

اثر عصاره گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) بر ویژگی‌های ایمنی و برخی فاکتورهای خونی ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

سیده حمیده مجد محمدی^۱، حامد منوچهری^{۱*} و مهسا محمدی زاده خوشرو^۲ و صمد درویشی^۳

۱) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، گروه شیلات، بابل، ایران. * رایانامه نویسنده مسئول: hdmanuchehri@gmail.com

۲) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات، تهران، ایران.

۳) مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان استخوانی شهید انصاری، رشت، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۰۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۰۷

چکیده

طی پژوهشی ۶۰ روزه اثر عصاره گیاه گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) در جیره غذایی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) بر رشد، بقا و برخی از شاخص‌های ایمنی این گونه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار بررسی گردید که در آن درصد افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، افزایش وزن روزانه، ضریب چاقی و نرخ بقاء ماهی‌های پرورشی مورد مطالعه قرار گرفت. تیمارها شامل ۳ جیره غذایی به ترتیب حاوی سه سطح ۱/۵، ۱ و ۱/۵ درصد عصاره گیاه گل همیشه بهار همراه با تیمار شاهد در نظر گرفته شد. ۲۵۲ عدد ماهی قرمز با میانگین وزن اولیه 1 ± 0.5 گرم بدین منظور تهیه و پس از پایان دوره آزمایش تمامی آنها مورد زیست‌سنجی و خونگیری قرار گرفته و میزان هماتوکریت، متوسط حجم گلبولی، متوسط وزن هموگلوبین گلبولی، متوسط غلظت هموگلوبین گلبولی، هتروفیل، لنفوسیت و عامل مکمل به عنوان برخی از پارامترهای ایمنی غیراختصاصی اندازه‌گیری گردیدند. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزایش میزان این عصاره گیاهی در جیره پارامترهای رشد نیز افزایش یافته که البته این افزایش در هیچ یک از پارامترهای اندازه‌گیری شده و بین تیمارها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). میزان عامل مکمل نیز در تیمارهای حاوی عصاره بالاتر از گروه شاهد بوده ولی فاقد اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) با آن بود. به طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان‌دهنده اثر مثبت عصاره گل همیشه بهار در جیره غذایی ماهی قرمز بر پارامترهای ایمنی بوده که می‌تواند به عنوان یک محرک سیستم ایمنی قلمداد گردد.

واژه‌های کلیدی: *Calendula officinalis*، فاکتورهای رشد، بقا، پارامترهای خونی، *Carassius auratus*.

مقدمه

گزینه برای آبی‌پروری هستند. البته تداوم پرورش ماهی در کشورهای آسیایی توسط بیماری‌های باکتریایی، ویروسی، انگلی و تغییر پارامترهای محیطی

امروزه نگهداری ماهیان زینتی به یکی از پرطرفدارترین سرگرمی‌ها در جهان تبدیل شده است. کپور ماهیان در میان ماهیان آب شیرین سودمندترین

است. تاثیر محرک‌های ایمنی در آبزی‌پروری به عوامل متعددی مانند زمان، مقدار مصرف، روش اجرا و شرایط فیزیولوژیکی ماهیان بستگی دارد (Rijkers *et al.*, 1980).

تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره برخی از ترکیبات گیاهی مانند آویشن اروپایی سبب بروز فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های بهبوددهنده ایمنی، تحریک سیتوکینزهای مختلف و افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود (Boshra *et al.*, 2006). همچنین عصاره برخی از ترکیبات گیاهی و دارویی از اثرات ضدتوموری برخوردار بوده که این فرآیند از طریق افزایش فعالیت سیتوتوکسیک سلول‌های کشنده طبیعی و فعالیت لیمفوکین و ماکروفاژها صورت می‌پذیرد (Fast *et al.*, 2002). استفاده از ترکیبات گیاهی دارویی در جهت حفظ سلامت انسان به صورت سنتی در بسیاری از کشورها وجود داشته و در حال حاضر توسط سازمان‌های بین المللی شناخته شده است. علیرغم افزایش تمایل علمی به تحقیق در این زمینه، اطلاعات در مورد ترکیبات گیاهان دارویی، کاربردهای دارویی و خطرات اتصال ترکیبات آنها در هنگام ورود به بدن موجودات زنده محدود است. نتایج به دست آمده از منابع طبیعی نشان‌دهنده تجزیه این ترکیبات در محیط و قابلیت سازگاری زیستی آنها می‌باشد. تعدادی از مواد گیاهی استفاده شده مانند گلیسیریزین، آلوئه‌را، آزادیواکتین برای ارتقای ایمنی ماهی در برابر بیماری‌ها گزارش شده‌اند (Magnadottir, 2006).

پرورش متراکم ماهی موجب ایجاد محیطی استرس‌زا برای آنها شده که در نهایت سبب کاهش قدرت سیستم ایمنی بدن و انتقال عوامل بیماری‌زا به آن می‌شود. پرورش‌دهندگان برای جلوگیری از خسارت‌های مالی ناشی از بیماری‌ها باید بتوانند به اندازه کافی از بروز بیماری جلوگیری به عمل آورند.

