بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۵
http://japu.gau.ac.ir

بررسی شاخص‌های خونی بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) تغذیه شده با عصاره گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) در مواجهه با تنش شوری تحت کشنده

میثم دهقانی قمشانی[۱]، *محمد مازندرانی[۲]، محمد سوداگر[۳] و سید مرتضی حسینی[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]دانشیار گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۴]استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات آبزیان آب‌های داخلی کشور، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۹

چکیده

برخی افزودنی‌های تغذیه‌ای می‌توانند باعث افزایش مقاومت ماهیان در مواجهه با استرس‌های محیطی گردند. در این تحقیق، اثرات تغذیه‌ای عصاره گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) بر شاخص‌های خونشناسی بچه ماهیان کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) در مواجهه با استرس شوری مورد بررسی قرار گرفت. به‌این منظور ماهیان با میانگین وزنی ۹/۵۱±۰/۱۳ گرم به‌مدت ۷۰ روز با سطوح مختلف شامل صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ درصد عصاره گیاه گلرنگ تغذیه شدند. در پایان دوره ماهیان با شوری غیر کشنده (۱۰ گرم در لیتر) مواجهه شده و بررسی شاخص‌های خونی در زمان‌های پیش از استرس شوری و نیز ٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از آن مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج تعداد گلبول قرمز در ماهیان گروه شاهد پیش از استرس شوری به‌طور معنی‌دار بالاتر از ماهیان گروه‌های تیمار بود و نیز تعداد گلبول سفید در ماهیان گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کمتر از ماهیان گروه‌های تیمار پیش از استرس شوری اندازه‌گیری شد ($P<۰/۰۵$). در تمامی ماهیان ٦ ساعت

*مسئول مکاتبه: mazandarani@ gau.ac.ir

پس از مواجهه با شوری تحت کشنده مقادیر گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین افزایش یافت (P<۰/۰۵). مقادیر گلبول‌های قرمز در زمان‌های ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از مواجهه شوری روند کاهشی داشت اما سایر فاکتورهای یاد شده در طی ٤٨ ساعت روند افزایشی داشتند. در عین حال مقادیر در زمان ٤٨ ساعت پس از مواجهه مقادیر هموگلوبین در ماهیان گروه تغذیه شده با ۱/۵ درصد و ۳ درصد عصاره گلرنگ در جیره نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بوده و همچنین تعداد گلبول‌های قرمز در این گروه‌ها به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه‌های شاهد و تیمار ۰/۵ درصد ثبت گردید (P<۰/۰۵). به‌نظر می‌رسد عصاره گلرنگ می‌تواند باعث افزایش کنترل استرس ماهی کپور در مواجهه با شوری گردد.

واژه‌های کلیدی: گلرنگ، استرس شوری، شاخص‌های خونی، کپور معمولی

مقدمه

پاسخ به استرس یک مکانیزم سازشی است که به ماهی اجازه می‌دهد تا به مقابله با عوامل استرس‌زای دریافتی بپردازد، به‌عبارتی از این طریق وضعیت طبیعی یا هموستاتیک بدن خود را حفظ کند در بسیاری از موارد وجود استرس به تغییرات بالینی و تغییر علایم رفتاری منجر نمی‌شود اما تغییرات پاراکلینیکی مثل تغییرات خونشناسی در اکثر موارد قابل ردیابی است (بارتون و ایواما، ۱۹۹۱). در محیط‌های طبیعی استرس حاد ناشی از تغییرات محیطی کشنده کمتر اتفاق می‌افتد اما بروز استرس‌های مزمن و غیر کشنده از احتمال بیشتری برخوردار است.

استرس مزمن ممکن است موجب بسیاری از مشکلات سیستم‌های نگهداری ماهی نظیر افزایش سرعت متابولیک و مصرف انرژی، کاهش میزان رشد، اختلال در سیستم ایمنی و ممانعت از رسیدگی گناد و تخم‌ریزی باشد (پلنتی و همکاران، ۲۰۰۳). استرس شوری یکی از عوامل محیطی است که بر فیزیولوژی، جذب غذا و کارایی رشد در گونه‌های مختلف آبزیان می‌تواند تأثیرگذار باشد (رابیو و همکاران، ۲۰۰۵).

