



تأثیر سطوح مختلف پودر نعناع بر بیان ژن‌های درگیر در رشد (IGF, GH) و برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی ماهی کلمه (*Rutilus caspius*)

حامد پاکنژاد*، عبدالمجید حاجی مرادلو، سهیلا رستگاری، مرجان حسینی، حامد آزادی

گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۰۵/۲۴

اصلاح: ۹۶/۰۹/۱۰

پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۹

کلمات کلیدی:

ایمنی

پودر نعناع

خون‌شناسی

IGF

اخیراً استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرک رشد و ایمنی در ماهیان پرورشی افزایش یافته است. در این مطالعه اثر پودر نعناع بر بیان ژن‌های GH و IGH و پارامترهای خون‌شناسی ماهی کلمه مورد مطالعه قرار گرفت. ماهی‌ها به مدت ۸ هفته با سطوح (شاهد)، ۲، ۳ و ۴ گرم بر کیلوگرم پودر نعناع تغذیه شدند. پس از پایان دوره آزمایش، خون‌گیری انجام شد و بافت‌های کبد و مغز در شرایط کاملاً استریل جدا شدند. نتایج نشان داد که پودر نعناع باعث افزایش بیان نسبی ژن GH و IGF شد و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین نتایج حاصل از سنجش پارامترهای خونی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز و گلبول سفید در گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی پودر نعناع و گروه شاهد وجود داشت ($P < 0.05$). به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که پودر نعناع باعث افزایش رشد و ایمنی غیراختصاصی ماهی کلمه می‌شود.

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از زیرشاخه‌های مهم تولیدات غذایی برای جمعیت بشر است و امروزه نیازمند توسعه‌ی درخوری برای پاسخگویی به نیازهای پرورش‌دهنده و جمعیت مصرف‌کننده است. در حال حاضر با توجه افزایش نیازمندی به پروتئین جانوری و با توجه به فواید آبزیان تقاضا به سمت این منبع پروتئینی در حال افزایش است (Adeli, 2007). با توجه به این‌که ۶۰ تا ۷۵ درصد از کل هزینه‌های پرورش مربوط به تغذیه می‌باشد، اتخاذ استراتژی مناسب برای کاهش نهاده‌های خوراک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بهبود کیفیت جیره متناسب با نیازهای غذایی گونه پرورشی نقش مهمی در رشد و پیشگیری از عوامل بیماری‌زا و کاهش هزینه‌های پرورش دارد. همگام با رشد صنعت آبزی‌پروری مشکلات متعددی نیز وجود داشته است که می‌توان به شیوع بیماری‌ها اشاره کرد. همواره راه‌حلهایی برای برطرف کردن این مشکل در نظر گرفته شده است؛ از جمله استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی که استفاده از این مواد مشکلات عدیده‌ای همچون مقاوم شدن عوامل بیماری‌زا و مسائل زیست‌محیطی را به وجود آورده‌اند علاوه بر آن آنتی‌بیوتیک‌ها موجب انتقال مقاومت دارویی به انسان می‌شوند که از این نظر منع قانونی و محدودیت مصرف برای این مواد وجود دارد (Aly et al., 2008) در این میان، اخیراً استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرک رشد و ایمنی می‌تواند به عنوان یک راهکار جدید جهت کنترل و مبارزه با بیماری‌های آبزیان مورد استفاده قرار گیرد (Lee et al., 2012). این ترکیبات قادر به افزایش پاسخ ایمنی ماهی، بهبود مقاومت

