دانشگاه گنبد کاووس
نشریه "پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی"
دوره پنجم، شماره چهارم، زمستان ۹۶
http://jair.gonbad.ac.ir

بررسی اثر عصاره گیاهی بومادران (*Achillea millefolium*) در جیره غذایی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) بر پاسخ ایمنی موکوس و بیان ژن مرتبط با ایمنی TNF-alfa

شبنم نژادمقدم[۱]، محمدرضا ایمانپور[۲]، ولی‌اله جعفری[۳] و رقیه صفری*[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲]استاد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۳]دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۴]استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ ارسال: ۹۵/۰۴/۰۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۰۶

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بومادران بر ایمنی موکوس (لیزوزیم، ایمنوگلوبولین‌کل و پروتئاز) و همچنین بیان ژن مرتبط با ایمنی TNF-alfa در ماهی کاراس طلایی (*C. auratus*) بود. به این منظور،۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۰۱۴ ± ۰/۱۹۲ گرم به‌طور تصادفی در ۶ آکواریوم تقسیم (۲ تکرار) و به‌مدت ۶ ماه با جیره غذایی حاوی ۰، ۲، ۴ گرم در کیلوگرم غذا عصاره بومادران تغذیه شدند. در ارزیابی ایمنی موکوسی، فعالیت لیزوزیم و آنزیم پروتئاز موجود در موکوس در ماهیان تغذیه شده با ۴ گرم عصاره در مقایسه با شاهد و ۲ گرم عصاره افزایش معنی‌داری نشان داد. میزان توتال ایمنوگلوبین درماهیان تیمار شده با عصاره با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیان ژن TNF-alfa افزایش معنی‌داری در ماهیان تغذیه شده با عصاره بومادران در مقایسه با گروه کنترل با یک روند وابسته به دوز را نشان داد. با افزایش سطح عصاره در جیره غذایی مقدار نسبی بیان ژن افزایش یافت. بر اساس نتایج، عصاره گیاهی بومادران در جیره غذایی می‌تواند وضعیت ایمنی موکوسی و بیان ژن ایمنی را در ماهی کاراس طلایی متعادل نماید.

واژه‌های کلیدی: *C. auratus*، **بومادران، ایمنی موکوسی، بیان ژن**

*نویسنده مسئول: fisheriessafari@yahoo.com

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

مقدمه

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپور ماهیان (Cyprinidae) از لحاظ زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) است (Vesogh and Mostageer, 1995) و با فرهنگ و عقاید مردم درسراسر جهان عجین شده و یک ماهی بسیار مهم به لحاظ اقتصادی و مطالعاتی است (Hasan Nataj Niazi *et al*., 2013). با افزایش درخواست پرورش ماهی قرمز و با درنظرگرفتن این نکته که عوامل محدودکننده زیادی بر سر راه پرورش این ماهی اعم از شرایط پرورشی و تغذیه‌ای وجود دارد، لذا ضرورت دارد که برای مقاوم کردن ماهی و افزایش رشد و بازماندگی از ترکیبات خاصی در جیره این ماهی استفاده شود. با توجه به سهم عمده غذا در هزینه‌های پرورش، بهبود وضعیت تغذیه‌ای منجر به افزایش تولید و سوددهی خواهد شد (Rahnama *et al*., 2013). طی سال‌های اخیر به دلیل هزینه بالا و مشکلات حاصل از داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند تغییرات زیان‌بار زیست‌محیطی، به‌وجود آوردن پاتوژن‌های مقاوم و مضر بودن برخی از این ترکیبات در فرآورده‌های آبزی مورد مصرف انسان، صنعت آبزی‌پروری برای تولیدی پربازده و پایدار به‌سمت استفاده از مواد طبیعی همچون پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و گیاهان دارویی سوق داده شده است (Liu *et al*., 2013). افزودن گیاهان دارویی به جیره، از طریق فعالیت ضد میکروبی انتخابی یا ایجاد شرایط مطلوب برای برخی گونه‌ها، طیف میکروبی روده را تحت تأثیر قرار می‌دهد که بهره‌گیری بیشتر با جذب بهتر مواد مغذی و بدنبال آن افزایش رشد و همچنین تحریک سیستم ایمنی را در پی دارد (Windisch *et al*., 2008). مطالعات متعددی اثرات گیاهان دارویی بر تقویت سیستم ایمنی هومورال و سلولی آبزیان را نشان داده است (Sivaram *et al*., 2004; Magdelin, 2005; Minomol, 2005; Aly and Mohamed, 2010; Gu *et al.,* 2011: Alishahi, 2011).

