

اثرات به کارگیری عصاره هیدرو الکلی آنغوزه در جیره بر بیان ژن های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی و رشد در ماهی گوره خری (*Danio rerio*)

فاطمه واحدی^۱، رقیه صفری^{۱*}، علی شعبانی^۱، حسین حسینی فر^۱، حامد کلنگی میاندره^۱

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

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

چکیده

در این تحقیق تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدرو الکلی آنغوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانی (SOD و CAT) و رشد (IGF1 و GH) در ماهی گوره خری (*Danio rerio*) بررسی شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی گوره خری با میانگین وزنی حدود 0.3 ± 0.1 گرم در ۴ تیمار غذایی در ۳ تکرار با جیره غذایی پایه همراه با عصاره آنغوزه با دزهای ۱٪، ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. سپس از کبد و مغز نمونه برداری و استخراج RNA انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Reverse-Transcriptase استفاده شده و cDNA حاصله با استفاده از پرایمرهای ژن های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) و آنتی اکسیدانی (SOD و CAT) و ژن بتا اکتین به عنوان ژن رفرنس در Real Time PCR استفاده شد نتایج نشان داد که به کارگیری عصاره آنغوزه در جیره غذایی بیان ژن های مرتبط با رشد (IGF1 و GH) و آنتی اکسیدانی (SOD و CAT) را نسبت به گروه شاهد افزایش داد و این افزایش بیان در تیمارها از روند وابسته به دز تبعیت می کرد. به طوری که بالاترین میزان بیان در تمامی ژن های مورد بررسی در تیمار ۲٪ عصاره مشاهده شد. با توجه به افزایش بیان ژن های مرتبط به نظر می رسد استفاده از عصاره آنغوزه می تواند در بهبود عملکرد سیستم آنتی اکسیدانی و رشد در ماهی گوره خری کمک نماید.

کلمات کلیدی: آنتی اکسیدان، رشد، ماهی گوره خری، آنغوزه.

مقدمه

گسترش آبرزی پروری در طی ۱۰ سال گذشته، آبریان را به عنوان 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 بیماری های عفونی را همراه دارد. استفاده از گیاهان دارویی در تمام بخش های آبرزی پروری نه تنها باعث افزایش تولید می شود بلکه موجب افزایش ایمنی و کیفیت محصولات نیز شده و در نتیجه افزایش مصرف محصولات آبرزی را در سرتاسر جهان به دنبال خواهد داشت. از آنجایی که هدف نهایی فعالیت های آبرزی پروری، افزایش بازده تولید در جهت به حداکثر رساندن سوددهی می باشد (Denev, 2009)، در راستای این هدف و جهت بهبود مدیریت آبرزی پروری نیاز به یک روش مطمئن و ارزان قیمت احساس می شود (Hulata, 2004). گیاهان دارویی می توانند به عنوان یک جایگزین بالقوه برای آنتی بیوتیک ها و واکسن ها باشند که به طور مکرر در آبرزی پروری جهت کنترل و پیش گیری از بیماری مورد استفاده قرار می گیرند. علاوه بر این بسیاری از این گیاهان دارای اثرات مطلوبی بر ماهی از جمله ارتقاء رشد، افزایش وزن، تحریک اشتها، ضد استرس، ضد عفونت و بهبود عملکرد تولید مثل می باشند (Harikrishnan et al., 2011؛ وستانی و همکاران، ۱۳۹۳؛ قاسم پور دهقانی و همکاران، ۱۳۹۲). در سال های 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 آبریان مختلف صورت گرفته است که می توان به افزایش آنزیم های هضمی و تحریک عبور غذا از دستگاه

گوارش و افزایش اشتها در ماهی طلایی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی گیاه آلوئه ورا (Ahilan et al., 2010)، تغذیه ماهی فلاندر با جیره غذایی حاوی مخلوط گیاهان دارویی (*Massa medicata fermentata*, *Crataegi fructus*, *Artemisia Seung-*) (*capillaries*, and *Cnidium officinale*) (Cheol et al., 2007)، تغذیه ماهی هامور با جیره غذایی حاوی گیاهان دارویی علف دوروا (*Cynodon dactylon*)، فلفل بلند (*Piper longum*)، شب تاب (*Gynura procumbens*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) (Punitha et al., 2008) و استفاده از ۶ گیاه دارویی در جیره غذایی میگوی پافسید (Lin et al., 2006) اشاره نمود.