بررسی فاکتورهای خونی یکی از روش‌های شایع و کاربردی در شناسایی تغییرات فیزیولوژیکی ماهیان است به‌عبارت دیگر در اکثر استرس‌های محیطی پیش از آنکه تغییرات رفتاری و علایم بالینی مشاهده شود تغییر پارامترهای خونشناسی و سرولوژیکی قابل ردیابی است، در استرس‌های ناشی از تغییرات شوری محیط، ماهیان باید بتوانند شرایط اسمزی بدن را حفظ کنند و در این راستا معمولاً

تغییر در برخی شاخص‌های خونی رخ می‌دهد و چنانچه ماهی نتواند این تغییرات را اصلاح کند منجر به ضعف و در نهایت مرگ می‌شود (کلوس و همکاران، ۲۰۰۸)

ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* از گونه‌های اقتصادی دریای خزر است که منبع غذایی مهمی محسوب می‌گردد. هرچند این‌گونه به‌صورت بومی و طبیعی در تمام سواحل دریای خزر وجود دارد و برای تولید مثل وارد مصب رودخانه‌ها می‌شود، اما در سال‌های اخیر به‌دلیل صید بی‌رویه، افزایش آلودگی‌ها، تخریب بستر رودخانه‌ها و از بین رفتن محل‌های تولیدمثل، جمعیت آن کاهش پیدا کرده‌است (قلیچپور و همکاران، ۲۰۱۰). برای جبران این مسئله و به‌منظور بازسازی ذخایر سازمان شیلات ایران اقدام به تکثیر مصنوعی این ماهی می‌تماید این بچه ماهیان تا مرحله انگشت قد در استخرهای خاکی آب شیرین پرورش یافته و سپس در نزدیک مصب رودخانه‌های منتهی به دریا رهاسازی می‌گردند. با توجه به کم‌آبی کلی کشور و منطقه در سال‌های اخیر یکی از استرس‌هایی که در هنگام رهاسازی این ماهیان ممکن است با آن مواجه شوند شوری محیط است و هرچه توان حفظ شرایط اسمزی این ماهیان بیشتر باشد زنده‌مانی آن‌ها افزایش می‌یابد.

استفاده از برخی مکمل‌ها و ترکیبات در بسیاری از موارد توان مقابله و ایمنی ماهیان را در مواجهه با استرس‌های محیطی افزایش می‌دهد که در این راستا در سال‌های اخیر به عصاره‌های گیاهی توجه بیشتری شده است.

(هاریکریشان و همکاران ۲۰۱۱؛ یلماز و همکاران ۲۰۱۲) گیاه گلرنگ *Carthamus tinctorius* متعلق به خانواده Compositae است که از ۲۵۰۰ سال پیش به‌دلیل اثرات درمانی خاص مورد توجه انسان بوده‌است (لی و همکاران ۲۰۱۳). در حال حاضر بیش از ۲۰۰ ترکیب از این گیاه استخراج و شناسایی شده که شامل کینوکالکون‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، اسیدهای آلی، گلوکوزیدهای آروماتیک و غیره می‌باشند (فان و همکاران، ۲۰۰۹). با وجود این ترکیبات اثرات متعددی برای این گیاه مثل گشادکننده عروق کرونری، بهبود ایسکمی عضله قلب، ضد ترومبوز، ضد هیپوکسی، ضد فیبروزکبدی، آنتی‌اکسیدان، ضد پیری، تعدیل سیستم ایمنی، ضد انعقاد، ضد تومور، ضد درد، ضد التهاب، ضد دیابت و غیره در انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیان شده است (زو و همکاران ۲۰۱٤).