گیاه بومادران از جمله گیاهانی است که دارای فعالیت ایمنی می‌باشد. این گیاه با نام علمی (*Achillea millefolium*) متعلق به خانواده (Asteraceae) بوده (Innocenti *et al*., 2007) و بیش از صد ترکیب بیولوژیک فعال دراین گیاه شناسایی شده است (Csupor-Loffler *et al*., 2009). بومادران به سبب دارا بودن ترکیبات فلانوئیدی نظیر لوتئین، آپیژنین، روتین و ترکیبات فنلی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدقارچ و ضد باکتریایی است (Alcaraz and Ferrandiz, 1987; Taylor and Francis, 2001; Magiatis *et al*., 2002). عصاره این گیاه در جانوران مختلف از جمله ماهی جهت بهبود سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گرفته است (Taylor and Francis, 2001; Nafisi Bahabadi *et al*., 2014; Banaee *et al*., 2016). علاوه براین مطالعاتی در خصوص اثرات مکمل‌های غذایی سایر گیاهان بر میزان فعالیت ایمنی موکوس و بیان ژن‌های ایمنی در برخی ماهیان گزارش شده است (Safari *et al*., 2016; Hoseinifar *et al*., 2015).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

از آنجا که تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با اثر طولانی مدت تغذیه با جیره غذایی حاوی عصاره گیاه بومادران بر عملکرد ایمنی غیراختصاصی و بیان ژن مرتبط با ایمنی در لارو ماهی قرمز صورت نگرفته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی فاکتورهای مذکور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش ماهی و آماده‌سازی جیره: این مطالعه به‌منظور تعیین اثر جیره‌های حاوی عصاره گیاهی بومادران بر ایمنی غیراختصاصی ماهی قرمز به‌مدت ۶ ماه در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام پذیرفت. عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران با ماده مؤثره ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از شرکت آدنین گل‌داروی تهران تهیه شد. باتوجه به این مطلب که در هر میلی‌لیتر ۱۵۰ میلی‌گرم ماده مؤثره وجود داشت، دوزهای مورد نظر با یک تناسب ساده محاسبه شد و عصاره به جیره غذایی پایه اضافه گردید.

پس از یک هفته سازگاری اولیه تعداد ۳۰ عدد ماهی با میانگین وزنی۰/۰۱۴ ± ۰/۱۹۲ گرم در آکواریوم به حجم ۵۰ لیتر ذخیره‌سازی شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۲ تیمار عصاره گیاه بومادران با دوزهای ۲، ۴ گرم در کیلوگرم غذا و یک تیمار شاهد (بدون عصاره گیاهی)، هرکدام با ۲ تکرار بودند. جهت پایداری عصاره در آب از محلول ژلاتین ۲ درصد در جیره‌های غذایی استفاده شد. جیره‌های غذایی تا زمان مصرف داخل پلاستیک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غذادهی ماهیان طی دوره آزمایش در حد سیری انجام شد (Caballero *et al*., 2002). جهت حفظ کیفیت آب یک روز در میان دو-سوم حجم آب آکواریوم تعویض شده و مدفوع ماهی و باقیمانده غذا از طریق سیفون کردن از محیط خارج شدند. شاخص‌های کیفی آب طی دوره پرورش به‌طور روزانه اندازه‌گیری و دمای آب ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد، pH ۸-۷ و اکسیژن ۹ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

جمع‌آوری موکوس: درانتهای دوره، جمع‌آوری موکوس با استفاده از روش توصیه‌شده سوبرامانیان و همکاران (Subramanian *et al.,* 2007) صورت گرفت. بدین‌منظور به‌مدت ۲۴ ساعت قبل از جمع‌آوری موکوس، غذادهی قطع گردید. به‌دلیل سایز کوچک ماهیان همه ماهی‌های موجود در هر آکواریوم جهت نمونه‌برداری موکوس انتخاب شدند و به زیپ‌پکهای پلاستیکی حاوی۱۰ میلی‌لیتر محلول نمک (مرک آلمان) ۵۰ میلی‌مولار منتقل شدند. به‌جهت ترشح موکوس ماهی، کیسه‌ها به آرامی تکان داده شدند. پس از مدت ۳ دقیقه ماهیان به آکواریوم‌های پرورش انتقال داده شدند. موکوس جمع‌آوری‌شده به تیوب‌های استریل منتقل شده و توسط دستگاه سانتریفیوژ (5810R Eppendorf, Engelsdorf, Germany) با دور ۱۵۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه و در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