آنگوزه بانام علمی *Ferula assafoetida* گیاهی متعلق به تیره چتریان بوده و خواص آنتی اکسیدانی، آنتی باکتریایی، آنتی ویروسی، ضد سرطانی آن به دلیل ترکیباتی نظیر اسید گالبانیک، آمبلی فرون، لیمونن، فلاونوئید ثابت شده است. آلفاپینن و لیمونن که از ترکیبات مؤثر آنگوزه هستند، دارای اثر تحریک کنندگی بر سلول های کشنده طبیعی بوده و لنفوسیت ها را از طریق بیان CD69 فعال می کنند (Kedzia et al., 1998). کومارین های سیس کوئی ترین دار (اسید گالبانیک و آمبلی فرون) موجود در آنگوزه دارای اثر تحریک کنندگی بر پاسخ ایمنی سلولی هستند (Egan et al., 1990) ترکیبات فلاونوئیدی چون لوتئولین، اسید فرولیک، پینن، آمبلی فرون در اندام های هوایی گیاه آنگوزه وجود دارد که این ترکیبات فلاونوئیدی دارای خواص آنتی اکسیدانی بسیار بالایی هستند (Dehpour et al., 2009; Kavooosi and Rowshan, 2013). اثر مثبت

آماده شده با گذشت زمان موردنظر محتویات موجود در ارلن را از روی چند گاز استریل عبور داده شد تا رسوبات از عصاره جدا و محلول صاف شده را با کاغذ صافی والتمن صاف و به یک بشر ضد عفونی شده منتقل نموده و با دستگاه روتاری حلال موجود را حذف کردیم. برای به دست آوردن عصاره پودر خشک، عصاره صاف شده، در دستگاه خشک کن انجمادی به پودر خشک تبدیل شد، عصاره حاصله تا زمان آزمایش در ۴ درجه نگهداری شد Arabshahi and Urooji, (2007).

تیمار بندی و نمونه برداری

در این تحقیق به منظور تعیین اثر جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره گیاهی آنگوزه بر ایمنی غیر اختصاصی ماهی زبرا در یک دوره ۶۰ روزه در شهریورماه سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات آبی پروری شهید فضلای برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۶۰۰ قطعه بچه ماهی زبرا با میانگین وزنی 0.14 ± 0.2 گرم از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی واقع در شصت کلاستان گلستان خریداری شد. در ابتدای آزمایش به مدت ۲ هفته جهت سازگاری ماهیان با شرایط پرورش و پس از اتمام دوره سازگاری به صورت 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 در ۳ 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. به منظور حفظ سطح اکسیژن محلول کافی

استفاده از پودر گیاه دارویی آنگوزه در جیره جوجه های گوشتی بر رشد، ایمنی هومورال و سلولی و جمعیت لاکتوباسیل های روده ای اثبات شده است (شادمانی و همکاران، ۱۳۹۴). Safari و همکاران (۲۰۱۶) افزایش بیان ژن های مرتبط با ایمنی، رشد و آنتی اکسیدانی را در جیره حاوی پودر گیاه آنگوزه در ماهی کپور مشاهده نمودند. افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و سمیت زدایی کبد در موش های دریافت کننده آنگوزه توسط Mallikarjuna و همکاران (۲۰۰۳) اثبات شده است. افزایش رشد و بازدهی همراه با پیش گیری و کنترل بیماری در مزارع آبی پروری یکی از استراتژی های مدیریتی است و با توجه به آن که استفاده از مواد آنتی بیوتیکی در بسیاری از کشورها محدود شده است، لذا استفاده از مکمل های غذایی طبیعی از جمله گیاهان دارویی به عنوان محرک رشد و سیستم ایمنی سازگار با محیط زیست که بتواند اثرات مطلوب ایجاد نماید یکی از ضرورت ها در بحث مدیریت بهداشتی مزارع آبی پروری است. از آنجاکه تاکنون مطالعه ای در زمینه اثرات عصاره آبی الکلی گیاه آنگوزه بر بیان ژن های مرتبط با رشد و آنتی اکسیدانی در ماهی گوره خری (*Danio rerio*) به عنوان یک گونه مدل انجام نشده است مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیر این محرک بر پارامترهای مذکور بر این ماهی انجام شد.