به خطر می‌افتد (Karunasagar *et al.*, 1991). کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر داروهای شیمیایی جهت پیشگیری و درمان در سیستم‌های آبزی‌پروری متراکم به صورت گسترده‌ای به علت تاثیرات منفی آنها مانند تجمع زیستی در بافت‌ها و ایجاد مقاومت دارویی نفی شده است (Rijkers *et al.*, 1980). مایع کوبی در برابر برخی از عوامل بیماری‌زا نیز با درجات مختلفی از موفقیت در سال‌های اخیر توسعه یافته که میزان تاثیر آنها با توجه به وسعت سیستم‌های پرورش ماهی محدود می‌باشد (Robertsen, 1999). بنابراین نیازی ضروری برای جلوگیری از بیماری‌ها با افزایش دامنه تحمل ماهیان زینتی وجود دارد.

ارتقای ساز و کارهای دفاعی ماهیان یکی از بهترین روش‌های کنترل بیماری‌ها در آبزی‌پروری از طریق استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی است (Rao *et al.*, 2006). محرک‌های ایمنی به عنوان ترکیباتی برای افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی از طریق بهبود فرآیندهای دفاعی غیراختصاصی شناخته شده هستند. خطر بیماری‌ها و سطوح مقاومت به آنها می‌تواند از طریق استفاده از جیره‌های غذایی بهتر، مایه کوبی و کاربرد محرک‌های ایمنی افزایش پیدا کند (Chen & Ainsworth, 1992).

محرک‌های ایمنی مورد استفاده در سیستم‌های آبزی‌پروری شامل پپتیدهای شبه گلوکان، لورامیزول، کیتوزان و همچنین تعدادی از مشتقات گیاهی می‌باشند که با تاثیر مستقیم در فرآیندهای دفاعی داخلی روی گیرنده‌های سلولی عمل کرده و سبب فعالیت ژن‌هایی می‌شوند که نتیجه آن تولید مولکول‌های آنتی میکروبی است (Bricknell & Dalmo, 2005). محرک‌های ایمنی یکی از ابزارهای مفید در آبزی‌پروری بوده و در شرایطی به کار می‌روند که مایه کوبی و تیمار آبیان فرآیندی پرزحمت بوده و نیاز به تکرار تیمارهای دارویی آنها

مواد و روش‌ها

این آزمایش طی ماه‌های شهریور تا آبان ۱۳۹۰ در آزمایشگاه مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان کاشمر انجام شد. تعداد ۲۵۲ قطعه ماهی با وزن متوسط 1 ± 0.8 گرم جهت انجام آزمایش از کارگاه تولید ماهی قرمز در مجاورت آزمایشگاه تهیه و به محل انجام آزمایش انتقال داده شدند. عصاره گل همیشه بهار با ماده موثره ۹۵ درصد از شرکت باریج اسانس تهیه و با مقادیر صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا همراه با روغن مخلوط گردید. غذای آماده شده به این ترتیب پس از خشک شدن در یخچال نگهداری شد.

تعداد ۱۲ عدد آکواریوم به ابعاد $30 \times 40 \times 70$ سانتی‌متر (۳ تکرار برای هر تیمار) برای تیمار بندی استفاده شد. آکواریوم‌ها پس از شستشو به میزان ۴۰ لیتر آبگیری و هوادهی شدند تا کلرزدایی و اکسیژن‌رسانی به آنها انجام گیرد. ۳ عدد مخزن ۱۰۰ لیتری نیز برای کلرزدایی و ذخیره آب به منظور جایگزینی آماده شد، به طوری که آب تانک‌ها هر یک روز در میان تعویض می‌شد. یک عدد بخاری نیز درون تمامی آکواریوم‌ها و مخزن‌ها تعبیه شد تا دمای آب ثابت و مناسب برای ماهی قرمز باقی بماند. ماهیان به مدت دو هفته در این شرایط نگهداری و با استفاده از غذای تجاری شرکت بیومار فرانسه تغذیه شدند تا به طور کامل با شرایط کارگاه سازگار گردند.

تراکم ذخیره سازی معادل ۲۰ ماهی در هر آکواریوم بوده و طول دوره آزمایش برای ۸ هفته ادامه یافت. ماهیان آزمایشی روزانه در دو نوبت طی ساعات ۸ و ۱۵ به میزان ۵ درصد وزن بدن غذادهی شدند (نفیسی بهابادی، ۱۳۸۷). جمع‌آوری فضولات هر هفته توسط سیفون از کف آکواریوم‌ها انجام شد. همچنین عوامل مختلف فیزیکوشیمیایی از جمله درجه حرارت آب، اکسیژن محلول و pH هر هفته با

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی علاوه بر ایجاد مقاومت دارویی سبب آلودگی محیط و تجمع بقایای آنها در بافت می‌شود (Catherine et al., 2010). افزایش علاقه به نگهداری ماهیان آکواریومی سبب توسعه تجارت ماهیان زینتی در سطح جهان شده است. ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) نیز در شمار یکی از محبوب‌ترین ماهیان زینتی جهان بوده و دارای ارزش اقتصادی بالا در تجارت ماهیان زینتی است که به علت شکل بدن و باله، اندازه و رنگدانه‌های پوست به یکی از مهم‌ترین ماهیان زینتی در جهان تبدیل گردیده است (Gouveia et al., 2003).