رویی آن‌ها جمع‌آوری شده و نمونه‌ها جهت انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به‌منظور جلوگیری از آسیب و رشد باکتری‌ها نگهداری شدند.

سنجش فعالیت شاخص‌های ایمنی موکوس

فعالیت لیزوزیم: فعالیت لیزوزیم موکوس پوست ماهی قرمز تیمارهای آزمایشی با استفاده از روش Turbidimetric صورت گرفت (Esteban, 2012). به‌طور خلاصه در این آزمایش توانایی لیزوزیم سرم در تخریب لایه پپتیدوگلیکان باکتری گرم مثبت (*Micrococcus lysodeikticus*) مورد سنجش گرفت. ابتدا محلول PBS (Sigma, P5493) را داخل لوله آزمایش ریخته و مقداری باکتری به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مزبور را برداشته و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom, Libera, S12) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. در مرحله بعد مقدار ۱۵ میکرولیتر از موکوس را به آن اضافه نموده و بعد از کمی تکان دادن و نگهداری در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه، مقدار جذب قرائت گردید. سپس مقدار جذب را با منحنی استاندارد لیزوزیم سفیده تخم مرغ (Sigma- L3790) مقایسه و مقدار لیزوزیم نمونه موردنظر براساس کدورت‌سنجی برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

فعالیت ایمونوگلوبولین: سنجش میزان ایمونوگلوبولین (IgM) براساس اندازه‌گیری محتوای پروتئین کل و با استفاده از روش میکروپروتئین‌ها (طبق دستورالعمل شرکت سیگما) انجام شد (Siwicki and Anderson, 1994). در این روش بعد از تعیین میزان پروتئین سرم، به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد. قبل و بعد از ترسیب مولکول‌های ایمونوگلوبولین با استفاده از محلول ۱۲٪ پلی‌اتیلن گلیکول عمل می‌شود. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری گردید. میزان ایمنوگلوبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه شد.

فعالیت پروتئاز: فعالیت پروتئاز موکوس با استفاده از ارزیابی هیدرولیز آزوکازئین مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت آنزیمی برحسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Palaksha *et al*., 2008).

سنجش بیان ژن ایمنی TNF-alfa: RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت‌های کلیه هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Biozol-Bioflux- Bioer) استخراج شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵درصد و مشاهده باندهای S ۱۸ و ۲۸S مربوط به RNA ریبوزومی و فقدان آلودگی DNA ژنومی با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌دست آمده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) انجام گردید. غلظت

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

نمونه‌های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانوفتومتر انجام شد و سپس به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب DEPC رقیق شدند. جهت حذف هرگونه باقی‌مانده DNA ژنومی در نمونه‌های RNA، تیمار DNase I انجام شد و سپس ساخت رشته اول cDNA براساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز (Fermentase- France) با استفاده از ۵ میکرولیتر RNA تیمار شده با DNase I (غلظت ۵۰۰ نانوگرم)، ۱میکرولیتر آغازگر الیگو dt (۲۰-۱۸ الیگونوکلئوتید) و ۵ میکرولیتر آب DEPC انجام شد. بدین‌منظور تیوپ‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و سپس به‌سرعت روی یخ قرار گرفتند. ۴ میکرولیتر بافر ۵X آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار و ۲۰ واحد آنزیم RNase inhabitor و ۱/۵ میکرولیتر آب DEPC به مخلوط بالا اضافه شد. تیوپ‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرارگرفت. بلافاصله ۲۰۰ واحد آنزیم نسخه‌بردار معکوس به هر تیوپ اضافه گردید و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند سپس تیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا واکنش غیرفعال شود. به هر تیوپ ۳۸۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و سپس cDNA های سنتزشده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای بیان ژن قبلاً در مطالعه حسینی و همکاران (Hosseini *et al.,* 2016) ارائه شده بود (جدول ۱). Real time PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده ۱ میکرولیتر پرایمر پس‌رونده، ۲/۸ میکرولیتر آب، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق‌شده (بر اساس غلظت) صورت گرفت.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن ایمنی در ماهی قرمز (*C. auratus*)

