنفخ، ضدانگل، ضدانقباض، ضدتشنج، کاهش فشارخون و داروی مسکن می‌باشد (Iranshahy و Akaberi، ۲۰۱۴). Safari و همکاران (۲۰۱۶) 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 (۲۰۰۳) نیز گزارش شد. با این حال استفاده از آن در صنعت آبی پروری چندان مورد توجه نبوده است.

ماهی زبرا گورخری (*Danio rerio*) یک ماهی با اندازه کوچک (معمولاً کم‌تر از ۴۰ میلی‌متر) از گونه‌های آب‌شیرین مناطق گرمسیری بومی پاکستان و هند و ساکن آب‌های کم‌عمق می‌باشد (Lessman، ۲۰۱۱). این ماهی یکی از ماهیان مورد پسند پرورش‌دهندگان ماهیان زینتی، گونه‌ای صلح‌جو، مقاوم از خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) می‌باشد. نگهداری راحت، تکثیر آسان در تمام طول سال این گونه را به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی در مطالعات ژنتیک مولکولی و تحقیقات زیست‌پزشکی تبدیل نموده است (Shin و Fishman، ۲۰۰۲). از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثر تغذیه‌ای عصاره گیاه آنغوزه بر شاخص‌های ایمنی موکوسی مربوط به ایمنی ماهی گورخری صورت نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی پارامترهای مذکور در ماهی گوره‌خری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به‌منظور تعیین اثر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه بر ایمنی غیراختصاصی ماهی گورخری در یک دوره ۶۰ روزه در مرکز تحقیقات آبی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی گورخری با میانگین وزنی حدود 0.1 ± 0.03 گرم از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلا استان گلستان خریداری شد. در ابتدای آزمایش به‌مدت ۲ هفته جهت سازگاری ماهیان با شرایط پرورش و پس از اتمام

با توجه به نقش آبی‌پروری در بهبود کیفیت تغذیه‌ای، امروزه در بسیاری از کشورها این صنعت رشد چشمگیری داشته است (Bohlouli و همکاران، ۲۰۱۲). این رشد به جهت 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 می‌دهد (Quesada و همکاران، ۲۰۱۳). یکی از روش‌های جلوگیری از ضررهای حاصل از بیماری، پیشگیری و کنترل آن می‌باشد و در طی سالیان گذشته استفاده پیشگیرانه و درمانی از آنتی‌بیوتیک‌ها مرسوم بود. استفاده از آنتی‌بیوتیک و پیشگیری کننده‌های شیمیایی، مشکلات عمده‌ای هم‌چون ایجاد مقاومت دارویی، تجمع و باقی‌ماندن این مواد در بدن ماهیان پرورشی، ایجاد خطرات بهداشتی برای مصرف‌کنندگان و نیز آلودگی محیط زیست را به‌دنبال دارد (Tangestani و همکاران، ۲۰۱۱). 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 آنتی‌بیوتیک‌ها دقت بیش‌تری شود (Michael و همکاران، ۲۰۱۴). لذا در بسیاری از کشورها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به واسطه وضع قوانین، محدود و یا ممنوع شده (Cabello، ۲۰۰۶) و 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 و همکاران، ۲۰۱۶). 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 purpura*) بر ماهی تیلایپیا (*Oreochromis niloticus*) (Aly و Mohamed، ۲۰۱۰) و ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*) (Guz و همکاران، ۲۰۱۱)، گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰)، گیاه ریحان (*Ocimum sanctum*) بر کپور هندی (*Labeo rohita*) (Rakesh Das و همکاران، ۲۰۱۳)، گیاه چتر گندمی (Minor) (*Litopenaeus vannamei*) بر میگو وانامی (Wu و همکاران، ۲۰۱۷) اشاره نمود.

گیاه آنغوزه با نام علمی *Ferula assafoetida* یکی از گیاهان دارویی ارزشمند متعلق به تیره چتریان و دارای ساقه‌های قوی،