تکثیر و پرورش ماهی قرمز به عنوان ماهی کوچک مورد نیاز سفره هفت سین نوروزی و برای علاقمندان به نگهداری آکواریوم چندین سال است که رونق یافته و نیاز به آن هر سال بیشتر می‌شود (ایمانپور و کمالی، ۱۳۸۵). سرسختی، مقاومت و زیبایی این ماهی باعث شده که روز به روز طرفداران بیشتری پیدا کرده و کارشناسان پرورش ماهی نژادهای جدیدی را با استفاده از علم ژنتیک و وراثت تولید کنند. حدود ۱۰۰ نوع ماهی طلایی به وجود آمده که فقط چند گونه از آنها به ایران وارد شده‌اند و تمام آنها با موفقیت تکثیر و پرورش یافته‌اند. به طور کلی موفقیت در تکثیر ماهی قرمز وابستگی بسیار زیادی به شرایط نگهداری مولدین در اسارت و فاکتورهای محیطی دارد و ماهیانی که در محیط آکواریوم یا دور از دوره نوری طبیعی نگهداری شوند نسبت به تزریق هورمون پاسخ بسیار ضعیفی از خود نشان می‌دهند (ایمانپور و کمالی، ۱۳۸۵).

هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی استفاده از عصاره گیاه همیشه بهار بر ویژگی‌های ایمنی ماهی قرمز بود. علاوه بر این تاثیر این عصاره گیاهی بر فاکتورهای خونی ماهی قرمز نیز بررسی شد.

از هر آکواریوم خارج و طول و وزن آنها پس از بی‌هوشی با ۲۰۰ قسمت در میلیون عصاره گل میخک ثبت گردید. تغذیه ماهیان ۲۴ ساعت قبل از زیست‌سنجی قطع گردیده بود. در ادامه پارامترهای رشد شامل درصد افزایش وزن بدن (PBWI)، نرخ رشد روزانه (DGR)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب چاقی (CF) و نرخ بقا (SR) به ترتیب زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

$$\text{Bekcan et al., 2006)} \quad \text{درصد افزایش وزن بدن} = \frac{(\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی})}{(\text{وزن اولیه})} \times 100$$

$$\text{(Hevroy et al., 2005)} \quad \text{نرخ رشد روزانه} = \frac{(\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی})}{\text{تعداد روزهای آزمایش}} \times 100$$

$$\text{(Desilva \& Anderson, 1995)} \quad \text{لگاریتم میانگین وزن اولیه} - \text{لگاریتم میانگین وزن نهایی} = \frac{\text{ضریب رشد ویژه}}{\text{دوره پرورش به روز}} \times 100$$

$$\text{(Ai et al., 2006)} \quad \text{ضریب چاقی} = \frac{\text{وزن}}{(\text{طول کل})^3} \times 100$$

$$\text{(Ai et al., 2006)} \quad \text{نرخ بقا} = \frac{\text{تعداد نهایی ماهیان}}{\text{تعداد اولیه ماهیان}} \times 100$$

تشکیل شد. میزان جذب نوری در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول ۳۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان C3 و C4 بر حسب میلی‌گرم بر دسی لیتر با مقایسه این مقدار با استاندارد کیت محاسبه گردید. تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC)، تعداد گلبول‌های قرمز خون (RBC)، شمارش تفریقی گلبول‌های سفید و میزان هماتوکریت (PCV) برای هر یک از نمونه‌های خونی طبق روش Danilova (۲۰۰۶) انجام شد. میزان هموگلوبین (Hb) به روش متسیانوهموگلوبین محاسبه و دیگر اندیس‌های گلبولی شامل متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، حجم متوسط گلبولی (MCV) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) بر اساس آن طبق روش وثوقی و همکاران (۱۳۷۳) به شرح زیر محاسبه شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های خام در این آزمایش با

استفاده از دستگاه (Water Cheker-U10, HURIBA, Japan) ثبت گردیدند. ماهیان تلف شده در طول دوره نیز جمع‌آوری و اطلاعات مربوطه ثبت گردید. زیست‌سنجی از ماهیان برای آگاهی از چگونگی رشد بچه ماهی‌ها یک بار در انتهای دوره انجام شد. تمام بچه ماهیان یک آکواریوم به این منظور جداگانه

همچنین شاخص‌های خون‌شناختی (Schaperclaus et al., 1991) و میزان فعالیت کمپلمان (Selvaraj et al., 2005) جهت ارزیابی اثر عصاره گل همیشه بهار در جیره برسیستم ایمنی ماهی قرمز بررسی شدند. خون از ماهی به این منظور بلافاصله بعد از بی‌هوشی با قطع ساقه دمی گرفته شده و در مجاورت پودر یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. برای این کار از تیوب‌های اپندروف فاقد ماده ضد انعقاد خون استفاده شد و سپس سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا گردید. برای اندازه‌گیری سطح سرمی کمپلمان‌های C3 و C4 از کیت مخصوص موسسه زیست فناوری Nanjing چین و روش کدورت سنجی ایمنی استفاده شد. C3 و C4 سرم با آنتی‌بادی مخصوص کیت مخلوط و ترکیب آنتی‌بادی-آنتی ژن

انجام گرفت. همچنین از آزمون دانکن جهت مقایسه میانگین شاخص‌های مورد مطالعه در ماهی‌های تیمارهای مختلف استفاده گردید.