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای‌اتصال (C°)	طول قطعه	کاربرد
Ca TNF-alfa q-PCRF	TCATTCCTTACGACGGCATTT	۶۰	۸۵	سنجش کمی بیان ژن
Ca TNF-alfa q-PCRR	CAGTCACGTCAGCCTTGCAG	۶۰		
Ca β- actin q-PCRF	ACTGCACAGCCAAGAGAGTTCA	۶۰	۱۸۸	ژن رفرنس (خانه دار)
Ca β- actin q-PCRR	GTTATTAAAGCGGCCGATATGC	۶۰		

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به‌دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن TNF-alfa نسبت به بتا اکتین با روش $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ با کمک نرم‌افزار REST (Pfaffl *et al*., 2002) آنالیز شد. سپس نرمال بودن

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف و شیپیرو- ویلک تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن و سطح فاکتورهای ایمنی موکوسی توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 انجام شد.

نتایج

پارامترهای ایمنی موکوس: بررسی‌های اثرات عصاره بومادران بر ایمنی موکوس ماهی قرمز اختلاف معنی‌دار در میزان پروتئاز بین گروه تغذیه‌شده با سطح ۴ گرم در مقایسه با سطح ۲ گرم و گروه شاهد طی ۶ ماه تغذیه با مکمل را نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما بین گروه شاهد و تغذیه شده با ۲ گرم عصاره بومادران اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p>۰/۰۵$). میزان ایمونوگلوبین کل موکوس با اضافه کردن مکمل در جیره نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری پیدا نکرد، اما روند افزایش بین تیمار تغذیه شده با ۴ گرم عصاره و گروه شاهد مشاهده شد. میزان آنزیم لیزوزیم در موکوس گروه تغذیه‌شده با سطح ۴ گرم بیشتر و دارای اختلاف معنی‌داری با دو گروه دیگر بودد اما گروه تغذیه شده با ۲ گرم و گروه شاهد باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲).

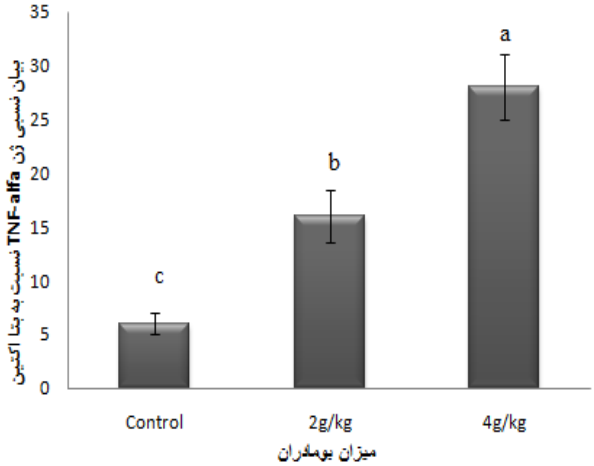
جدول۲- میزان فعالیت لیزوزیم، ایمونوگلوبین و پروتئاز موکوس در ماهیان قرمز (*C. auratus*) تغذیه شده با دوزهای مختلف عصاره بومادران (۰، ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم غذا).

میزان عصاره در غذا	پروتئاز	ایمونوگلوبین	لیزوزیم
شاهد (۰گرم در کیلوگرم عصاره بومادران)	۰/۹۲±۰/۱ [b]	۱۲±۰/۷ [a]	۱۳/۵±۰/۵ [b]
۲گرم در کیلوگرم عصاره بومادران	۰/۹۸±۰/۴۹ [b]	۱۰/۹۷±۰/۳ [a]	۱۴/۵±۰/۷ [b]
۴ گرم در کیلوگرم عصاره بومادران	۱/۶±۰/۱۴ [a]	۱۲/۵±۰/۷ [a]	۲۱/۵±۰/۷ [b]