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hkolangi@gmail.com

در برابر بیماری‌های عفونی و به حداقل رساندن خطر استفاده از عوامل شیمیایی می‌باشند. گیاهان دارویی با توجه به داشتن ترکیبات شیمیایی که به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاه ساخته می‌شوند (گلیکوزیدها، تریپنئیدها، آلکالوئیدها، تریپن‌ها، فلاونوئیدها، کینون‌ها و غیره) خواص زیادی از قبیل ضد باکتری، ضد ویروس، ضد قارچ، ضد انگل و محرک رشد را دارا می‌باشند. گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* (منتا پپریتا) و نام رایج پپرمنت، گیاهی علفی و از تیره نعناع می‌باشد (Iscan et al., 2002). این گیاه بومی مناطق مدیترانه بوده و در اکثر نقاط ایران به ویژه مناطق شمالی پراکنده شده است (Hadian et al., 2007) و از جمله گیاهان دارویی مهم با خواص متعدد شامل: اثرات ضد میکروبی (Mahboubi and Haghi, 2008) و اثرات آنتی‌اکسیدانی (Mimica-Dukic et al., 2003) می‌باشد که تأثیرات قابل توجهی بر روی خون و پارامترهای ایمنی دارد. علاوه بر این، اثرات آن بر رشد و تحریک سیستم ایمنی بدن در انسان و حیوانات خونگرم ثابت شده است (Cosentino et al., 2009). منتول، منتون و اتیل‌استات، از مواد تشکیل‌دهنده مهم در این گیاه می‌باشند (Mahboubi and Haghi, 2008). بررسی‌های صورت گرفته نشان‌دهنده اثرات نعناع فلفلی به عنوان محرک رشد و ایمنی در گونه‌های آبی مانند کپور معمولی، سی‌باس و ماهی سفید دریای خزر بوده است (Adel et al., 2015). در ماهیان و سخت پوستان پرورشی گزارش‌هایی مبنی بر اثر گیاهان دارویی بر تحریک اشتها، محرک رشد، افزایش وزن، تحریک سیستم ایمنی، خواص ضد باکتری، ضد ویروس، ضد انگل و ضد استرس، وجود دارد (Reverter et al., 2014). Adel و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی اثر عصاره نعناع در جیره ماهی سفید دریای خزر عنوان کردند که عصاره نعناع باعث افزایش رشد و تعداد لوکوسیت‌ها شد اما تأثیری روی مونوسیت و ائوزینوفیل نداشت همچنین تعداد لنفوسیت را نیز کاهش داد. ماهی کلمه یکی از با ارزش‌ترین گونه‌های دریای خزر می‌باشد که از جمله مهم‌ترین مواد غذایی برای فیل‌ماهی محسوب می‌شود با توجه به عدم استفاده از پودر نعناع در جیره ماهی کلمه به عنوان یک مکمل جهت تحریک رشد و سیستم ایمنی غیر اختصاصی، هدف از این تحقیق بررسی اثر این گیاه بر بیان ژن‌های IGF, GH و پارامترهای خونی ماهی کلمه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی

تعداد ۲۰۰ قطعه بچه ماهی کلمه (*Rutilus caspius*) از کارگاه تکثیر سیجوال تهیه شد و با پلاستیک‌های محتوی یک‌سوم آب و دوسوم هوا به سالن پرورش ماهی شهید فضلای برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ابتدا ماهیان جهت انگل زدایی با آب نمک ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه حمام داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت جهت کاهش تلفات احتمالی و استرس، غذاهای نشدند. سازگاری اولیه با تراکم ۴۰ عدد ماهی در هر مخزن ۵۰۰ لیتری متصل به پمپ هوا به مدت یک هفته انجام شد. طی این مدت روزانه ۵۰ درصد آب مخازن با آب شهری کلرزدایی شده تعویض شد.

طرح آزمایش و مدیریت مخازن

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. تیمارها شامل گروه تغذیه شده با ۰، ۲، ۳ و ۴ گرم بر کیلوگرم غذا بود. در هر مخزن ۵۰۰ لیتری تعداد ۱۲ عدد بچه ماهی با میانگین وزنی $2/4 \pm 0/12$ گرم ذخیره‌سازی شد. هر مخزن متصل به هواده و پمپ هوا بود و روزانه ۵۰ درصد آب تعویض می‌شد.