مواد و روش ها

عصاره گیری آبی الکلی

عصاره گیری آبی الکلی با استفاده از افزودن ۲۰ g پودر گیاه آنگوزه (*Ferula assafoetida*) و ۴۰۰ میلی لیتر متانول ۶۰٪ تهیه شد. بدین منظور مخلوط

واکنش PCR کمی بعد از بهینه‌سازی دما و مواد مصرفی، در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از پرایمر qPCR طراحی شده برای ژن‌های مذکور و پرایمر ژن رفرنس بتا اکتین با کد دسترسی (NM_131031.1) توسط کیت سایبر شرکت فرمتاز (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. به منظور 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).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای رشد و آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')	اتصال دمای کاربرد (C°)
IGF1 q-PCR	GGCAGTGGTGTTCCTTGTC	۵۸
IGF1 q-PCR	CGTAGTCTCTCCCGTATCA	
GH q-PCR	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	۵۸
GH q-PCR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	
SOD q-PCR	GGGTGGCAATGAGGAAAG	۵۸
SOD q-PCR	GCCACATAGAAATGCACAG	
CAT q-PCR	GTCATGTTGGAAGACGACAC	۵۸
CAT q-PCR	GTGGATGAAAGACGGAGACA	
β -actin q-PCR	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	۵۸
β -actin q-PCR	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	

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 26 ± 2 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول بین 1 ± 7 میلی‌گرم 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 -80°C 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) همورژن 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 ۱/۵ درصد 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 گرفت. ساخت رشته اول cDNA با استفاده از کیت Reverse-Transcriptase انجام شد. cDNAهای سنتز شده تا شروع آزمایش‌ها در فریزر -20°C 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) به ترتیب با کد دسترسی NM_131825.2، NM_001020492.2، AJ007505.1 و BC055516.1 با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام گرفت (جدول ۱).

بروماید. در نمونه‌های استخراج شده دوباند متعلق به ۱۸S rRNA و ۲۸S می‌باشند.

نسبت شدت جذب در نمونه‌های RNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲/۱-۱/۸ قرار داشت و هم‌چنین میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۴۰ و ۳۲۰ نیز بیانگر قابلیت مناسب RNA در نمونه‌های مورد بررسی بود.

بررسی cDNA سنتز شده

cDNA سنتز شده با پرایمر β -actin طراحی شده برای این گونه تست شد و مشاهده باند در ۲۱۶bp سنتز صحیح DNA را تأیید نمود.

نتایج ارزیابی بیان ژن‌ها

ارزیابی بیان ژن‌های (IGF-1 و GH) در این تحقیق نشان داد که تغذیه ماهی گوره‌خری با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه، بیان هر دو ژن مرتبط با رشد را در این گونه نسبت به گروه کنترل افزایش داد. بررسی الگوی بیان ژن‌های مذکور الگوی افزایشی وابسته به دزی را نشان داد. به‌طوری‌که در گروه تغذیه شده 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 تغذیه شده با ۲٪ عصاره نسبت به دو گروه ۱٪ و ۰/۵٪ مشاهده شد ($P < 0/05$). ژن IGF-1 نیز در گروه تغذیه شده 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 تغذیه شده دیگر مشاهده شد ($P < 0/05$) (شکل ۲ و ۳).

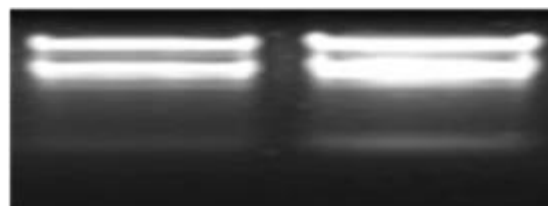
آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده جهت تعیین بیان نسبی ژن‌های آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و ژن‌های مرتبط با رشد GH و IGF-1 نسبت به بتا اکتین با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با کمک نرم افزار REST (Pfaffl et al., 2002) مورد آنالیز قرار گرفت و سپس نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف تست شد و آزمون لون نیز جهت بررسی برابری واریانس‌ها مورد استفاده 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 یک طرفه 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