الگوی پروتئینی: ارزیابی الگوی پروتئینی SDS PAGE براساس روش Laemmli (۱۹۷۰) انجام شد. نمونه‌های موکوس (۱۰ میلی گرم پروتئین خام) به نسبت ۱:۴ با بافر نمونه (۴٪ اس دی اس، ۵۰ میلی لیتر بر مول تریس اسید کلریدریک، ۲٪ مرکاپتواتانول، ۱۲٪ گلیسرول و ۵٪ بروموفنول بلو) حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و مدت ۳ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ کرده، سپس از محلول صاف شده رویی جهت الکتروفورز استفاده گردید. ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به همراه یک مارکر وزن مولکولی بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید ۱۸٪ و ژل انباری ۵٪ (استکینگ ژل) لود شد. الکتروفورز در ۱۲۰ ولت تا زمانی که مارکر بروموفنول بلو از استکینگ ژل عبور کند تنظیم شد، سپس در ۲۰۰ ولت به مدت ۷ ساعت با بافر الکتروفورز ۵ ایکس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص کردن باندهای پروتئینی، ژل‌ها به وسیله ۵٪ کوماسی بلو (G ۲۵۰) به مدت ۲ ساعت رنگ‌آمیزی گردید و سپس طی ۲ مرحله به وسیله محلول رنگ‌بری کوماسی بلو به مدت ۴ ساعت رنگبری انجام گرفت. عکس برداری 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 یک‌طرفه در سطح احتمال ۹۵٪ از نرم‌افزار SPSS-۱۶ استفاده گردید.

نتایج

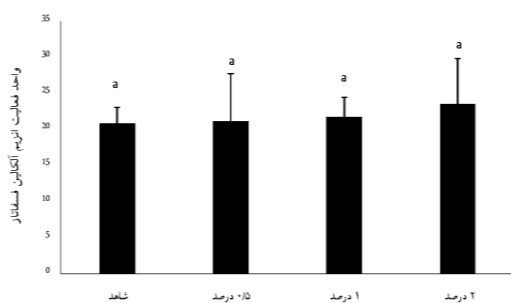
اثرات استفاده از سطوح مختلف عصاره گیاهی آنغوزه (۰، ۵، ۱ و ۲٪) بر میزان فعالیت ایمونوگلوبین موکوس ماهی گورخری در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج مذکور اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت ایمونوگلوبین موکوس بین گروه‌های تغذیه‌شده با ۱ و ۲٪ عصاره مشاهده شد ($p < 0.05$) و بین تیمارهای ۱ و ۲٪، بالاترین میزان ایمونوگلوبین در ماهیانی مشاهده شد که با جیره حاوی ۱٪ تغذیه شده بودند ($p < 0.05$). نتایج حاصل از بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه بر میزان پروتئین موکوس پوست ماهی گورخری (شکل ۲) اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمارهای آزمایشی تغذیه‌شده با عصاره گیاهی آنغوزه نشان نداد ($p > 0.05$). همچنین در بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز موکوس (شکل ۳)، ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد از خود نشان ندادند ($p > 0.05$).

دوره سازگاری به صورت تصادفی در ۴ تیمار (با ۳ تکرار) توزیع شدند. پرورش در آکواریوم با حجم آب ۵۰ لیتر و تراکم ۳۰ قطعه در هر آکواریوم صورت گرفت. گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) از شهرستان بیارجمند استان سمنان در بهار ۱۳۹۵، جمع‌آوری شد و مورد تأیید اساتید گیاه‌شناسی دانشگاه گلستان قرار گرفت. عصاره‌گیری آبی الکلی با استفاده از افزودن ۲۰ گرم پودر گیاه آنغوزه و ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد، بعد از ۷۲ ساعت مخلوط آماده‌شده را از روی چند گاز استریل عبور داده و رسوبات از عصاره جدا شد. سپس محلول صاف شده را با کاغذ صافی والتمن صاف و به یک بشر ضدعفونی شده منتقل و با دستگاه روتاری حلال موجود حذف گردید. سپس عصاره صاف شده در دستگاه خشک‌کن انجمادی به پودر خشک تبدیل شد. عصاره حاصله تا زمان انجام آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (صمصام شریعت، ۱۳۸۶). به منظور آماده‌سازی تیمارهای آزمایشی، عصاره در سطح ۰، ۵/۱، ۱ و ۲٪ به جیره پایه اضافه شد. غذاهای ماهیان آزمایشی طی دوره آزمایش به میزان ۵٪ وزن بدن و ۴ الی ۵ مرحله در روز انجام گردید. به منظور 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، محدوده pH 7.9 ± 0.15 و میانگین اکسیژن 7 ± 0.2 میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