تهیه غذا، مکمل غذا و غذادهی

مکمل غذایی استفاده شده در این آزمایش پودر نعناع بود که از بازار محلی در استان گلستان تهیه شد. پودر نعناع به کمک محلول ژلاتین ۵ درصد با غذای بیومار (ساخت شرکت فرانسو) مخلوط شد و پس از خشک شدن تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. لازم به ذکر است ماهیان در ابتدا و انتهای دوره و همچنین در طول دوره آزمایش در

فواصل زمانی ۱۴ روز زیست‌سنجی می‌شدند. غذادهی بر اساس ۳٪ وزن بیومس زنده موجود در تانک به‌صورت دستی انجام می‌شد. میزان غذای مورد نیاز هرروز طی ۳ وعده از ساعت ۹ صبح تا ۱۴ در اختیار ماهی‌ها قرار می‌گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های خون

پس از پایان دوره آزمایش (۸ هفته) تعداد ۵ عدد ماهی به‌صورت تصادفی از هر تانک برداشت و خون‌گیری انجام شد. قبل از انجام خون‌گیری ماهیان توسط محلول صد میلی‌گرم بر لیتر پودر گل میخک بی‌هوش شدند و خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی انجام گرفت. مقدار خون جمع‌آوری‌شده به دو قسمت تقسیم شد. نمونه‌های خون حاوی ماده ضد انعقاد جهت اندازه‌گیری هموگلوبین، هماتوکریت، گلبول قرمز و گلبول سفید استفاده شدند. شمارش گلبول قرمز و سفید خون با استفاده از لام هموسایتومتر انجام شد. اندازه‌گیری میزان هماتوکریت خون توسط دستگاه هماتوکریت خوان انجام شد. سرم خون نمونه‌های خون موجود در میکروتیوپ‌های فاقد ماده ضد انعقاد توسط سانتریفیوژ (به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm) جداسازی و در میکروتیوپ‌های جدید نگهداری شد.

نمونه‌برداری

پس از هشت هفته تغذیه با مکمل غذایی نمونه‌برداری در شرایط کاملاً استریل از بافت مغز و کبد انجام گرفت. ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک بی‌هوش شدند و پس از آن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل شد و به سرعت بافت‌های مذکور جمع‌آوری و به داخل تیوپ‌های از قبل استریل شده انتقال داده شدند. تیوپ‌ها بلافاصله به تانک ازت منتقل و تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این آزمایش استخراج RNA بر اساس پروتوکل استخراج RNA توسط ماده هضم‌کننده RNX-Plus انجام شد. همچنین سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو محصول کشور کره و طبق دستورالعمل آن انجام گرفت.

انجام Real time PCR

PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ ۲۰ میکرولیتر بود. برای ساخت مستر ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش رونده ژن هدف، ۱ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز و ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. هر ویال مخصوص PCR، محتوی ۵ میکرولیتر cDNA و ۱۸ میکرولیتر مستر بود.

طراحی پرایمر

جهت مطالعه بیان ژن از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف و رفرنس (جدول ۱) که بر اساس توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI طراحی شدند استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بیان نسبی ژن‌های IGF و GH با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ توسط نرم‌افزار اکسل انجام شد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار Spss ۲۲ و همچنین آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One - Way ANOVA) انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای (IGF و GH) و ژن رفرنس (Beta-Actin)

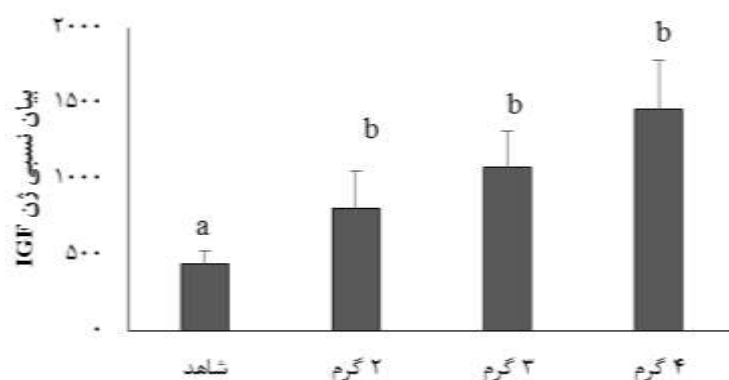
شماره دسترسی	طول قطعه (جفت باز)	توالی	نام پرایمر
374264143	110	GTCTCAAACAGCCTGACGGT	RoachpGH F
		GGAAGCTCTCTCTGACGCTG	RoachpGH R
374264151	193	GCGCCTTGAGATGTACTGTG	RoachpIGF F
		GGTTTCTTTGCTGTCTGGTG	RoachpIGF R
DQ061948.1	189	TGCATGGATGTGTGGATGGT	Beta Actin F
		GACCAGAGGCATACAGGGAC	Beta Actin R