حروف کوچک غیر مشابه اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بیان ژن: در تحقیق حاضر بیان ژن TNF-alfa پس از ۶ ماه تغذیه با جیره حاوی عصاره بومادران افزایش معناداری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). افزایش بیان این ژن وابسته به دوز بوده و با افزایش میزان عصاره در جیره بیان ژن مرتبط با ایمنی افزایش یافت (شکل ۱).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]



شکل ۱- تغییرات بیان نسبی TNF-a به بتااکتین در ماهیان قرمز (*C. auratus*) تغذیه شده با دوزهای مختلف عصاره بومادران (۰، ۲ و ۴ گرم در کیلوگرم غذا). حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه با شناخت ارزش انقلاب سبز و همچنین اثرات زیست‌محیطی مواد محرک سیستم ایمنی با منشأ طبیعی، استفاده از این مواد طبیعی جهت بهبود و تحریک فعالیت سیستم غیر اختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماریزا در صنعت آبزی‌پروری افزایش یافته است (Esteban, 2012). محصولات گیاهی به‌دلیل وجود برخی ترکیبات از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، کارتنوئیدها، ترپن و روغن‌های ضروری و...) جهت درمان بیماری‌های مختلف و تقویت سیستم ایمنی تجویز می‌شوند. فرآورده‌های گیاهی شناخته شده به‌دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نقش مهمی در کنترل بیماری‌ها دارند (Citarasu *et al*., 1998).

موفقیت‌های زیادی در استفاده از گیاهان دارویی به‌جهت بهبود عملکرد سیستم ایمنی غیر اختصاصی در آبزیان حاصل شده است که یکی از این گیاهان دارویی که دارای ترکیبات ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد گیاه بومادران است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که تجویز عصاره بومادران در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به‌ویژه در غلظت‌های ۱۰۴ و ۲۰۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن ماهی می‌تواند از افزایش بار باکتریایی و عفونت عمومی باکتریایی در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت کشنده ۵۰ درصدی باکتری آئروموناس هیدروفیلا پیشگیری نماید (Banaee *et al*., 2016). همچنین عصاره گیاهی بومادران در رژیم غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss*) سبب بهبود فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون نظیر کلسترول، تری‌گلیسیرید، آلبومین، توتال پروتئین