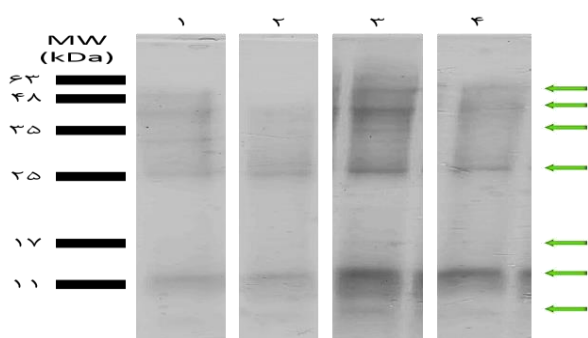
جمع‌آوری موکوس: جهت جمع‌آوری موکوس در انتهای دوره غذایی به مدت ۲۴ ساعت قطع گردید. موکوس با استفاده از ۵ میلی‌لیتر محلول نمک (مرک آلمان) ۵۰ میلی‌مولار از ۱۵ ماهی در طی زمان ۳ دقیقه در پلاستیک جمع‌آوری و توسط دستگاه سانتریفیوژ (Eppendorf, Engelsdorf, Germany ۵۸۱۰R) با دور ۱۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌فیوژ شدند، سپس مایع سطحی جمع‌آوری و به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- نگهداری شدند (Ross و همکاران، ۲۰۰۰).

سنجش شاخص‌های ایمنی موکوس: اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول و ایمونوگلوبولین با استفاده از روش بیورت (Guobing و همکاران، ۲۰۰۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی تعیین شد. جهت تعیین سطح فعالیت آنزیم فسفاتازقلیایی از دستگاه اسپکتروفتومتر و کیت‌های تولیدشده توسط شرکت پارس آزمون استفاده گردید. طبق دستورالعمل از نمونه موکوس به مقدار ۲۰ میکرو لیتر و از معرف‌های مخلوط شده شماره ۱ و ۲ به مقدار ۱۰۰۰ میکرو لیتر با هم مخلوط شد، مقدار جذب نوری را بعد از ۱ دقیقه قرائت کرده و پس از ۱، ۲ و ۳ دقیقه، اختلاف جذب نوری از دقیقه قبل تعیین شد، باهم جمع شد و بر عدد ۳ تقسیم و میانگین به دست آمده در فاکتور ۲۷۵۷ ضرب گردید.





شکل ۳: میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز موکوس پوست ماهی گورخری تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه به مدت ۶۰ روز



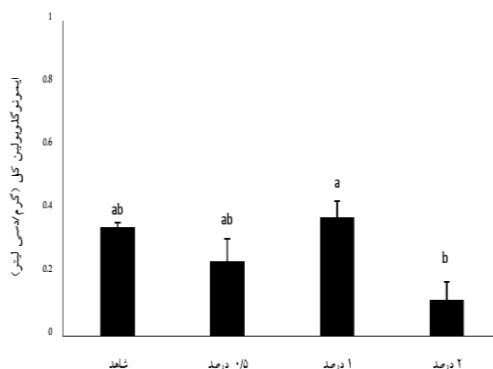
شکل ۴: الگوی پروتئینی موکوس ماهی گورخری تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه به مدت ۶۰ روز (۱: شاهد، ۲: ۰/۵٪، ۳: ۱٪ و ۴: ۲٪)

بحث

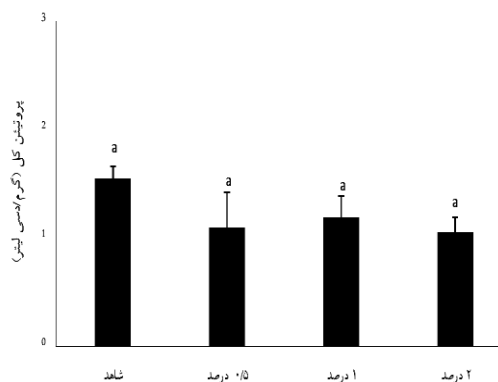
در شرایط طبیعی طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا در محیط آبی وجود دارد و افزایش تراکم در محیط به جهت تشدید استرس موجب ضعف فیزیولوژیک و افزایش حساسیت ماهی به عوامل بیماری‌زا و در نتیجه بروز بیماری می‌شود (Vallejos-Vidal و همکاران، ۲۰۱۶). تنظیم و افزایش کارایی سیستم ایمنی در ماهیان از طریق دست‌کاری جیره‌های غذایی ابزاری قدرتمند و مؤثر جهت حفظ سلامت ماهی و کاهش تلفات می‌باشد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰). در کشورهای مختلف استفاده از محرک‌های گیاهی به دلیل آثار جانبی کم‌تر بر موجود زنده و محیط‌زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان، پایدار و در دسترس بودن، جهت پیش‌گیری و کنترل بیماری ماهی توسعه یافته است (Guardiola و همکاران، ۲۰۱۶). یکی از ترکیبات اصلی گیاه آنگوزه که ۱۲/۲ درصد آن را تشکیل می‌دهد، آلفاپینن است. این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و بهبوددهنده عملکرد سیستم ایمنی می‌باشد (Sadraei و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین این گیاه

