اثرات به‌کارگیری عصاره هیدرو الکلی آنغوزه در جیره بر بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی و رشد در ماهی گوره‌خری (*Danio rerio*)

فاطمه واحدی[۱]، رقیه صفری *[۱]، علی شعبانی[۱]، حسین حسینی فر[۱]، حامد کلنگی میاندره[۱]

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، صندوق پستی: ۳۸۶

تاریخ دریافت: ۱۸ اردیبشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۴ شهریور ۱۳۹۶

چکیده

در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدرو الکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD) و رشد (IGF1 و GH) در ماهی گوره‌خری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی گوره‌خری با میانگین وزنی حدود ۰/۳±۰/۰۱ گرم در ۴ تیمار غذایی در ۳ تکرار با جیره‌ی غذایی پایه همراه با عصاره آنغوزه با دزهای ۲٪، ۱٪ و ۰/۵٪ به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. سپس از کبد و مغز نمونه‌برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Reverse-Transcriptase استفاده‌شده و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن‌های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) و آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD) و ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد نتایج نشان داد که به‌کارگیری عصاره آنغوزه در جیره غذایی بیان ژن‌های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) و آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD) را نسبت به گروه شاهد افزایش داد و این افزایش بیان در تیمارها از روند وابسته به دز تبعیت می‌کرد. به‌طوری‌که بالاترین میزان بیان در تمامی ژن‌های موردبررسی در تیمار ۲٪ عصاره مشاهده شد. با توجه به افزایش بیان ژن‌های مرتبط به نظر می‌رسد استفاده از عصاره آنغوزه می‌تواند در بهبود عملکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی و رشد در ماهی گوره‌خری کمک نماید.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، رشد، ماهی گوره‌خری، آنغوزه.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). rsafari@gau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گسترش آبزی‌پروری در طی ۱۰ سال گذشته، آبزیان را به‌عنوان یک منبع پروتئینی حیوانی مهم در سراسر جهان تبدیل کرده است (Martinez *et al.*, 2016) که این مقوله خود نیازمند افزایش تراکم بوده و به دنبال آن کاهش کیفیت آب و خطر ابتلا به بیماری‌های عفونی را همراه دارد. استفاده از گیاهان دارویی در تمام بخش‌های آبزی‌پروری نه‌تنها باعث افزایش تولید می‌شود بلکه موجب افزایش ایمنی و کیفیت محصولات نیز شده و درنتیجه افزایش مصرف محصولات آبزی را در سرتاسر جهان به دنبال خواهد داشت. ازآنجایی‌که هدف نهایی فعالیت‌های آبزی‌پروری، افزایش بازده تولید در جهت به حداکثر رساندن سوددهی می‌باشد (Denev, 2009)، در راستای این هدف و جهت بهبود مدیریت آبزی‌پروری نیاز به یک روش مطمئن و ارزان‌قیمت احساس می‌شود (Hulata, 2004). گیاهان دارویی می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین بالقوه برای آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها باشند که به‌طور مکرر در آبزی‌پروری جهت کنترل و پیش‌گیری از بیماری مورداستفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این بسیاری از این گیاهان دارای اثرات مطلوبی بر ماهی ازجمله ارتقاء رشد، افزایش وزن، تحریک اشتها، ضد استرس، ضد عفونت و بهبود عملکرد تولیدمثل می‌باشند (Harikrishnan *et al.*, 2011؛ وشتانی و همکاران،۱۳۹۳؛ قاسم پور دهاقانی و همکاران، ۱۳۹۲). در سال‌های اخیر با توجه به اثرات مفید گیاهان دارویی بر انسان، مطالعات متعددی در خصوص اثر گیاهان دارویی بر بهبود عملکرد رشد و افزایش بقا در آبزیان مختلف صورت گرفته است که می‌توان به افزایش آنزیم‌های هضمی و تحریک عبور غذا از دستگاه گوارش و افزایش اشتها در ماهی طلایی تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی گیاه آلوئه‌ورای خوراکی (Ahilan *et al.*, 2010)، تغذیه ماهی فلاندر با جیره غذایی حاوی مخلوط گیاهان دارویی (*Massa medicata fermentata, Crataegi fructus, Artemisia capillaries, and Cnidium officinale* Seung-Cheol *et al.*, 2007)، تغذیه ماهی هامور با جیره غذایی حاوی گیاهان دارویی علف دوروا (*Cynodon dactylon*)، فلفل بلند (*Piper longum*)، شب‌تاب (*Gynura procumbens*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) (Punitha *et al.*, 2008) و استفاده از ۶ گیاه دارویی در جیره غذایی میگوی پا سفید (Lin et al., 2006) اشاره نمود.