نتایج

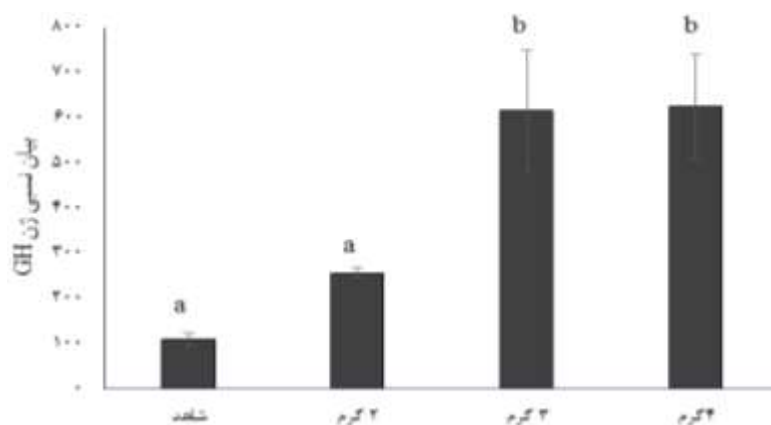
نتایج حاصل از ارزیابی بیان نسبی ژنهای IGF و GH در شکل‌های ۱ و ۲ خلاصه شده است. نتایج حاصل از بیان ژن IGF در کبد نشان داد که با افزایش سطح مصرف پودر نعناع در جیره، بیان این ژن نیز افزایش یافته است. بالاترین سطح بیان در ماهیان تغذیه شده با ۴ گرم بر کیلوگرم پودر نعناع بود که اختلاف معناداری با گروه شاهد داشت ($P < 0.05$). میزان بیان این ژن در گروه‌های تغذیه شده با ۲، ۳ و ۴ گرم پودر نعناع اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($P > 0.05$) و کمترین میزان بیان این ژن در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج به دست آمده از بیان ژن GH نیز الگویی مشابه با IGF را نشان داد. بیشترین میزان بیان این ژن در تیمار ۴ گرم پودر نعناع و کمترین میزان بیان این ژن در گروه شاهد بود. بین تیمارهای ۳ و ۴ گرم اختلاف معناداری وجود نداشت ($P > 0.05$) اما این تیمارها با گروه شاهد و ماهیان تغذیه شده با ۲ گرم پودر نعناع در جیره اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$).

شاخص‌های خونی

شاخص‌های هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول قرمز و گلبول سفید پس از هشت هفته تغذیه با جیره حاوی پودر نعناع در تیمارهای ۳ و ۴ گرم پودر نعناع اختلاف معناداری با گروه شاهد و تیمار ۲ گرم داشت ($P < 0.05$) و بالاترین میزان این پارامترها در تیمار ۴ گرم پودر نعناع و به ترتیب 53.66 ± 0.92 ، 8.87 ± 0.39 ، 2.32 ± 0.02 و 17.66 ± 1.15 بود. علاوه بر این میزان هماتوکریت و گلبول قرمز در تیمار ۲ گرم نیز اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان دادند. در حالی‌که در سایر شاخص‌های خونی شامل MCV و MCH اختلاف معنی‌داری بین تیمارها با یکدیگر وجود نداشت ($P > 0.05$). اما اختلاف معنی‌دار تیمارها با گروه شاهد مشاهده شد و بالاترین میزان در گروه شاهد مشاهده شد. همچنین در مورد MCHC نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$).



شکل ۱. ارزیابی بیان نسبی ژن IGF



شکل ۲. ارزیابی بیان نسبی ژن GH

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف پودر نعناع بر پارامترهای خون‌شناسی بچه ماهی کلمه (میانگین \pm خطای استاندارد)