آنالیز الگوی پروتئینی: نتایج حاصل از آزمایشات صورت

گرفته جهت مقایسه الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی گورخری تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه به صورت شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت قابل توجهی در تراکم باندها بین الگوی پروتئینی تیمارها مشهود و پروتئین‌های مشاهده شده بین ۱۱ تا ۶۳ کیلو دالتون می‌باشد. هم‌چنین باندهایی با وزن مولکولی پایین‌تر از ۱۱ کیلو دالتون در الگوی پروتئینی ماهی در هر چهار تیمار مشاهده شد که تفاوت محسوسی در تراکم آن‌ها در تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره با سایر تیمارها مشاهده شد. به طوری که باندهای مشخص شده در تیمار تغذیه شده با ۱٪ عصاره نسبت به سایر تیمارها بیش‌ترین ضخامت را نشان داد. اما در تیمار تغذیه شده با ۰/۵ درصد عصاره نسبت به شاهد تغییرات محسوسی مشاهده نشد. براساس مطالعه Babji و Najafian (۲۰۱۲) پپتیدهای آنتی‌باکتریال معمولاً دارای کم‌تر از ۵۰ آمینو اسید و وزن کم‌تر از ۱۰ کیلو دالتون هستند و احتمال می‌رود افزایش محسوس تراکم باندهای دارای وزن مولکولی کم‌تر از ۱۰ کیلو دالتون سبب بهبود سیستم ایمنی غیراکتسابی نیز شود (شکل ۴).



شکل ۱: میزان فعالیت ایمونوگلوبولین موکوس پوست ماهی گورخری تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه به مدت ۶۰ روز



شکل ۲: میزان فعالیت پروتئین کل موکوس پوست ماهی گورخری تغذیه شده با عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه به مدت ۶۰ روز

نسبت به گروه شاهد گردید ($p < 0.05$) که نشان دهنده اثرات مثبت گیاه آنگوزه بر ایمنی موکوس پوست ماهی گورخری است. Verma و همکاران (۲۰۱۲) اثر تغذیه‌ای مکمل‌های گیاهی گیاه لور (*Ficus benghalensis*) و گیاه علف (*Cynodon dactylon*) بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی *Channa punctatus* را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۵ گرم بر کیلوگرم 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 به‌همراه فاکتورهای دیگر موکوس به‌هنگام هجوم پاتوژن‌ها نقش آگلوتینه کردن آن‌ها را بر عهده دارند (Suzuki و همکاران، ۲۰۰۳). براساس نتایج کسب شده در بررسی حاضر میزان پروتئین کل بین گروه شاهد و تیمار تغذیه شده 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، ۱۹۹۰). در 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 درخصوص اثر گیاه زنجبیل در ماهی روهو (Sukumaran و همکاران، ۲۰۱۶) و سیر در ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (Ghehdarijani و همکاران، ۲۰۱۶) 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 (Sherif و Khatta، ۲۰۱۱ و Kamikouchi، ۲۰۱۴) و همکاران، ۲۰۰۴؛ Lortal و همکاران، ۱۹۹۷) در بررسی الگوی پروتئینی، سطح پروتئین را در محدوده پایین‌تر از ۶۵ کیلو دالتون نشان داد که نشان‌دهنده تراکم بالای پپتیدهای با وزن مولکولی کم‌تر از ۶۵ کیلو دالتون در موکوس ماهی گوره‌خری است. اختلاف در الگوی پروتئینی یک موجود زنده به‌دلیل شرایط داخلی و خارجی، انواع بافت‌ها و مراحل مختلف تکامل می‌باشد (Shepherd و همکاران، ۱۹۹۴). احتمالاً باند‌های ۲۹/۷-۲۵/۹ و ۲۵-۲۸ کیلو دالتون، به‌ترتیب نشان‌دهنده پروتئین‌های پروتئازوم سوبیت آلفا و پروتئازها می‌باشند (Guardiola و همکاران، ۲۰۱۵). بالاترین شدت تراکم در