کمک آنالیز واریانس یک طرف داده‌ها (One-way ANOVA) در سطح ۵ درصد جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها به کمک نرم افزار SPSS-9

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین } \times 100}{\text{هماتوکریت}}$$

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت } \times 10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}}$$

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین } \times 10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}}$$

نتایج

تحقیق مدونی در رابطه با خواص دارویی و محرک ایمنی گیاه گل همیشه بهار و دوز مصرف آن وجود ندارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) در شاخص‌های رشد ماهیان قرمز بین گروه‌های آزمایشی مختلف پس از پایان دوره آزمایشی وجود ندارد (جدول ۱). شایان ذکر است که اختلاف زیاد مشاهده شده در میزان انحراف معیار به علت اختلاف وزنی ماهیان بود که این مشکل با توزیع یکسان ماهی‌ها در اکواریوم‌ها و یکسان شدن میانگین وزن آنها مرتفع گردید. البته میزان بقا با افزایش میزان عصاره گیاه گل همیشه بهار در جیره غذایی به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). پایین‌ترین درصد بقا در گروه کنترل ($70/37 \pm 3/45$) و بالاترین درصد آن در گروه ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ($92/59 \pm 3/91$) مشاهده شد که این نتایج نشان‌دهنده تاثیر مطلوب و معنی‌دار ($p < 0.05$) عصاره گل همیشه بهار بر بقای ماهیان قرمز بوده و با نتایج مطالعات Cleulemans و همکاران (۲۰۰۹) مبنی بر نرخ بالای بقا در تیلاپیا نیل تغذیه شده با مکمل‌های غذایی حاوی عصاره‌های گیاهی همخوانی دارد.

نتایج حاصل از افزودن مقادیر صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم از عصاره گیاه گل همیشه بهار به جیره غذایی بر نرخ رشد ویژه، نرخ رشد روزانه، فاکتور وضعیت و درصد افزایش وزن بدن در جدول ۱ ذکر شده است. خاطر نشان می‌گردد مصرف غذا توسط ماهیان بسیار سریع بوده و غذایی در آب باقی نمی‌ماند. همچنین میانگین دما، اکسیژن و pH به ترتیب برابر ۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۷/۴ بود.

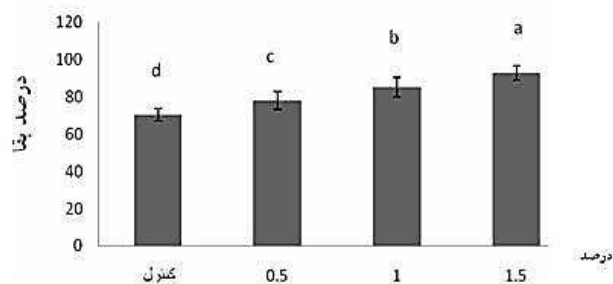
بحث و نتیجه‌گیری

گیاهان دارویی به عنوان محرک‌های ایمنی طی دو دهه اخیر جایگاه ویژه‌ای را در آبی‌پروری به خود اختصاص داده‌اند. نتایج به دست آمده از این پژوهش با نتایج تحقیقات Pakravan و همکاران (۲۰۱۲) هم‌خوانی دارد که با بررسی اثر عصاره بید علفی در رشد ماهی کپور گزارش کردند که این عصاره اثری بر رشد این ماهی نداشته است. Ji و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش کردند که تغذیه ماهی فلاندر با جیره حاوی عصاره‌هایی گیاهی اثری بر رشد این ماهی نداشته است. با توجه به بررسی‌های انجام شده،

جدول ۱. میانگین (\pm خطای استاندارد) پارامترهای رشد ماهی قرمز پس از افزودن عصاره گل همیشه بهار به هر کیلوگرم از جیره غذایی

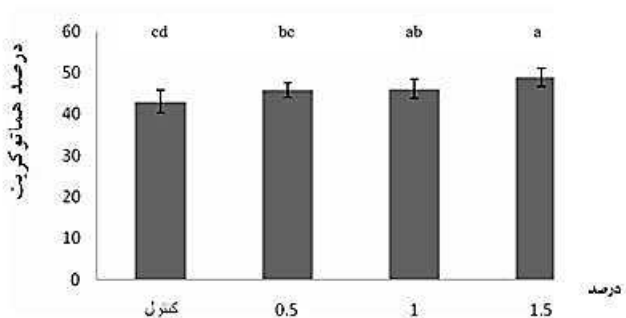
شاهد	۰/۵ میلی‌گرم عصاره	۱/۰ میلی‌گرم عصاره	۱/۵ میلی‌گرم عصاره
میزان رشد ویژه (SGR)	$236/25 \pm 5/24^a$	$239/3 \pm 8/34^a$	$241/82 \pm 4/18^a$
میزان رشد روزانه (DGR)	$6/44 \pm 1/15^a$	$7/12 \pm 1/75^a$	$7/55 \pm 1/15^a$
فاکتور وضعیت (CF)	$0/579 \pm 0/11^a$	$0/63 \pm 0/14^a$	$0/75 \pm 0/09^a$
درصد افزایش وزن بدن (PBWI)	$29/75 \pm 1/45^a$	$33/66 \pm 1/37^a$	$35/02 \pm 2/22^a$

حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۰/۰۵ است.