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

و گلوکز شد (Nafisi Bahabadi *et al*., 2014). بافت‌های مخاطی پوست، روده و آبشش با لایه موکوسی خود و مجموعه‌ای از عوامل دفاعی غیر اختصاصی به‌عنوان یک سد اولیه در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشند (Dalmo *et al*., 1997). خاصیت دفاعی ایمنولوژیکی مخاط پوست، مهم‌ترین بخش از سیستم ایمنی بدن ماهی می‌باشد (Zhao *et al*., 2008). موکوس پوست ماهی به‌عنوان یک مخزن بیولوژیکی متشکل از مواد فعال و مولکولهای ایمنی متعدد از جمله لیزوزیم، پروتئین‌ها، ایمنوگلوبین‌ها، آنزیم‌ها، لکتین و غیره می‌باشد (Alexander and Ingram, 1992; Rombout *et al*., 1993; Subramanian *et al*., 2007; Subramanian *et al*., 2008; Palaksha *et al*., 2008). خاصیت ضدمیکروبی موکوس و در نتیجه بهبود عملکرد ایمنی در گونه‌های مختلف ماهی گزارش شده است (Ellis, 2001; Nagashima *et al*., 2003; Chinchar *et al*., 2004; Kuppulakshmi *et al*., 2008). محرک‌های ایمنی مختلف به‌جهت تحریک سیستم ایمنی ذاتی ماهی در آبزی‌پروری به‌کار برده می‌شوند. برخی از آنها موجب تحریک لیزوزیم و پاسخ آنتی‌بادی ماهی می شوند (Sakai, 1999). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به‌کارگیری عصاره بومادران میزان فعالیت لیزوزیم را به‌ویژه در ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی عصاره بومادران در سطح ۴ گرم در کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در برخی مطالعات افزایش میزان لیزوزیم در سرم خون ماهی هامور (*Epinephelus bruneus*) تغذیه شده با بتاگلوکان قارچ (به‌مدت ۳۰ روز) و همچنین افزایش میزان لیزوزیم و ایمونوگلوبین موکوس پوست ماهی کپور تغذیه-شده با عصاره خرما (به‌مدت ۸ هفته) و پودر گیاه فرولا (*Ferula assa foetida*) (به‌مدت ۸ هفته) گزارش شده است (Harikrishnan *et al*., 2011; Harikrishnan *et al*., 2012; Chang *et al*., 2013; Hoseinifar *et al*., 2015; Safari *et al.,* 2016). لیزوزیم یک آنزیم ضد باکتری می‌باشد که به‌طور مستقیم بر باکتری گرم مثبت (از طریق لایه پپتیدوگلیکان داخلی باکتری‌های گرم منفی) با اختلال در فعالیت آنزیم‌ها وارد عمل می‌شود (Yano, 1996). سلول‌های جامی شکل اپیدرم ماهیان با ترشح گلیکوپروتئین‌ها ماهی را در برابر عوامل بیماری‌زا حفظ می‌کنند. این پروتئین‌ها به‌همراه سایر فاکتورهای موکوس نقش آگلوتینه کردن عوامل بیماری‌زا را ایفا می‌کنند (Suzuki *et al*., 2003). اگرچه نتایج حاصل از بررسی ایمونوگلوبولین در این مطالعه اختلافی بین تیمارهای آزمایشی و شاهد را نشان نداد اما در میزان ایمونوگلوبولین کل موکوس در تیمارهای تغذیه شده با ۴ گرم در کیلوگرم عصاره گیاه بومادران یک روند افزایشی مشاهده شد. نقش احتمالی ایمنولوژیکی پروتئازها در سیستم ایمنی پستانداران توسط موریسی (Morrissey, 1998) و برخی گونه‌های ماهیان توسط پالاکشا و همکاران (Palaksha et al., 2008) به‌خوبی مشخص شده است. پروتئازها می‌توانند به‌طور مستقیم توسط شکستن پروتئین‌های باکتری عوامل بیماری‌زا را نابود کنند و یا به‌طور غیرمستقیم با تغییر غلظت موکوس منجر به افزایش ترشح موکوس و جدا شدن متوالی آن از بدن شده که باعث حذف پاتوژن از

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

سطح بدن می‌شوند. پروتئازها همچنین درفعال‌سازی یا افزایش تولید سایر اجزای سیستم ایمنی ذاتی موکوس مانند ایمنوگلوبولین‌ها نقش دارند (Aranishi *et al*., 1998). بنابراین به‌نظر می‌رسد پروتئازها به‌عنوان یک عامل دفاعی در موکوس ماهی جهت حفاظت در برابر عفونت ایفای نقش می‌کنند. در بررسی‌های انجام‌شده در مطالعه حاضر بالاترین میزان فعالیت پروتئاز موکوس در سطح ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره بومادران مشاهده شد. در صورتی‌که بین تیمار تغذیه‌شده با عصاره گیاهی ۲ گرم و شاهد اختلاف معناداری مشاهده نشد. TNF-alfa واسطه اصلی پاسخ التهابی حاد به باکتری‌های گرم منفی و سایر میکروب‌های بیماری‌زاست و مسئول بسیاری از اختلالات سیستمیک عفونت‌های شدید می‌باشد. در مطالعه حاضر بیان این ژن با افزایش سطح عصاره در غذا افزایش معنی‌داری را نشان داد. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در تغذیه تکمیلی با گیاهان و عصاره‌های آنها نشان داده شده است. افزایش بیان ژن‌های لیزوزیم، TNF-alfa و IL-1 در مطالعه نوتاش و همکاران (Nootash *et al.,* 2013) در افزودن چای سبز به غذای قزل‌آلای رنگین‌کمان، حسینی‌فر و همکاران (Hoseinifar *et al.,* 2015) در بکارگیری عصاره خرما در تغذیه ماهی کپور، لیزوزیم، NF-alfa، IL-1، IL-8 در مطالعه صفری و همکاران (Safari *et al.,* 2016) در تغذیه ماهی کپور با آنغوزه مشاهده شده و این نتایج به مواد مؤثره موجود در این گیاهان جهت افزایش ایمنی نسبت داده شده است.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از عصاره گیاهی بومادران به‌ویژه در سطح ۴ گرم در کیلوگرم غذا در جیره غذایی لارو ماهی قرمز منجر به بهبود برخی شاخص-های ایمنی موکوس و همچنین بیان ژن TNF-alfa شده است. به‌نظر می‌رسد گیاه بومادران می‌تواند به‌عنوان یک محرک ایمنی طبیعی در جیره غذایی ماهیان در پیش‌گیری از عوامل استرس‌زا و بروز بیماری‌ها عمل کند و استفاده از این گیاه به‌منظور افزایش ایمنی غیراختصاصی و به‌عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا پیشنهاد می‌گردد.