آنغوزه بانام علمی *Ferula assafoetida* گیاهی متعلق به تیره چتریان بوده و خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی، آنتی‌ویروسی، ضد سرطانی آن به دلیل ترکیباتی نظیر اسیدگالبانیک، آمبلی‌فرون، لیمونن، فلاونوئید ثابت‌شده است. آلفاپینن ولیمونن که از ترکیبات مؤثر آنغوزه هستند، دارای اثر تحریک‌کنندگی بر سلول‌های کشندهٔ طبیعی بوده و لنفوسیت‌ها را از طریق بیان CD69 فعال می‌کنند (Kedzia *et al.*, 1998). کومارین‌های سیس‌کوئی ترپن‌دار(اسید گالبانیک وآمبلی‌فرون) موجود در آنغوزه دارای اثر تحریک‌کنندگی بر پاسخ ایمنی سلولی هستند (Egan *et al.*, 1990) ترکیبات فلاونوئیدی چون لوتئولین، اسید فرولیک، پینن، آمبلی‌فرون در اندام‌های هوایی گیاه آنغوزه وجود دارد که این ترکیبات فلاونوئیدی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی هستند (Dehpour *et al.*, 2009; Kavoosi and Rowshan, 2013). اثر مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از پودر گیاه دارویی آنغوزه در جیره جوجه های گوشتی بر رشد، ایمنی هومورال و سلولی و جمعیت لاکتوباسیل‌های روده‌ای اثبات‌شده است (شادمانی و همکاران، ۱۳۹۴). Safari و همکاران (۲۰۱۶) افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی، رشد و آنتی‌اکسیدانی را در جیره حاوی پودر گیاه آنغوزه در ماهی کپور مشاهده نمودند. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت زدایی کبد در موش‌های دریافت‌کننده آنغوزه توسط Mallikarjuna و همکاران (۲۰۰۳) اثبات‌شده است. افزایش رشد و بازدهی همراه با پیش‌گیری و کنترل بیماری در مزارع آبزی‌پروری یکی از استراتژی‌های مدیریتی است و با توجه به آن‌که استفاده از مواد آنتی‌بیوتیکی در بسیاری از کشورها محدودشده است، لذا استفاده از مکمل‌های غذایی طبیعی ازجمله گیاهان دارویی به‌عنوان محرک رشد و سیستم ایمنی سازگاربامحیط‌زیست که بتواند اثرات مطلوب ایجاد نماید یکی از ضرورت‌ها در بحث مدیریت بهداشتی مزارع آبزی‌پروری است. ازآنجاکه تاکنون مطالعه‌ای درزمینه اثرات عصاره آبی الکلی گیاه آنغوزه بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد و آنتی‌اکسیدانی در ماهی گوره‌خری (*Danio rerio*) به‌عنوان یک‌گونه مدل انجام‌نشده است مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیر این محرک بر پارامترهای مذکور بر این ماهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری آبی الکلی

عصاره گیری آبی الکلی با استفاده از افزودن g ۲۰ پودر گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) و ۴۰۰میلی‌لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد. بدین منظور مخلوط آماده‌شده باگذشت زمان موردنظر محتویات موجود در ارلن را از روی چند گاز استریل عبور داده شد تا رسوبات از عصاره جدا و محلول صاف‌شده را با کاغذ صافی والتمن صاف و به یک بشر ضدعفونی شده منتقل نموده و با دستگاه روتاری حلال موجود را حذف کردیم. برای به دست آوردن عصاره پودر خشک، عصاره صاف‌شده، در دستگاه خشک‌کن انجمادی به پودر خشک تبدیل شد، عصاره حاصله تا زمان آزمایش در ۴ درجه نگهداری شد Arabshahi and Urooji, (2007).