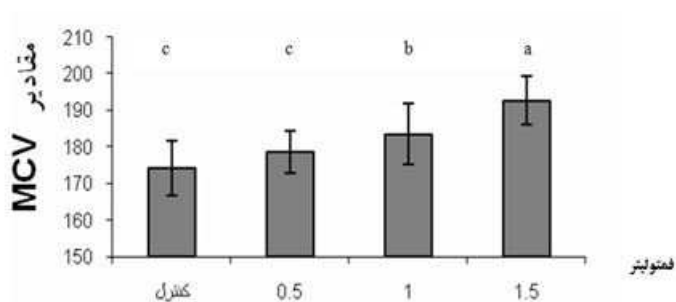
تیمارها

شکل ۱. متوسط (± خطای استاندارد) درصد بقای ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



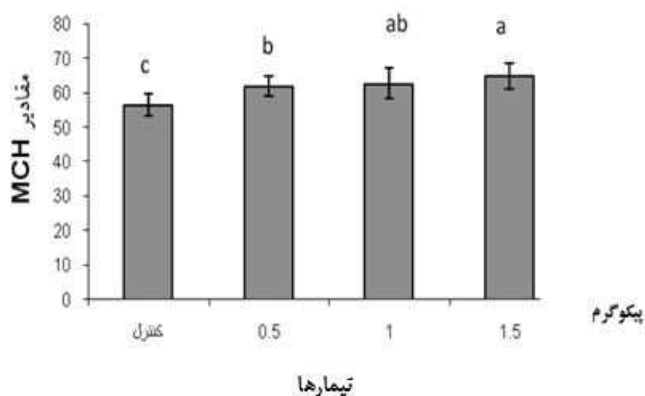
تیمارها

شکل ۲. متوسط (± خطای استاندارد) درصد هماتوکریت ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

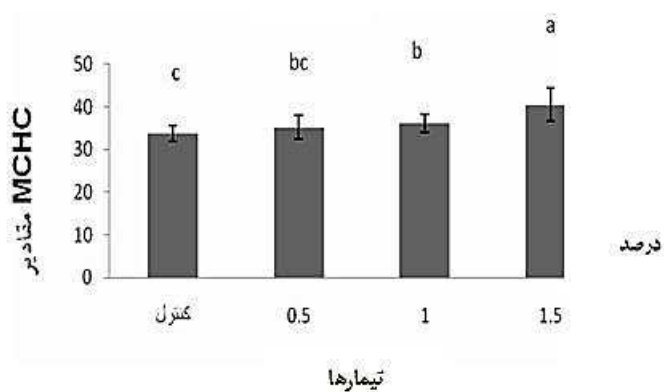


تیمارها

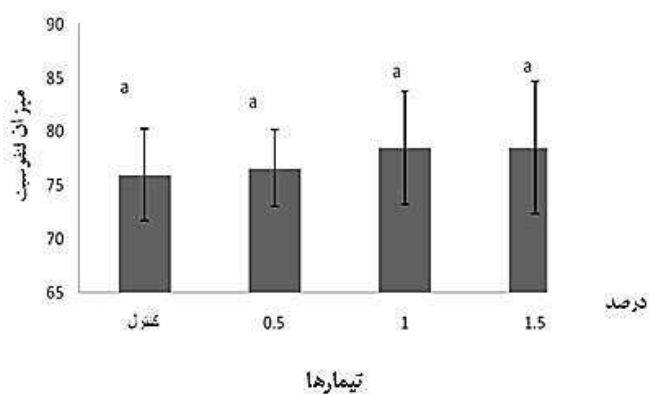
شکل ۳. متوسط (± خطای استاندارد) MCV ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



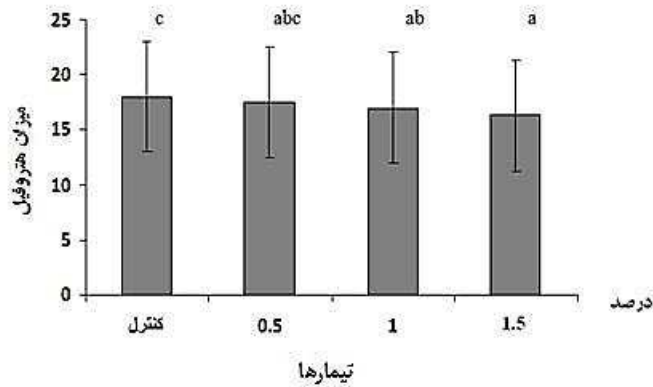
شکل ۴. متوسط (± خطای استاندارد) MCH ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