پارامترهای خونی	شاهد	۲ گرم نعناع	۳ گرم نعناع	۴ گرم نعناع
هماتوکریت (درصد)	^a ۴۷/۲۳ \pm ۱/۰۶	^b ۵۰/۴۴۳ \pm ۱/۲۴	^{bc} ۵۲/۲۴ \pm ۱/۲۰	^c ۵۳/۶۶ \pm ۰/۹۲
هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)	^a ۷/۵ \pm ۰/۰۷	^a ۷/۹۹ \pm ۰/۱۴	^b ۸/۵۲ \pm ۰/۳۱	^b ۸/۸۷ \pm ۰/۳۹
گلبول قرمز (تعداد $\times 10^6$)	^a ۱/۵۷ \pm ۰/۱۷	^b ۱/۹۰ \pm ۰/۰۹	^c ۲/۳۲ \pm ۰/۱۷	^c ۲/۳۲ \pm ۰/۰۲
گلبول سفید (تعداد $\times 10^3$)	^{ab} ۱۵/۳۳ \pm ۱/۵۲	^a ۱۵/۰۲ \pm ۱/۰۶	^{bc} ۱۷/۳۳ \pm ۰/۵۷	^c ۱۷/۶۶ \pm ۱/۱۵
MCV (فمتولیترا)	^b ۳۰۳/۰۶ \pm ۹/۲۱	^{ab} ۲۶۵/۲۳ \pm ۶/۷۵	^a ۲۲۵/۴۵ \pm ۱۱/۸۰	^a ۲۳۱/۰۳ \pm ۶/۴۰
MCH (پیکوگرم)	^b ۴۸/۰۹ \pm ۱/۸۱	^{ab} ۴۲/۰۳ \pm ۱/۵۳	^a ۳۶/۷۷ \pm ۲/۳۳	^a ۳۸/۱۹ \pm ۱/۵۹
MCHC (گرم بر دسی لیتر)	^a ۱۵/۸۷ \pm ۰/۲۸	^a ۱۵/۸۴ \pm ۰/۳۱	^a ۱۶/۳۰ \pm ۰/۴۹	^a ۱۶/۵۳ \pm ۰/۹۴

بحث

افزایش معنادار بیان ژن‌های GH و IGF همگام با افزایش سطح پودر نعناع در جیره ماهی کلمه نشان‌دهنده تأثیر مثبت استفاده از پودر نعناع در جیره می‌باشد. IGF و GH نقش مهمی در تنظیم تعادل رشد در همه مهره‌داران دارند (Patel *et al.*, 2005) بر اساس گزارش Duan and Plisetskaya (۱۹۹۳) سطوح IGF-I mRNA کبدی در بسیاری از گونه‌های استخوانی به وضعیت تغذیه‌ای بستگی دارد. اساساً تولید هورمون رشد در هیپوفیز و ترشح درون‌ریز آن، طیف وسیعی از فرایندهای مربوط به تقسیمات سلولی را تحریک می‌نماید که این عملکرد آن‌ها به واسطه فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGFs) صورت می‌گیرد (Wilkinson *et al.*, 2010 ; Nelson and Van Der kraak, 2010). بنابراین، تولید IGF-I وابسته به تولید GH و رهاسازی آن است که در نهایت، از طریق محور مغزی-هیپوتالاموسی و وضعیت تغذیه‌ای (مصرف غذا و جذب مواد مغذی) تحت کنترل قرار می‌گیرد. در این تحقیق نیز استفاده از پودر نعناع در جیره باعث افزایش سطح بیان GH و به دنبال آن بیان IGF شد. گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از روغن و یا عصاره نعناع در جیره و تأثیر آن بر افزایش رشد ماهی وجود دارد (Talpur *et al.*, 2014). از جمله مزایای استفاده از نعناع در پستانداران نرمال‌سازی عملکردهای مربوط به دستگاه گوارش (عملکرد عضلانی، ترشح و فرایند انتقال انتروسیت‌ها) که اصلاح مسیرهای متعدد هضم و جذب را به دنبال دارد، می‌باشد (McKay and Belumberg, 2006). همان‌طور که در پستانداران مشاهده شده است، نعناع می‌تواند روی کبد، کلیه و سیستم عصبی مرکزی و محیطی تأثیرگذار باشد (Ibrahim *et al.*, 2000). Adel و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که استفاده از نعناع باعث افزایش WG و SGR در بچه ماهی سفید دریای خزر شد درحالی‌که تأثیری روی ترکیب لاشه نداشت. افزایش رشد ناشی از وجود نعناع در جیره ماهی سفید دریای خزر احتمالاً ناشی از تأثیر این محرک بر روی پرزهای موجود در دستگاه گوارش می‌باشد (Grigoleit, 2005). با توجه به اینکه سطوح GH و IGF وابسته به تغذیه می‌باشد افزایش بیان این دو ژن قابل توجه است. شناخت فاکتورهای خونی نه تنها در تشخیص گونه مهم است بلکه از نظر اقتصادی نیز می‌تواند در شناسایی بیماری‌ها، نوع تغذیه و تعیین شرایط بهداشتی و سلامت ماهی مفید باشد. در تحقیق حاضر استفاده از ۳ و ۴ گرم بر کیلوگرم