تیمار بندی و نمونه‌برداری

در این تحقیق به‌منظور تعیین اثر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره گیاهی انغوزه بر ایمنی غیراختصاصی ماهی زبرا در یک دوره ۶۰ روزه در شهریورماه سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی زبرا با میانگین وزنی ۰/۰۱۴ ± ۰/۲ گرم از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلا استان گلستان خریداری شد. در ابتدای آزمایش به مدت ۲ هفته جهت سازگاری ماهیان با شرایط پرورش و پس از اتمام دوره سازگاری به‌صورت تصادفی در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار توزیع شدند. سپس با جیره‌ی غذایی پایه همراه با عصاره آبی الکلی با دزهای ۲٪، ۱٪ و ۰/۵٪ به مدت ۸ هفته در۳ نوبت تغذیه شدند. پرورش در آکواریوم به حجم آب ۵۰ لیتر با تراکم ۵۰ قطعه در هر آکواریوم صورت گرفت. جهت حفظ کیفیت آب، روزانه دوسوم حجم آب آکواریوم تعویض و مدفوع ماهی از طریق سیفون کردن از محیط خارج شد. به‌منظور حفظ سطح اکسیژن محلول کافی

Archive of SID

www.SID.ir

در طول آزمایش از هوادهی با سنگ هوا استفاده شد. درجه حرارت (با استفاده از دماسنج)، اکسیژن و pH به‌طور هفتگی اندازه‌گیری و دمای آب بین ۲± ۲۶ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول بین ۱± ۷میلی‌گرم در لیتر، اسیدیته ۷ گزارش شد.

بیان ژن‌های رشد و آنتی‌اکسیدانی

در پایان دوره آزمایش از بافت کبد و مغز نمونه‌برداری انجام‌شده و بلافاصله در ازت مایع قرار داده شد و سپس تا شروع آزمایش به فریزر ۸۰- منتقل شد.

استخراج RNA، سنتز و بررسی cDNA سنتز شده

RNA کل از ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه بافت کبد (جهت مطالعه ژن‌های آنتی‌اکسیدانی) و مغز (ژن‌های مرتبط با رشد) هموژن شده با ازت مایع با استفاده از بیوزول و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (بیوفلاکس، بیوئیر کره) استخراج شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵درصد و فقدان آلودگی DNA ژنومی با استفاده از نسبت جذب در طول‌موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به‌دست‌آمده از دستگاه نانوفتومتر (IMPLEN-P100) انجام گرفت. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از کیت Reverse-Transcriptase انجام شد. cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. طراحی پرایمرها برای ژن‌های IGF1 و GH (مرتبط با رشد) و CAT و SOD (مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی) از روی توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) به‌ترتیب با کد دسترسی NM_131825.2، NM_001020492.2، AJ007505.1 و BC055516.1 با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام گرفت (جدول۱).

واکنش PCR کمی بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی‌شده برای ژن‌های مذکور و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین با کد دسترسی (NM_131031.1) توسط کیت سایبر شرکت فرمنتاز (فرانسه) در دستگاه iQ5 شرکت (BIO-RAD, USA) و با استفاده از نرم‌افزار بایورد iQ5 اپتیکال برای بافت‌های مغز و کبد در ۳ تکرار بیولوژیکی و ۳ تکرار تکنیکی در دمای بهینه برای پرایمر انجام شد. به‌منظور اطمینان از بهینه بودن شرایط qPCR، سری غلظت‌های مختلف (۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰ و ۱/۵۰) از نمونه‌های cDNA مخلوط از تیمارهای متفاوت از بافت‌های مذکور تهیه و با هر دو پرایمر هدف و رفرنس در ۳ تکرار تکثیر و منحنی استاندارد جهت تخمین کارایی (E) و تکرارپذیری آزمایش برای هر پرایمر ترسیم شد (Bustin *et al.*, 2009).

جدول۱- مشخصات پرایمرهای رشد و آنتی‌اکسیدانی مورداستفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (C°)	کاربرد
IGF1 q-PCRF	GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های رشد
IGF1 q-PCRR	CGTAGTCCTTCCCCGTATCA		
GH q-PCRF	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های رشد
GH q-PCRR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC		
SOD q-PCRF	GGGTGGCAATGAGGAAAG	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی
SOD q-PCRR	GCCCACATAGAAATGCACAG		
CAT q-PCRF	GCATGTTGGAAAGACGACAC	۵۸	سنجش کمی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی
CAT q-PCRR	GTGGATGAAAGACGGAGACA		
β- actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸	ژن خانه‌دار
β- actin q-PCRR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