می‌تواند به‌عنوان یک محرک ایمنی طبیعی و ارزان‌قیمت در آبی پروری 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، ۲۰۱۲). موکوس اپیدرم حاوی چندین ترکیب ترش‌حی 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. (Austin و McIntosh، ۱۹۸۸). 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، ۱۳۷۷). 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، ۱۳۹۵). Hoseinifar و همکاران، (۲۰۱۵) در بررسی اثر عصاره میوه خرما بر شاخص‌های ایمنی موکوس پوست بچه‌ماهی کپور معمولی گزارش نمودند که اضافه کردن این مکمل گیاهی به جیره غذایی بچه‌ماهیان، موجب بالابردن فاکتورهای ایمنی موکوس از جمله آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز قلیایی و لیزوزیم می‌شود. در مطالعه Solimanian و همکاران (۲۰۱۶) اثر پودر سیر با سطوح مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در کیلوگرم به‌مدت ۸ 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 آلکالین فسفاتاز و سطوح پروتئین محلول موکوس پوست شده است.

ایمونوگلوبین‌ها در غیاب محرک آنتی‌ژنی خارجی به‌صورت کاملاً تنظیم‌شده تولید و جزء آنتی‌بادی‌های طبیعی به‌شمار می‌آیند و به جهت محافظت سریع در برابر عوامل بیماری‌زا، به‌عنوان یکی از بخش‌های حیاتی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌گردند (Nayak و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره هیدروالکلی آنگوزه به جیره غذایی ماهی گوره‌خری منجر به افزایش معنی‌دار سطح ایمونوگلوبین تیمار با میزان ۱ درصد



- sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assa foetida*. Natural Product Research. Vol. ۲۰, No. ۱۰, pp: ۹۶۱-۹۶۵.
۸. **Bohlouli, O.S.; Tahmasebi, K.A.; Parseh, A.; Salati, A.P. and Sadeghi, E., ۲۰۱۲.** 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. ۳۸, No. ۴, pp: ۱۰۲۹-۱۰۳۴.
 ۹. **Cabello, F.C., ۲۰۰۶.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology.* Vol. ۸, pp: ۱۱۳۷-۱۱۴۴.
 ۱۰. **Citarasu, T.; Sivaram, V.; Immanuel, G.; Rout, N. and Murugan, V., ۲۰۰۶.** 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. ۲۱, pp: ۳۷۲-۳۸۴.
 ۱۱. **Esteban, M.A., ۲۰۱۲.** An overview of the immunological defenses in fish skin. *Fish Immunol.* Vol. ۱, pp: ۱-۲۹.
 ۱۲. **Ghehdarijani, M.S.; Hajimoradloo, A.; Ghorbani, R. and Roohi, Z., ۲۰۱۶.** The effects of garlic supplemented diets on skin mucosal immune responses, stress resistance and growth performance of the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology.* Vol. ۴۹, pp: ۷۹-۸۳.
 ۱۳. **Guardiola, F.A.; Porcino, C.; Cerezuela, R.; Cuesta, A.; Faggio, C. and Esteban, M.A., ۲۰۱۶.** 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 Immunology.* Vol. ۵۲, pp: ۲۹۸-۳۰۸.
 ۱۴. **Guardiola, F.A.; Dioguardi, M.; Parisi, M.G.; Trapani, M. R.; Meseguer, J.; Cuesta, A. and Esteban, M.A., ۲۰۱۵.** 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. ۴۵, pp: ۱۱۲-۱۲۳.
 ۱۵. **Guobing, X.; Lili, J.; Ihua, Z. and Tiewan, X., ۲۰۰۱.** Application of an improved biuret method to the determination of total protein in urine and cerebrospinal fluid without concentration step by use of Hitachi ۷۱۷۰ auto analyzer. *Journal of clinical laboratory analysis.* Vol. ۱۵, No. ۴, pp: ۱۶۱-۱۶۴.
 ۱۶. **Guz, L.; Sopinska, A. and Oniszczyk T., ۲۰۱۱.** Effect of *Echinacea purpurea* on growth and survival of guppy (*Poecilia reticulata*) challenged with *Aeromonas bestiarum*. *Aquacult Nut.* Vol. ۱۷, pp: ۶۹۵-۷۰۰.
 ۱۷. **Hoseinifar, S.H.; Khalili, M.; Rofchaei, R.; Raeisi, M.; Attar, M. and Cordero, H., ۲۰۱۵.** Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp
- تیمار تغذیه شده با گیاه آنغوزه در سطح ۱ درصد مشاهده شد. رستگاری (۱۳۹۵) تغییر در الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کلمه تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی نعنای را 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 آنغوزه بر الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی گوره‌خری مطابقت دارد.
- در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه در ماهی گوره‌خری به‌ویژه در سطح ۱ درصد جیره، بر برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی گوره‌خری تأثیرگذار می‌باشد. بنابراین استفاده از این مکمل خوراکی به‌عنوان محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی آبزیان توصیه می‌شود. هرچندکه انجام مطالعات بیش‌تر به‌منظور تعیین مدت‌زمان، دوز و نحوه مصرف محرک‌های ایمنی و هم‌چنین گونه ماهی موردنظر باید مدنظر قرار گرفته شود.