پودر نعناع در جیره باعث افزایش هماتوکریت، هموگلوبین، گلبول سفید و گلبول قرمز شد. تعداد گلبول‌های سفید و ترکیبات آن یکی از شاخص‌های مهم سلامتی ماهیان بوده و نشان‌دهنده وجود یا عدم وجود عفونت و نوع واکنش بدن به عفونت و دیگر عوامل فیزیولوژیک و پاتولوژیک می‌باشد. از عوامل مؤثر در تعداد گلبول‌های سفید می‌توان به بیماری‌های عفونی، التهاب، استرس، دما، تغذیه، سن، جنس و تغییر در میزان هورمون اشاره کرد (Klontz, 1994). در تحقیق حاضر با افزایش سطح مصرف نعناع در جیره میزان گلبول سفید افزایش یافت. گلبول‌های سفید از مهم‌ترین اجزای هستند که می‌توانند واکنش‌های ایمنی غیراختصاصی و ایمنی سلولی را در ماهیان تحریک کنند (Soltani, 2008). سیستم ایمنی ذاتی یا غیراختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا در ماهیان می‌باشد که تقویت این سیستم از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. منتول از جمله ترکیبات عمده و اصلی گیاه نعناع می‌باشد که دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد و افزایش سطح ایمنی غیراختصاصی احتمالاً مربوط به این ترکیب می‌باشد (McKay and Belumberg, 2006). همچنین پلی‌فنول‌های موجود در ترکیبات گیاهی می‌توانند با فلزات و یون‌های فلزی مانند آهن، کمپلکس‌هایی تشکیل دهند و این پتانسیل را دارند که در واکنش‌های فیزیولوژیک مربوط به آهن و دیگر فلزات واسطه دخل و تصرف کنند. بنابراین این احتمال وجود دارد که دسترسی به آهن مورد نیاز بدن را تسهیل کنند (Satyakeerthy, 1999). با توجه به در نظر گرفتن اثرهای آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها بر سطح غشای گلبول‌ها، این مواد می‌توانند یک مانع فیزیکی در برابر رادیکال‌های آزاد محلول فراهم کنند (lanping et al., 2000). بنابراین افزایش میزان گلبول قرمز همراه با افزایش استفاده از نعناع در جیره قابل توجه است. مطالعات انجام شده در ارتباط با استفاده از نعناع به عنوان یک محرک برای سیستم ایمنی بسیار محدود است. همراستا با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق تحت تأثیر استفاده از سایر گیاهان دارویی در جیره غذایی ماهی می‌توان به گزارش‌های Ghasemi Pirbaloti و همکاران (۲۰۱۱) اشاره کرد که نشان دادند ۸ هفته تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غذای حاوی اسانس چند گیاه دارویی (مرزه بختیاری، آویشن دناپی، مرزه خوزستانی، زرین گیاه و پونه کوهی) باعث تحریک سیستم ایمنی، افزایش درصد فاگوسیتوز، تعداد جرم فاگوسیت شده و میزان ایمنوگلوبین شد. همچنین Amirkhani و Firuzbakhsh (۲۰۱۳) اثر عصاره اتانولی ریحان (*Ocimum basilicum*) را در برابر عفونت ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در کپور معمولی مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تعداد گلبول سفید و قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین کل، پروتئین سرم، گلوبولین و آلبومین در جیره حاوی عصاره ریحان افزایش چشم‌گیری داشته و بالاترین نرخ رشد و بیشترین مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا هم در جیره حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از پودر نعناع در جیره باعث افزایش رشد و ایمنی غیراختصاصی ماهی کلمه شد که این اثر با بهبود فاکتورهای خون‌شناسی و افزایش بیان GH و IGF نشان داده شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از پرسنل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دارند.