Archive of SID

www.SID.ir

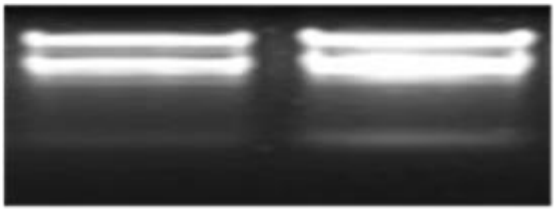
آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژن‌های مرتبط با رشد GH و IGF-1 نسبت به بتا اکتین با روش $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ با کمک نرم‌افزار REST (Pfaffl *et al.*, 2002) مورد آنالیز قرار گرفت و سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورداستفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌های مربوط به بیان نسبی ژن‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژن‌های مرتبط با رشد GH و IGF-1 نسبت به بتا اکتین در پایان دوره تغذیه با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت و آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارها استفاده شد. نمودارها با نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج

بررسی کیفی و کمی RNA

نتایج کیفی RNA استخراج‌شده از بافت مغز و کبد گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه در هر نمونه، دو باند rRNA ۱۸S و ۲۸S را با وضوح‌بالا نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت RNA استخراج‌شده از مغز و کبد ماهی گوره‌خری روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید. در نمونه‌های استخراج‌شده دوباند متعلق به rRNA ۱۸S و ۲۸S می‌باشند.

نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج‌شده در دو طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱ –۱/۸ قرار داشت و هم‌چنین میزان جذب در طول‌موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های موردبررسی بود.

بررسی cDNA سنتز شده

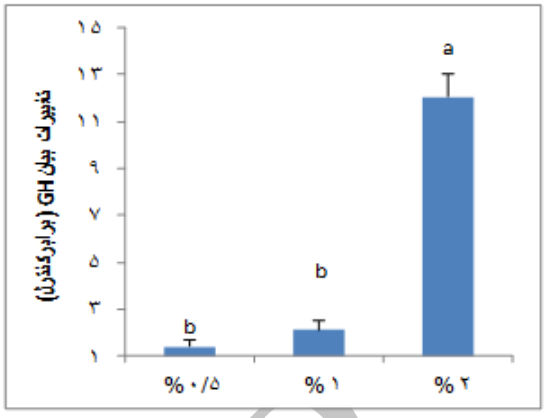
cDNA سنتز شده با پرایمر β -actin طراحی‌شده برای این‌گونه تست شد و مشاهده باند در ۲۱۶bp سنتز صحیح DNA را تائید نمود.

نتایج ارزیابی بیان ژن‌ها

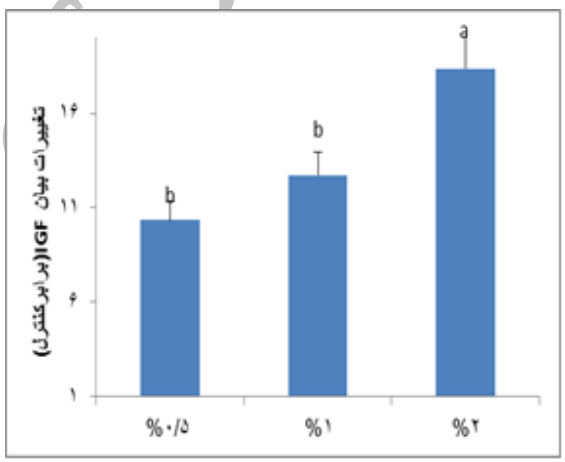
ارزیابی بیان ژن‌های (IGF-1 وGH) در این تحقیق نشان داد که تغذیه ماهی گوره‌خری با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه، بیان هر دو ژن مرتبط با رشد را در این‌گونه نسبت به گروه کنترل افزایش داد. بررسی الگوی بیان ژن‌های مذکور الگوی افزایشی وابسته به دزی را نشان داد. به‌طوری‌که در گروه تغذیه‌شده با ۲٪ ، ۱٪ و ۰/۵٪ عصاره هیدرو الکلی میزان بیان نسبی ژن GH به بتا اکتین به ترتیب ۱۲/۰۴، ۲/۱ و ۱/۴ برابر گروه کنترل بود و اختلاف معنی‌داری در میزان بیان در گروه تغذیه‌شده با۲٪ عصاره نسبت به دو گروه ۱٪ و ۰/۵٪ مشاهده شد (P<۰/۰۵). ژن IGF-1 نیز در گروه تغذیه‌شده با ۲٪ عصاره، افزایش ۲۸ برابری را نسبت به کنترل نشان داد که اختلاف معنی‌داری در این بیان ژن در این گروه نسبت به دو گروه تغذیه‌شده دیگر مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل۲ و۳).