منابع

۱. **رستگاری، س.، ۱۳۸۵.** 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 محیط‌زیست. ۸۷ صفحه.
۲. **سلطانی، م.، ۱۳۷۷.** ویژگی‌های ضدباکتریایی موکوس پوست ماهی. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۲، صفحات ۳۴ تا ۳۰.
۳. **Akaberi, M. and Iranshahy, M., ۲۰۱۴.** Review of the traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of giant fennel (*Ferula communis* L. subsp. *Communis*), Iran. *Journal of Basic Medecine Science.* Vol. ۱۸, No. ۱۱, pp: ۱۰۵۲-۱۰۶۲.
۴. **Aly, S.M. and Mohamed, M.F., ۲۰۱۰.** *Echinacea purpurea* and *Alliumsativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology, Animal Nutrition.* Vol. ۹۴, pp: ۳۱-۳۹.
۵. **Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Jalali, M.R., ۲۰۱۰.** Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Research.* Vol. ۴, No. ۳, pp: ۸۵-۹۱.
۶. **Austin, B. and McIntosh, D., ۱۹۸۸.** Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases.* Vol. ۱۱, pp: ۲۷۵-۲۷۷.
۷. **Bandyopadhyay, D.; Basak, B.; Chatterjee, A.; Lai, T. K.; Banerji, A. and Banerji, J., ۲۰۰۶.** Saradaferin, a new