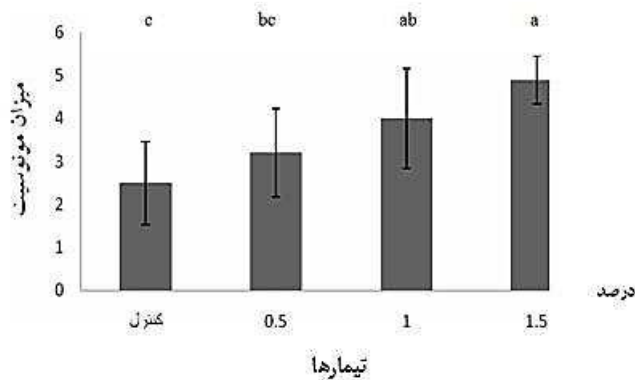
شکل ۵. متوسط (± خطای استاندارد) MCHC ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



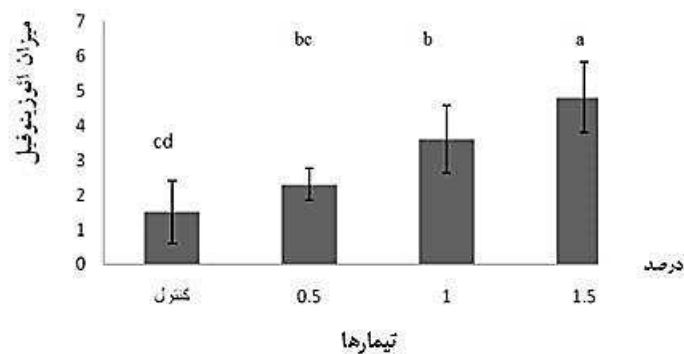
شکل ۶. متوسط (± خطای استاندارد) لنفوسیت ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



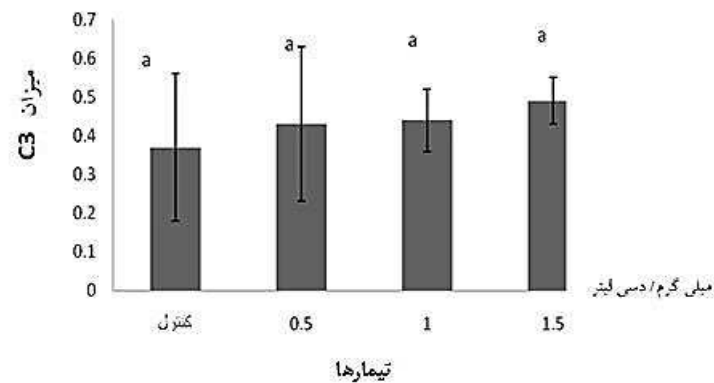
شکل ۷. متوسط (± خطای استاندارد) هتروفیل ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



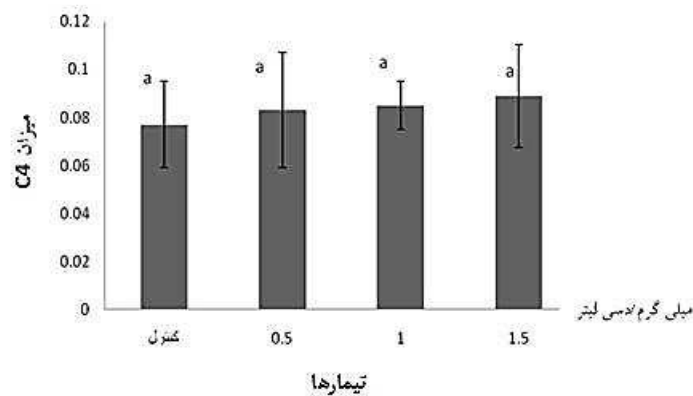
شکل ۸. متوسط (± خطای استاندارد) مونوسیت ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



شکل ۹. متوسط (± خطای استاندارد) اتوزینوفیل ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



شکل ۱۰. متوسط (± خطای استاندارد) C3 ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.



شکل ۱۱. متوسط (± خطای استاندارد) C4 ماهیان قرمز تغذیه شده با جیره‌های حاوی صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گیاهی گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی. حروف متفاوت روی هر یک از ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

در یک کیلوگرم جیره اختلاف معنی‌دار نداشت) در دو پارامتر دیگر دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود ($p < 0.05$). این نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار این عصاره گیاهی بر پارامترهای خونی است ($p < 0.05$). درصد هماتوکریت نیز در گروه‌های آزمایشی مختلف دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p < 0.05$). به طور کلی با افزایش دوز عصاره گل همیشه بهار درصد هماتوکریت نیز افزایش پیدا کرده و بالاترین میزان آن در گروه ۱/۵ میلی‌گرم عصاره در کیلوگرم جیره غذایی مشاهده شد. پایین‌ترین میزان هماتوکریت نیز در گروه شاهد مشاهده گردید که با

همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن عصاره گیاه گل همیشه بهار شاخص‌های MCHC و MCH، MCV را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($p < 0.05$)، به طوری که بالاترین میزان در مورد هر سه پارامتر مربوط به گروه ۱/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره گل همیشه بهار در جیره غذایی بود. اختلاف معنی‌داری در مورد شاخص‌های MCV و MCHC نیز میان تیمارها دیده شد ($p < 0.05$). پایین‌ترین میزان MCV، MCH و MCHC در گروه شاهد مشاهده شد که به غیر از MCHC (که تیمار کنترل با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم عصاره گل همیشه بهار