Archive of SID

www.SID.ir

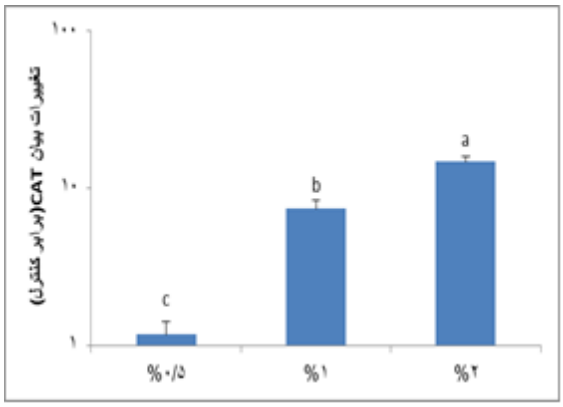


شکل۲- تغییرات بیان نسبی ژن GH به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

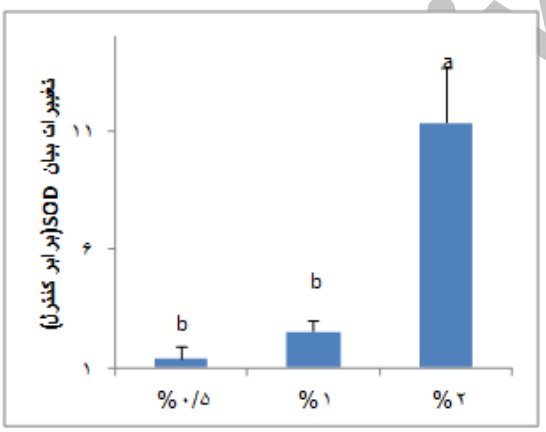


شکل۳- تغییرات بیان نسبی ژن IGF-1 به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

نتایج ارزیابی بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) در این تحقیق نیز افزایش بیان را در ماهیان گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه نشان داد. در ژن سوپراکسیددیسموتاز میزان بیان درگروه تغذیه‌شده با عصاره ۲٪ ، ۱۱/۳۷ برابر بیان نسبی بیشتری را نسبت کنترل نشان داد و اختلاف این گروه با دو گروه دیگر معنی‌داری را (P<۰/۰۵) نشان داد و بین دو گروه دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما ارزیابی بیان نسبی ژن کاتالاز اختلاف معنی‌داری در بیان سه گروه با یکدیگر نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان بیان نیز در گروه تغذیه‌شده با ۲٪ عصاره آنغوزه مشاهده شد (شکل۴ و ۵).



شکل۴- تغییرات بیان نسبی ژن کاتالاز (CAT) به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.



شکل۵-تغییرات بیان نسبی ژن سوپراکسیددیسموتاز(SOD) به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بحث

در طی دهه گذشته مطالعات زیادی در ارتباط با پتانسیل استفاده از گیاهان دارویی (کامل، بخشی از گیاه

www.SID.ir

و یا عصاره) در ایمنی، توانایی رشد و آنتی‌اکسیدان آبزیان صورت گرفته است (Safari *et al*., 2016). در این رابطه مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر به‌کارگیری عصاره هیدرو الکلی گیاه آنغوزه بر بیان ژن‌های رشد و آنتی‌اکسیدان در ماهی گوره‌خری انجام گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره هیدرو الکلی آنغوزه به جیره غذایی ماهی گوره‌خری منجر به افزایش بیان ژن‌های رشد GH و IGF نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین تیمار با میزان عصاره ۲٪ اختلاف معنی‌داری را نسبت به دو تیمار ۱٪ و ۰/۵٪ نشان داد. مطالعات مرتبط با تأثیر این گیاه بر رشد ماهیان تنها محدود به مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۶) بوده که افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد GH و IGF را با به‌کارگیری پودر گیاه آنغوزه در جیره غذایی ماهی کپور مشاهده نموده بودند و در رابطه با استفاده از عصاره این گیاه در هیچ‌گونه آبزی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. تجویز خوراکی آنغوزه در موش آلبینو برای ۸ هفته، افزایش فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و کموتریپسین را نشان داد (Faggio *et al*., 2014). به‌علاوه افزایش توانایی رشد در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با پودر آنغوزه به افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی نسبت داده شد (شادمانی و همکاران، ۱۳۹۴). افزایش شاخص‌های رشد در میگوی آب‌شیرین تغذیه‌شده با غذای حاوی سه گیاه برگ مسی کوتوله (*Alteranthera sessilis*)، کاسنی (*Eclipta alba*) و سیسوس (*Cissus hyquadrangularis*) (Radhakrishnan *et al*., 2014) ، در تیلاپیای نیل با مصرف جنسینگ آمریکایی، چای سبز و زردچوبه (Abdel-Tawwab, 2012)، کافیین در ماهی سی بریم (*Sparus aurata*) (Chatzifotis *et al*., 2008) به سبب افزایش آنزیم‌های گوارشی گزارش‌شده است.