منابع

Alcaraz M.J., Ferrandiz M.L. 1987. Modification of arachidonicmetabolism by flavonoids. Journal of Ethnopharmacology, 21(3): 209-29.

Alexander J.B., Ingram G.A. 1992. Noncellular nonspecific defencemechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases, 2: 249-279.

Alishahi M. 2011. Effect of dieatary (*Silybum marianum*) extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research, 66(3): 255-263.

Aly S.M., Mohamed M.F. 2010. (*Echinacea purpurea*) and (*Alliums ativum*) as immuno stimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 94: 31–39.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

Aranishi F., Mano N., Nakane M., Hirose H. 1998. Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. Fish Physiology and Biochemistry, 19: 197-203.

Banaee M., Nematdoost Haghi B., Mohiseni M., Gholizade B. 2016. The effect of Yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract on blood biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Aqua EcoSystems, 5(3): 89-101.

Caballero M.J., Obach A., Rosenlund G., Montero D., Gisvold M., Izquierdo M.S. 2002.Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 214: 253-271.

Chang C.S., Huang S.L., Chen S., Chen S.N. 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, Epinephelus coioides, aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 35: 115-125.

Chinchar V.G., Bryan L., Silphadaung U., Noga E., Wade D., Rollins Smith L. 2004. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. Virology, 323(2): 268–275.

Citarasu T., Immanuel G., Marian M.P. 1998. Effects of feeding Artemia enriched with stresstol and cod liveroil on growth and stress resistance in the Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) post larvae. Asian Fisheries Science, 12: 65–75.

Csupor-Loffler B., Hajdu Z., Zupko I., Rethy B., Falkay G., Forgo P. 2009. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoidsfrom *Achillea millefoliums*.l. on cultured human tumour cell lines. Phytotherapy Research, 23(5): 672-6.

Dalmo R.A., Ingebrigtsen K., Bogwald J. 1997. Non-specific defence mechanismsin fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases, 20: 241–273.

Ellis A.E .2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology, 25(8-9): 827–839.

Esteban M.A. 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. International Scholarly Research Network. pp: 1-29.

Gu M., Ma H., Mai K., Zhang W., Bai N., Wang X. 2011. Effects of dietary β-glucan, mannan oligosaccharideand their combinations on growth performance, immunity and resistance against Vibrio splendidus of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology, 31(2): 303-309.

Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.S. 2011. Diet enriched with mushroom Phellinus linteus extract enhances the growth , innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, (*Epinephelus bruneus*) against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology, 30: 128-134.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.S. 2012. Effect of Inonotus obliquus enriched diet on hematology, immune response and disease protection in kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) against *Vibrio harveyi*. Aquaculture, 344-349: 48-53.

Hasan Nataj Niazi E., Imanpoor M.R., Zad Majid V., Taghizade V. 2013. The effect of density on the growth and survival in gold fish (*Carassus auratus*). Journal of Reproduction Sience and Aquaculture, 2: 33-44.

Hosseini M., Miandare H.K., Hoseinifar S.H., Yarahmadi P. 2016. Dietary *Lactobacillus acidophilus* modulated skin mucus protein profile, immune and appetite genes expression in gold fish (*Carassius auratus*). Fish and Shellfish Immunology, 59: 149-154.

Hoseinifar S.H., Khalili M., Rufchaei R., Raeisi M., Attar M., Cordero H., Angeles Esteban M. 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 Immunology, 47: 706-711.

Innocenti G., Vegeto E., Dall'Acqua S., Ciana P., Giorgetti M., Agradi E. 2007. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. International Journal of Phytomedicine, 14(2-3): 147-52.