سایر تیمارها دارای اختلاف معنی داری بود ($p < 0.05$). به طور کلی میزان هماتوکریت با ایجاد شرایط استرسزا در ماهی (استرس غذایی، محیطی و یا رویارویی با پاتوژن) افزایش پیدا می‌کند. از این رو، می‌توان هماتوکریت را به عنوان یک شاخص دفاعی در شرایط بروز بحران و استرس در نظر گرفت (Barton *et al.*, 2011) و Pakravan و همکاران (۲۰۱۲) طی پژوهشی نشان دادند که اثر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی مربوط به ترکیبات فنولیکی، فلاونوئیدی، تاننی و استروئیدهای موجود در آنها می‌باشد. اگرچه مکانیسم اثر تاننها به خاطر سمی بودن آنها برای موجودات ذره‌بینی گزارش شده، فرآیند اثر فلاونوئیدها را بدین گونه ذکر می‌کنند که این ترکیبات مانع از سنتز اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. اثر تحریکی عصاره گل همیشه بهار بر سیستم ایمنی ماهی به ترکیباتی همچون ساپونین، اسیدهای فنولی، تاننها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌پتیدها مربوط می‌شود. این ترکیبات موجب می‌شود که مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و اجزائی همچون لیزوزیم، آگلوتینین و پروتئین‌های ترکیب‌شونده با متالیون به عنوان عوامل اصلی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی در خون افزایش یابد (Hajibeglou & Sudagar, 2010). عصاره گیاهان دارویی همچنین می‌توانند افزایش این پارامترها در گونه‌های مختلف ماهیان را القا نمایند. مطالعه حاضر نشان داد که افزایش غلظت عصاره گل همیشه بهار سبب افزایش فعالیت کامپلمانی C3 و C4 می‌شود. بالاترین میزان C3 و C4 در تیمار حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره گیاه گل همیشه بهار (یعنی بالاترین میزان آن در بین گروه‌های آزمایشی) مشاهده شد که البته این اختلاف در مورد شاخص‌های C3 و C4 معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). نتایج حاصل از مطالعه Sekkin و Kum (۲۰۱۱) نشان داد که افزایش

عصاره‌های گیاهی در جیره غذایی سبب افزایش فعالیت کامپلمانی می‌شود که با مشاهدات حاصل از پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. افزایش میزان عصاره گیاه گل همیشه بهار در جیره غذایی طی مطالعه حاضر موجب افزایش برخی از گلبول‌های سفید شد. بالاترین میزان هتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل در تیمارهای حاوی ۱/۵ میلی‌گرم عصاره گل همیشه بهار در هر کیلوگرم جیره غذایی به دست آمد که این اختلاف در مونوسیت‌ها با تیمارهای شاهد و ۰/۵ میلی‌گرم با سایر تیمارها معنی‌دار بود ($p < 0.05$). پایین‌ترین میزان لنفوسیت نیز در گروه شاهد مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با تیمارهای ۱ و ۱/۵ درصد بود ($p < 0.05$). افزایش گلبول‌های سفید می‌تواند سبب افزایش اکسیژن انفعالی شده و نقش تخریبی برابر پاتوژن‌ها ایفا نماید که این نتیجه با نتایج Ardo و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر استفاده از گیاهان چینی در افزایش تحریک پاسخ‌های ایمنی ماهی تیلاپای نیل و به تبع آن افزایش میزان گلبول‌های سفید خون مطابقت دارد. این یافته‌ها با مطالعات Alexander و همکاران (۲۰۱۰) مبنی ارتقا و بهبود فعالیت اکسیژن انفعالی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با مصرف باکتری‌های اسیدلاکتیک یا گلیسیریزین هم‌خوانی دارد. میزان مونوسیت‌ها در آزمایش حاضر با افزایش دوز عصاره گیاهی گل همیشه بهار در جیره غذایی افزایش پیدا کرد. به طور کلی نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که افزودن عصاره گیاه گل همیشه بهار به جیره غذایی ماهی قرمز می‌تواند اثرات سودمندی بر میزان بقا و پارامترهای ایمنی غیراختصاصی آن داشته باشد. بنابراین با توجه به موارد ذکر شده، کاربرد ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاهی مذکور در جیره غذایی ماهی قرمز توصیه می‌گردد.