مهم‌ترین آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی‌های شامل گلوتاتیون‌اس‌ترانسفراز، گلوتاتیون‌ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد (Devasagayam *et al*., 2004). نتایج مطالعات پیشین مشخص کرده است که فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط این آنزیم‌ها با حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در جیره غذایی تقویت می‌شود (Amar *et al*., 2004). ازاین‌روی طی سالیان اخیر مطالعات بسیاری در خصوص به‌کارگیری مکمل‌های غذایی و اثرات احتمالی آن‌ها بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی صورت پذیرفته است (Kasdallah-Grissa *et al*., 2007). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به‌کارگیری آنغوزه در جیره غذایی سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT) در ماهی گوره‌خری می‌گردد. در رابطه بامطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه آنغوزه بر آبزیان تنها مطالعه موجود، مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۶) می‌باشد که افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون‌پراکسیداز و گلوتاتیون‌ترانسفراز را مشاهده نمودند و در رابطه با ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز مطالعه‌ای صورت نگرفته است. همچنین در خصوص سایر مکمل‌های غذایی گیاهی نتایج مشابه‌ای گزارش‌شده است. هم‌راستا با این مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که به‌کارگیری عصاره خرما در جیره غذایی ماهی کپور سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌زدایی کبد در موش‌های دریافت‌کننده آنغوزه توسط Mallikarjuna,

Archive of SID

www.SID.ir

(2003) اثبات‌شده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه آنغوزه به ترکیبات فنلی و فلاونوییدی این گیاه نسبت داده شود. این ترکیبات با کاهش اکسیژن فعال، دهنده‌ای هیدروژنی و شلات‌کننده‌های فلزی فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را انجام می‌دهند (Dehpour et al., 2009; Kavoosi and Rowshan, 2013).

درمجموع با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان بیان داشت که استفاده از گیاه آنغوزه در جیره غذایی ماهی گورخری اثرات مثبتی بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد و دفاع آنتی‌اکسیدانی داشته است. به نظر می‌رسد سطح مناسب به‌کارگیری گیاه آنغوزه در جیره غذایی ۲ درصد باشد. اگرچه مطالعه حاضر یک تحقیق ابتدایی بوده و تعیین اثرات دقیق این مکمل غذایی بر سایر پارامترها و نیز مکانسیم اثرات احتمالی مستلزم انجام مطالعات بیشتری در آینده می‌باشد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. شادمانی، م.، باقر زاده کاسمانی، ف.، میرزایی، ح. ر. و مهری، ح.ر.، ۱۳۹۴. تأثیر پودر گیاه آنغوزه بر توانایی رشد، وضعیت ایمنی و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی. مجله علوم جانوری. ۴۶(۲)، ۱۱۸-۱۱۱.

۲. قاسم پور دهاقانی، پ.، جواهری بابلی، م.، ضیایی‌نژاد، س.، تقوی مقدم، ا.، پورفرهادی، م.، ۱۳۹۲ .بررسی اثر مکمل غذایی سین بیوتیک Biomin Imbo به‌عنوان مکمل غذایی بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی انگشت قد. نشریه توسعه آبزی‌پروری. ۸(۳)، ۹۳-۸۵.

۳. وشتانی، س.، عابدیان کناری، ع.م.، اکرمی، ر.، جیران، آ.، ۱۳۹۳ .اثر جیره‌های حاوی سین بیوتیک (ترکیب پروبیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک مانانالیگوساکارید) بر عملکرد رشد، بقاء و ترکیب لاشه میگوی جوان پا سفید غربی. نشریه توسعه آبزی‌پروری. ۷(۳)، ۴۳-۵۲.