۳۱. **Rakesh Das, R.; Raman, R.P.; Saha, H. and Singh, R., ۲۰۱۳.** Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Quaculture Research*. pp: ۱-۱۱.
۳۲. **Ross, N.W.; Firth, K.J.; Wang, A.; Burka, J.F. and Jojnson, S.C., ۲۰۰۰.** 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. ۴۱, pp: ۴۳-۵۱.
۳۳. **Sadraei, H.; Ghannadi, A. and Malekshahi, K., ۲۰۰۳.** Composition of the essential oil of *Ferula assa foetida* and its spasmolytic action. *Saudi Pharmaceutical Journal*. Vol. ۱۱, pp: ۱۳۶-۱۴۰.
۳۴. **Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Nejadmoghadam, S. and Jafar, A., ۲۰۱۶.** 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 and shellfish immunology*. Vol. ۵۵, pp: ۲۴۲-۲۴۸.
۳۵. **Shepherd, K.L., ۱۹۹۴.** Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol. ۴, pp: ۴۰۱-۴۲۹.
۳۶. **Shin, J.T. and Fishman, M.C., ۲۰۰۲.** From zebrafish to human: modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. Vol. ۳, pp: ۳۱۱-۳۴۰.
۳۷. **Soleimani, S.M.; Sajjadi, M.M.; Falahatkar, B. and Yazdani, M.A., ۲۰۱۶.** 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. ۵, pp: ۲۱-۳۰.
۳۸. **Sukumaran, V.; Park, S.C. and Giri, S.S., ۲۰۱۶.** Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. ۵۷, pp: ۳۶۲-۳۷۰.
۳۹. **Suzuki, Y.; Tasumi, S.; Tsutsui, S.; Okamoto, M. and Suetake, H., ۲۰۰۳.** Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. ۱۳۶, pp: ۷۲۳-۷۳۰.
۴۰. **Takeoka, G., ۲۰۰۱.** Volatile constituents of asafoetida. *Aroma active compounds in foods*. *Journal of the American Chemical Society*. Vol. ۷۹۴, pp: ۳۳-۴۴.
۴۱. **Tangestani, R.; Alizade dughikolaei, E.; Ebrahimi, E. and Zare, P., ۲۰۱۱.** Effect of garlic (*Allium sativum*) essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Veterinary Research*. Vol. ۶۶, pp: ۲۰۹-۲۱۴.
۴۲. **Vallejos-Vidal, E.; Reyes-Lopez, F.; Teles, M. and MacKenzie, S., ۲۰۱۶.** The response of fish to immunostimulant diets. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. ۵۶, pp: ۳۴-۶۹.
- (*Cyprinus carpio*) fry. *Fish and Shellfish Immunol*. Vol. ۴۷, pp: ۷۰۶-۷۱۱.
۱۸. **Iger, Y. and Abraham, M., ۱۹۹۰.** The process of skin healing in experimentally wounded carp. *Journal of Fish Biology*. Vol. ۳۶, pp: ۴۲۱-۴۳۷.
۱۹. **Kamikouchi, A.; Morioka, M. and Kubo, T., ۲۰۰۴.** Identification of honeybee antennal proteins/genes expressed in a sex-and/or caste selective manner. *Zoological science*. Vol. ۲۱, pp: ۵۳-۶۲.
۲۰. **Khattab, S.; El Sherif, F.; El-Garhy, H.A.; Ahmed, S. and Ibrahim, A., ۲۰۱۴.** Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS PAGE and HPLC. *Journal of Gene*. Vol. ۵۳۳, pp: ۳۱۳-۳۲۱.
۲۱. **Khattab, S. and El Sherif, F., ۲۰۱۱.** Effect of growth regulators on *Carpobrotus edulis* rapid micropropagation and molecular analysis. *Journal of American Science*. Vol. ۷, pp: ۵۱۱-۵۲۰.
۲۲. **Khosravi, H. and Mehrabi, A., ۲۰۰۶.** Economic study of Ferula harvesting in Tabass region. *Journal of Basic Medical Sciences*. Vol. ۵۸, No. ۴, pp: ۹۳۳-۹۴۴.
۲۳. **Laemmli, U.K., ۱۹۷۰.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T۴. *Nature Journal*. Vol. ۲۲۷, pp: ۶۸۰-۶۸۵.
۲۴. **Lessman, C.H.A., ۲۰۱۱.** The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. Vol. ۹۳, No. ۳, pp: ۲۶۸-۲۸۰.
۲۵. **Lortal, S.; Valence, F.; Bizet, C. and Maubois, J.L., ۱۹۹۷.** Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to ۱۰ *Lactobacillus* species. *Research in microbiology*. Vol. ۱۴۸, pp: ۴۶۱-۴۷۴.
۲۶. **Mallikarjuna, G.; Dhanalakshmi, S.; Raisuddin, S. and Rao, A.R., ۲۰۰۳.** Chemomodulatory influence of erula 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. ۸۱, No. ۱, pp: ۱-۱۰.
۲۷. **Michael, E.T.; Amos, S.O. and Hussaini, L.T., ۲۰۱۴.** A review on probiotics application in aquaculture. *Fisheries and Aquaculture Journal*. Vol. ۵۰, No. ۴, pp: ۱-۳.
۲۸. **Najafian, L. and Babji, A.S., ۲۰۱۲.** A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*. Vol. ۳۳, pp: ۱۷۸-۱۸۵.
۲۹. **Nayak, S.; Swain, P. and Mukherjee, S., ۲۰۰۷.** 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. ۲۳, pp: ۸۹۲-۸۹۶.
۳۰. **Quesada, S.P.; Paschoal, J.A.R. and Reyes, F.G.R., ۲۰۱۳.** Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones. *Journal of Food Science*. Vol. ۷۸, pp: ۳۲۱-۱۳۳۳.



۴۳. Verma, V.K.; Rani, K.V.; Sehgal, N. and Prakash, O., ۲۰۱۲. Immunostimulatory response induced by supplementation of *Ficus benghalensis* root powder, in the artificial feed the Indian freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. ۳۳, pp: ۵۹۰-۵۹۶.
۴۴. Wu, Y.S.; Lee, M.C.; Huang, C.T.; Kung, T.C.; Huang, C.Y. and Nan, F.H., ۲۰۱۷. Effects of traditional medical herbs “minor bupleurum decoction” on the non-specific immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*. Vol. ۶۴, pp: ۲۱۸-۲۲۵.