- punctatus*) Rafinesque. Journal of Fish Disease; 15: 295-304.
- Cleulemans, S., Robles, R. and Coutteau, P. (2009) Innovative feed additives improve feed utilization in Nile Tilapia. Global Aquaculture Advocate, 12 (6): 63-65.
- Danilova, N. (2006) The evolution of immune mechanisms. Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution, 306: 496-520.
- De Silva, S.S. and Anderson, T.A. (1995) Fish nutrition in Aquaculture, Chapman & Hall. Press. London, 319 p.
- Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A. and Ross, N.W. (2002) Skin morphology and humeral non-specific defense parameters of mucus and plasma in Rainbow trout, Coho and Atlantic Salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, 132 (A): 645-657.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O. and Empis, J. (2003) Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. Aquaculture Nutrition, 9: 123-129.
- Hajibeglou, A. and Sudagar, M. (2010) Immune Response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets. Agricultural Journal, 5(3): 163-172.
- Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M. and Hemre, G. (2005) Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed increased level of fish protein hydrolyses during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition, 11: 301-313.
- Ji, S. C., Takaoka, O., Jeong, G. S., Lee, S. W., Ishimaru, K., Seoka, M. and Takii, K. (2007) Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream (*Pagrus major*). Fisheries Science, 73: 63-69.
- Karunasagar, I., Rosalind, G. and Karunasagar, J. (1991) Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Journal of Fish Disease, 14: 413-417.
- Kum, C. and Sekkin, S. (2011) The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs. In: Aral, F. and Dagui, Z. (eds.) Recent Advances in Fish Farms. Cavit Kum and Selim Sekkin (2011). The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs, Recent Advances in Fish Farms, Dr. Faruk Aral (Ed.), ISBN: 978-953-307-759-8, InTech, DOI: 10.5772/26869. Available from:
- ایمانپور، م.ر. و کمالی، ا. (۱۳۸۵) بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لارو ماهی قرمز (*Carassius auratus gibelio*) توسط HCG، فصل‌نامه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۲(۱۳): ۱۶۵-۱۷۴.
- وثوقی، غ.م. و مستجیر، ب. (۱۳۷۳) ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران. تهران، ۳۱۷ صفحه.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, X. W., Duan, Q., Ma, H. and Zhang, L. (2006) Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). Aquaculture, 255: 260-263.
- Alexander, C.P., Kirubakaran, C.J.W. and Dinakaran, R.M. (2010) Water soluble fraction of (*Tinospora cordifolia*) leaves enhanced the non-specific immune mechanisms and disease resistance in (*Oreochromis mossambicus*). Fish and Shellfish Immunology, 29: 765-772.
- Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeney, Z. and Jeney, G. (2008) Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 275(1-4): 26-33.
- Barton, B. A., Weirter, G. S. and Schreck, C.B. (2011) Effect of Prior Acid Exposure on Physiological Responses of Juvenile Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) to Acute Handling Stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42(4): 710-717.
- Bekcan, S., Dogankaya, L. and Cakirogullari, G.C. (2006) Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis L.*) fed diets containing different percentages of protein. Bamidgeh, 58: 137-142.
- Boshra, H.L.J. and Sunyer, J.O. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology. 20: 239-262.
- Bricknell, I. and Dalmo, R.A. (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology, 19: 457-472.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J. (1992) Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish (*Ictalurus*

<http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/the-immune-system-drugs-in-fish-immune-function-immunoassay-drugs>

- Magnadottir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- Pakravan, S., Hajimoradloo, A. and Ghorbani, R. (2012) Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters and *Aeromonas hydrophila* challenge on common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 43 (6): 861-869.
- Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotirmayee, P. and Chakrabarti, R. (2006) Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 263-273.
- Rijkers, G.T., Teunissen, A.G., Van Oosteron, R. and Van Muiswinkel, W.B. (1980) The immune system of cyprinid fish. The immuno-suppressive effects of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 19:177-189.
- Robertsen, B. (1999) Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 269-290.
- Schaperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K. (1991) Hematological and serological technique. In: Kothekar, V.S. (Ed.) *Infectious disease of Fish*, A A Balkema Publishers. Netherland, pp 71-108.
- Selvaraj, V., Sampath, K. and Sekar, V. (2005) Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 293-306.
- Stoskopfe, M. A. (1993) *Fish medicine*. Sounders Company. USA, 882 p.

Effects of Myrtus (*Calendula officinalis*) extract on Immunological and some blood factors of Goldfish (*Carassius auratus*)

Seyedeh Hamideh Majdmohammadi¹, Hamed Manouchehri^{1*},
Mahsa Mohammadzadeh Khoshroo² and Samad Darvishi³

1) Department of Fisheries, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran. *Corresponding Author: hdmanouchehri@gmail.com

2) Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3) Bony Fish Breeding and Reproduction Centre of Ansari, Rasht, Iran.

Date of Submission: 2013/05/28 Date of Acceptance: 2013/12/22

Abstract

Effect of myrtus extract (*Calendula officinalis*) at concentrations of 0.5, 1 and 1.5% in diet was studied on some growth performance, survival and immunological variables of gold fish (*Carassius auratus*) weighing 8.5 ± 1 g for 60 days using a complete random design. A number 63 fish were used per treatment and growth parameters consisting of percent body weight increase, specific growth rate, daily growth rate and condition factor were evaluated. The blood samples were obtained at the end of trial and levels of hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, heterophil, lymphocyte, and complement activity were also measured. The obtained results showed that an insignificant increase was seen in level of complement component when the concentration of myrtus extract was increased in the fish diet ($p > 0.05$). The amounts of C_3 and C_4 were also higher in treatments containing the extract than control group but they had on significant different ($p > 0.05$). Generally, the results of this experiments showed that *Calendula officinalis* extract had positive effect on some immunological parameters of fish and it could act as immunostimulator in this fish species.

Keywords: *Calendula officinalis*, growth performance, survival, immunological variables, *Carassius auratus*.