4. Abdel-Tawwab, M., 2012. The use of American ginseng (*Panax quinquefolium*) in practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Growth performance and challenge with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Aquaculture, 24(4), 366-376.
5. Ahilan, B., Nithiyapriyatharshini, A., Ravaneshwaran, K ., 2010 . Influence of certain herbal additives on the growth, survival and disease resistance of Goldfish , *Carassius auratus* (Linnaeus). Veterinary and Animal Sciences, 6(1), 5-11.
6. Amar, E., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish & shellfish immunology, 16(4), 527-37.
7. Arabshahi, D.S., Urooji, A. 2007, Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica*) leaves. Food Chemistry, 102, 1233-1240.
8. Bustin, A.S., Benes, V., Garson, J.A., Healmans, J., Huggett, J., Kubista, M., Muller, R., Nolaan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum

Archive of SID
www.SID.ir

Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Expriments. Clinical Chemistry. 55(4), 611-622.
9. Chatzifotis, S., Kokou, F., Ampatzis, K., Papadakis, I.E., Divanach, P., Dermon, C.R., 2008. Effects of dietary caffeine on growth, body composition, somatic indexes, and cerebral distribution of acetyl-cholinesterase and nitric oxide synthase in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), reared in winter temperature. Aquaculture Nutrition, 14, 405-415.
10. Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Seyed Fazel, N., Seyed Mohammad, N, 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. Grasas y aceites, 60(4), 405-412.
11. Denev, S., Staykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. International Aquatic Research. 1: 1-29.
12. Devasagayam, T., Tilak, J., Boloor, K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. Journal of the Association of Physicians of India, 52, 794–804.
13. Egan, D., O'kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, R. D., 1990. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. Drug metabolism reviews, 22(5), 503-529.
14. Faggio, C., Piccione, G., Marafioti, S., Arfuso, F., Fortino, G., Fazio, F., 2014. Metabolic response to monthly variations of Sparus aurata reared in Mediterranean onshore tanks, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 567-574.
15. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture, 317-545.
16. Hoseinifar, S.H., Dadar, M., Khalili, M., Cerezuela, R., Esteban, M.Á., 2016. Effect of dietary supplementation of palm fruit extracts on the transcriptomes of growth, antioxidant enzyme and immune-related genes in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. Aquaculture Research, 48(7), 3684–3692.
17. Hulata, G., Cnaani, A., Slossman, T. and Graham, G.A.E., 2004. Fertility problems in the second generation of a four-species tilapia cross. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 56(3), 159-165.
18. Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May. M., Gharbi. N., Kamoun, A., El-Faza, S., 2007. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. Life sciences, 80, 1033–1039.
19. Kavoosi, G., Rowshan, V., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: effect of collection time. Food chemistry, 138(4), 2180-2187.
20. Kedzia, B., Jankowiak, J., Holonska, J., Krzyzaniak, M., 1998. Investigation of essential oils and components with immunostimulating activity. Herba polonica, 44, 126-135.
21. Lin, H. Z., Li, Z. J., Chen, Y.-Q., Zheng, W.-H., Yang, K., 2006. Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. Aquaculture, 253, 495-501.
22. Mallikarjuna, G., Dhanalakshmi, S., Raisuddin, S., Rao, A. R., 2003. 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, 81(1), 1-10.
23. Martínez, S.G.J., Castañeda, P.R., Guzmán, A.G., Sauceda, V.M.L., Castro, R.J.L., Acosta, H.M., 2016. Effects of the addition of a marigold extract to diets fed to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) on growth parameters. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 14, 797-804.
24. Pfaffl, M.W., Horgan, G.H., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for roup wide comparison and

Archive of SID

www.SID.ir

prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture International, 22, 551-572.
27. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Nejadmoghadam, S., Jafar, 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 & shellfish immunology, 55, 242-248.
28. Seung-Cheol, J., Gwan-Sik, J., Gwang-Soon, I.M., Si-Woo, L., Y., J.-H., Kenji, T., 2007. Dietary medicinal herbs improve growth performance, fatty acid utilization, and stress recovery of Japanese flounder. Fisheries Science, 73, 70-76.

statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res, 30 (9), 36.
25. Punitha, S.M.J., Babu, M.M., Sivaram, V., Shankar, V.S., Dhas, S.A., Mahesh, T.C., Immanuel, G., Citarasu, T., 2008. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in Grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture International, 16, 511–523.
26. Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R., Poongodi, R., 2014. nfluence of medicinal herbs (*Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth and biochemical parameters of the freshwater

Archive of SID

www.SID.ir