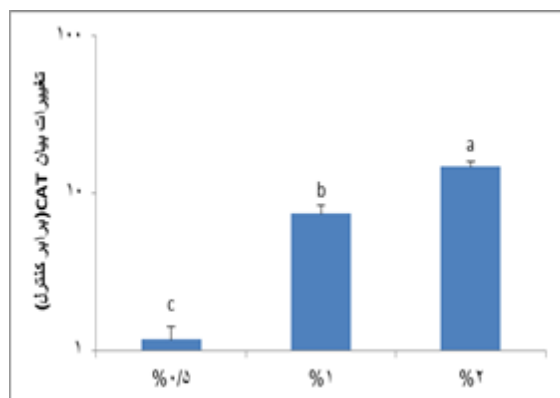
بررسی کیفی و کمی RNA

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

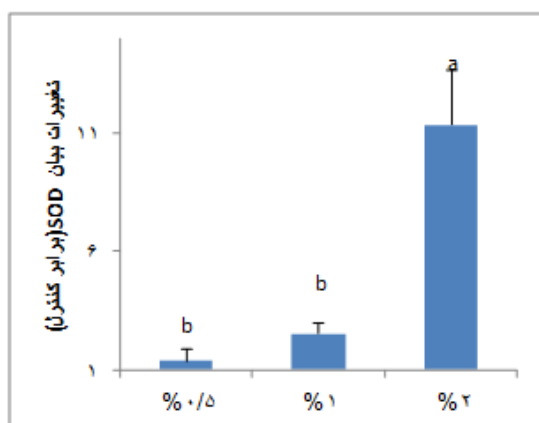


شکل ۱- کیفیت RNA استخراج شده از مغز و کبد ماهی گوره‌خری روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم

معنی‌داری مشاهده نشد. اما ارزیابی بیان نسبی ژن کاتالاز اختلاف معنی‌داری در بیان سه گروه با یکدیگر نشان داد ($P < 0/05$) و بیشترین میزان بیان نیز در گروه تغذیه‌شده با ۲٪ عصاره آنغوزه مشاهده شد (شکل ۴ و ۵).



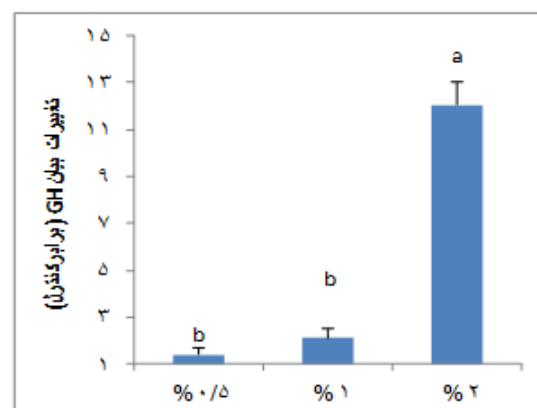
شکل ۴- تغییرات بیان نسبی ژن کاتالاز (CAT) به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.



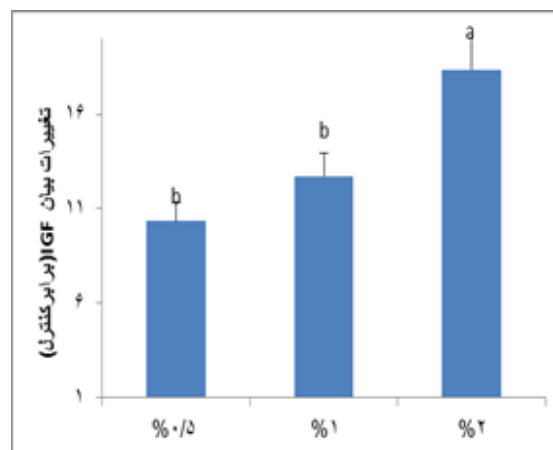
شکل ۵- تغییرات بیان نسبی ژن سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

بحث

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



شکل ۲- تغییرات بیان نسبی ژن GH به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.



شکل ۳- تغییرات بیان نسبی ژن IGF-1 به بتا اکتین در ماهی گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه. حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بین تیمارها را نشان می‌دهد.

نتایج ارزیابی بیان نسبی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز) در این تحقیق نیز افزایش بیان را در ماهیان گوره‌خری تغذیه‌شده با عصاره هیدرو الکلی آنغوزه نشان داد. در ژن سوپراکسید دیسموتاز میزان بیان در گروه 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 ($P < 0/05$) نشان داد و بین دو گروه دیگر اختلاف