منابع

- Adeli, A. 2008. Principles of marketing and packaging of aquatic animals. Honar ta Binahayat Publication. 204 p. (in Persian)
- Adel, M., Amiri, A.A., Zorriehzahra, J., Nematollahi, A., Esteban, M.Á. 2015. Effects of dietary peppermint (*Mentha piperita*) on growth performance, chemical body composition and hematological and immune parameters of fry Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*). Fish and Shellfish Immunology. 45: 841-847.
- Aly, S.M., Atti, N.M.A., Mohamed, M.F. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. In 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture.
- Amirkhani, N., Firouzakhsh, F. 2013. Protective effects of basil (*ocimum basilicum*) ethanolic extract supplementation diets against experimental *aeromonas hydrophila* infection in common carp (*cyprinus carpio*). Aquaculture Research. 46: 716-724.

- Cosentino, M., Bombelli, R.A., Laura Colombo, M., Azzetti, A., Bergamaschi, A., Marino, F., Lecchini, S. 2009. Antioxidant properties and in vitro immunomodulatory effects of peppermint (*Mentha piperita*) essential oils in human leukocytes. *Pharmacology Sciences and Research*. 1: 33-43.
- Duan, C., Plisetskaya, E.M. 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues. *Journal of Endocrinology*. 139: 243-252.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Pirali, A., Pishkar, G.H., Jalali, S.M.A., Raisi, M., Jaafarian Dehkordi, M., Hamed, B. 2011. Effect of medicine herb on immune system in *Oncorhynchus mykiss*. *Medicine Herb*. 2: 149-155. (in Persian)
- Hadian, J., Ghasemnezhad, M., Ranjbar, H. 2008. Antifungal potency of some essential oil in control of postharvest decay of strawberry caused by *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*. *Essential Oil Bearing Plants*. 11: 553-562.
- Grigoleit, H.G., Grigoleit, P. 2005. Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil. *Phytomed*. 12: 612-616.
- Ibrahim, S.A.M., El-Ghamry, A.A., El-Mallah, G.M. 2000. Effect of some medicinal plants of Labiatae family as feed additives on growth and metabolic changes of rabbits. *Egypt Journal Rabbit Science*. 10: 105-120.
- Iscan, G., Kırimer, N.E.S.E., Kurkuoglu, M., Baser, H.C., DEMİrci, F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3943-3946.
- Klontz, G.W. 1994. Fish hematology. In: *Techniques in fish immunology*. Vol. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA. pp. 121-132.
- Lanping, M.A., Zaiqun, L., Bo, Z., Li, Y., Zhongli, L. 2000. Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red blood cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin*. 23: 45-22.
- Lee, J.Y., Gao, Y. 2012. Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in Aquaculture. *World Aquaculture Society*. 43: 447-458.
- Mahboubi, M., Haghi, G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 19: 325-327.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita*). *Phytotherapy Research*. 20: 619-633.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M. 2003. Antimicrobi and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*. 69: 419-413.
- Nelson, S.N., Van, Der., Kraak, G. 2010. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary. *Genetic Comparative Endocrinology*. 168: 111-120.
- Patel, M.B.R., Arden, N.K., Masterson, L.M., Phillips, D.I.W., Swaminathan, R., Syddall, H. E. 2005. Investigating the role of the growth hormone–insulin-like growth factor (GH–IGF) axis as a determinant of male bone mineral density (BMD). *Bone*. 37: 833-841.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. 433: 50-61.
- Satyakeerthy, T.R. 1999. Polyphenolic compounds liberated during coir retting in a BID- reactor: separation, characterisation and possible applications. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. India Cochin University of Science and Technology. 82 p.
- Soltani, M. 2008. Fish and shellfish immunology. Tehran university publication. 264 p. (in Persian)
- Talpur, A.D. 2014. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian sabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 420: 71-78.
- Wilkinson, R.J., Porter, M., Woolcott, H., Longland, R., Carragher, J.F. 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout. *Comperision Biochemistry Physiology A Mol Integrate Physiology*. 145: 214-24.