Kuppulakshmi C., Prakash M., Gunasekaran G., Manimegalai G., Sarojini S. 2008. Antibacterial properties of fish mucus from (*Channa punctatus*) and (*Cirrhinusm rigala*). European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 12(3): 149–153.

Liu B., Xu L., Ge X., Xie J., Xu P., Zhou O., Pan L., Zhang Y.Y. 2013. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under Aeromonas hydrophila infection. Fish and Shellfish Immunology, 34(6): 1395-1403.

Magdelin SM. 2005. Culture of ornamental fish, Black molly (*Poeciliasphenops*) using medicinal plantshaving immunostimulant characteristics. M.Phil Dissertation, Manonmaiam Sundaranar University, India.

Magiatis P., Skaltsounis A.L., Chinov I., Haroutounian S.A. 2002. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of three greek *Achillea* species. Zeitschrift fur Naturforschung, 57: 287-90.

Minomol M. 2005. Culture of Gold fish (*Carassius auratus*) using medicinal plants having immunostimulant characteristics. M.Phil Dissertation, MS University, India.

Morrissey J.H. 1998. Coagulation factors VIIa. In: Barrett AJ,Rawlings ND, Woessner JF (Eds.). Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press, pp. 3-161.

Nafisi Bahabadi M., Banaee M., Taghiyan M., Nematdoust Haghi B. 2014. Effects of dietary administration of yarrow extract on growth performance and blood

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). International Journal of Aquatic Biology, 1: 275-285.

Nagashima Y., Kikuchi N., Shimakura K., Shiomi K. 2003. Purification and characterization of an antibacterial proteinin the skin secretion of rockfish *Sebas tesschlegeli*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 136(1): 63–71.

Nootash S., Sheikhzadeh N., Baradaran B., Oushani A.K., Moghadam M.R.M. 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 35(6): 1916-1923.

Palaksha K.J., Shin G.W., Kim Y.R., Jung T.S. 2008. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Fish and Shellfish Immunology, 24(4): 479– 488.

Pfaffl M.W., Horgan G.H., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group wide comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30: 29- 36.

Rahnama B., Akrami R., Chitsaz H. 2013. Effect of inulin prebiotic on growth performance, survival, body composition and resistance to stress in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). Journal of Reproduction Sience and Aquaculture, 2: 55-70.

Rombout J.H.W.M., Taverne N., van de Kamp M., Taverne Thiele A.J. 1993. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio*). Developmental and Comparative Immunology, 17(4): 309-17.

Safari R., Hoseinifar S.H., Nezhadmoghadam S.H., Jafar Node A. 2016. Transciptomic 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, 55: 242-248.

Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172: 63–92.

Sivaram V., Babu M.M., Citarasu T., Immanuel G., Murugadass S., Marian M.P. 2004. Growth and immuneresponse of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principlesupplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aquaculture, 237: 9–20.

Siwicki A.K., Anderson D.P. 1994. Lmmunoglobul in levels in fish sera measured by polyethylene glycol and spectrophotometric methods in microtiter plates. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Kaattari SL, Rowley AF (Eds.). Techniques in Fish Immunology III. SOS Publications, Fair Haven, N J, pp. 1-27.

Subramanian S., MacKinnon S.L., Ross N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148(3): 256–263.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

Subramanian S., Ross N.W., MacKinnon S. L. 2008. Comparison of the biochemical composition of normal epidermal mucus and extruded slime of hagfish (*Myxine glutinosa* L.). Fish and Shellfish Immunology, 25(5): 625–632.

Suzuki Y., Tasumi S., Tsutsui S., Okamoto M., Suetake H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, 136(72): 3-30.

Taylor A., Francis M. 2001. Final report on the safety assessment of Yarrow (*Achillea Millefolium*) extract. International Journal of Toxicology, 20(2): 79-84.

Vesogh G.H., Mostageer B. 1995. Freshwater Fishes. Tehran University Press, Iran. 317P.

Windisch W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A. 2008. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. Journal of Animal Science, 86: 140-148.

Yano T. 1996. The non-specific immune system: humoral defense. In: Iwama G., Nakanishi T. (Eds.). The Fish Immune System: Organism, Parhogen, and Environment. San Diego. pp: 105–156.

Zhao X., Findly R.C., Dickerson H.W. 2008. Cutaneousantibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. Developmentaland Comparative Immunology, 32 (5): 500–508.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2026-05-13]