و یا عصاره) در ایمنی، توانایی رشد و آنتی‌اکسیدان آبریان صورت گرفته است (Safari et al., 2016). در این رابطه مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر به کارگیری عصاره هیدرو الکلی گیاه آنگوزه بر بیان ژن‌های رشد و آنتی‌اکسیدان در ماهی گوره‌خری انجام گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره هیدرو الکلی آنگوزه 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 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 به کارگیری پودر گیاه آنگوزه در جیره غذایی ماهی کپور مشاهده نموده بودند و در رابطه با استفاده از عصاره این گیاه در هیچ‌گونه آبرزی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. تجویز خوراکی آنگوزه 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 آنگوزه 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 تیلاپای نیل با مصرف جنسینگ آمریکایی، چای سبز و زردچوبه (Abdel-Tawwab, 2012)، کافین در ماهی سی بریم (*Sparus aurata*) (Chatzifotis et al., 2008) به سبب افزایش آنزیم‌های گوارشی گزارش شده است. مهم‌ترین آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی‌های شامل گلوتاتیون‌اس ترانسفراز، 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 به کارگیری 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 به کارگیری آنگوزه در جیره غذایی سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT) در ماهی گوره‌خری می‌گردد. در رابطه با مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه آنگوزه بر آبریان تنها مطالعه موجود، مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۶) می‌باشد که افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ترانسفراز را مشاهده نمودند و در رابطه با ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز مطالعه‌ای صورت نگرفته است. همچنین در خصوص سایر مکمل‌های غذایی گیاهی نتایج مشابه‌ای گزارش شده است. هم‌راستا با این مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که به کارگیری 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 آنگوزه توسط Mallikarjuna,

و یا عصاره) در ایمنی، توانایی رشد و آنتی‌اکسیدان آبریان صورت گرفته است (Safari et al., 2016). در این رابطه مطالعه حاضر باهدف بررسی اثر به کارگیری عصاره هیدرو الکلی گیاه آنگوزه بر بیان ژن‌های رشد و آنتی‌اکسیدان در ماهی گوره‌خری انجام گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن عصاره هیدرو الکلی آنگوزه 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 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 به کارگیری پودر گیاه آنگوزه در جیره غذایی ماهی کپور مشاهده نموده بودند و در رابطه با استفاده از عصاره این گیاه در هیچ‌گونه آبرزی مطالعه‌ای صورت نگرفته است. تجویز خوراکی آنگوزه 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 آنگوزه 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 تیلاپای نیل با مصرف جنسینگ آمریکایی، چای سبز و زردچوبه (Abdel-Tawwab, 2012)، کافین در ماهی سی بریم

۱۳۹۲. بررسی اثر مکمل غذایی سین بیوتیک Biomin Imbo به عنوان مکمل غذایی بر عملکرد رشد، بازماندگی و فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی انگشت قد. نشریه توسعه آبی پروری. ۸(۳)، ۹۳-۸۵.

۳. وشتانی، س.، عابدیان کناری، ع.م.، اکرمی، ر.، جیران، آ.، ۱۳۹۳. اثر جیره های حاوی سین بیوتیک (ترکیب پروبیوتیک پروتکسین و پری بیوتیک مانانالیگوساکارید) بر عملکرد رشد، بقاء و ترکیب لاشه میگوی جوان پا سفید غربی. نشریه توسعه آبی پروری. 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

(2003) اثبات شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه آنگوزه به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی این گیاه نسبت داده شود. این ترکیبات با کاهش اکسیژن فعال، دهنده ای هیدروژنی و شلات کننده های فلزی فعالیت آنتی اکسیدانی خود را انجام می دهند (Dehpour et al., 2009; Kavooosi and Rowshan, 2013).

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان بیان داشت که استفاده از گیاه آنگوزه در جیره غذایی ماهی گورخری اثرات مثبتی بر بیان ژن های مرتبط با رشد و دفاع آنتی اکسیدانی داشته است. به نظر می رسد سطح مناسب به کار گیری گیاه آنگوزه 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 می باشد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

منابع

۱. شادمانی، م.، باقرزاده کاسمانی، ف.، میرزایی، ح. ر. و مهری، ح. ر.، ۱۳۹۴. تأثیر پودر گیاه آنگوزه بر توانایی رشد، وضعیت ایمنی و جمعیت میکروبی روده جوجه های گوشتی. مجله علوم جانوری. ۴۶(۲)، ۱۱۸-۱۱۱.
۲. قاسم پور دهقانی، پ.، جواهری بابلی، م.، ضیائینژاد، س.، تقوی مقدم، ا.، پورفرهادی، م.،

- 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 – Bamidgah*, 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. Kavooosi, 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., Saucedo, 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 rroup wide comparison and Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *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'kenedy, 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,

- prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture International, 22, 551-572.
27. Safari, R., Hoseinifar, S. H., Nejadmoghadam, S., 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, 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.
 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. Influence of medicinal herbs (*Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth and biochemical parameters of the freshwater