علی‌رغم تأیید اثرات متفاوت این گیاه دارویی در مدل‌های آزمایشگاهی نظیر موش‌های آزمایشگاهی و صحرایی، خرگوش و حتی انسان‌ها، در رابطه با اثرات استفاده از این گیاه دارویی در

ماهیان مطالعه‌ای صورت نگرفته است. لذا در بررسی حاضر شاخص‌های خونی بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با عصاره گیاه گلرنگ در مواجهه با شوری تحت کشنده مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و طرح آزمایش: این پژوهش از آبان ۱۳۹٤ به‌مدت ۳ ماه در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهیدفضلی برآبادی دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تعداد ۲۵۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۰/۳۵±۹/٤٦ از کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال در استان گلستان تهیه و به‌مدت دوهفته در مخازن ۱۰۰۰ لیتری به‌منظور آداپتاسیون نگهداری شدند. آزمایش به‌صورت کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در هر سطح، به‌مدت ۱۰ هفته انجام شد. به‌این منظور پس از دوره سازگاری ماهیان در ۱۲ آکواریوم با ابعاد ٦۰×٤۰ با ارتفاع آبگیری ۳۰ سانتی‌متر تقسیم شدند (۲۰ ماهی در هر آکواریوم). ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن، ۲ بار در روز تغذیه می‌شدند. هر ۱۵ روز یک‌بار بیومتری و مقدار غذادهی براساس آن تنظیم می‌شد. مدفوع و دیگر مواد باقی‌مانده هر روز صبح از مخازن سیفون می‌شد. در طول دورهٔ پرورش دمای آب ۰/٤±۱۷ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول در آب ۰/۱±۷/۱ میلی‌گرم در لیتر و pH آب ۰/۲±۸ بود.

تهیه عصاره گلرنگ: گل‌های گلرنگ در تیرماه ۱۳۹٤ از مزارع کشاورزی شرق اصفهان برداشت و سپس در سایه و در دمای اتاق خشک و پودر گردیدند. ۱۰۰۰ گرم از پودر به‌دست آمده درون ظروف پلاستیکی بزرگ ریخته شد و به آن اتانول ۹٦ درصد اضافه گردید به گونه‌ای که سطح پودر را بپوشاند و بعد از ٤۸ ساعت محلول صاف شد. در مرحله بعد به تفاله باقی‌مانده اتانول ۷۰ درصد اضافه و بعد از ۲٤ ساعت صاف گردید. محلول‌های صاف شده، مخلوط و در دستگاه آون معمولی (دمای ٤۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از تبخیر آب و الکل عصاره غلیظ و قیری شکلی به‌دست آمد که تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (اردموگلو و همکاران، ۲۰۰۳).

تهیه جیره غذایی: در این آزمایش چهار سطح عصاره گلرنگ شامل صفر (تیمار شاهد)، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ درصد عصاره به پودر خوراک اکسترود کپور معمولی تهیه شده از شرکت فرادانه اضافه و توسط چرخ گوشت پلت‌های مورد آزمایش ساخته شد. سپس پلت‌های مرطوب به‌مدت دو روز در هوای اتاق قرار

داده شد تا خشک گردد. پس از آن جیره‌ها در بسته‌بندی‌های مناسب تا زمان مصرف در یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و هنگام استفاده برای تغذیه، به‌صورت دستی به قطعات کوچک (سایز دهان ماهی) شکسته و به بچه ماهیان داده شد.

تنش شوری و فرایند خونگیری: پس از ۷۰ روز تغذیه با سطوح مختلف عصاره گیاه گلرنگ، ماهیان با شوری تحت کشنده ۱۰ گرم در لیتر (در مقیاس آزمایشی سطح کشنده برای این ماهیان ١٦ گرم در لیتر برای ٩٦ ساعت به‌دست آمد) به‌مدت ۷۲ ساعت مورد مواجهه قرار گرفتند و تغییرات خون‌شناسی در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. برای انجان بررسی‌های خون‌شناسی در ٤ زمان مختلف از ماهیان خونگیری انجام شد که شامل قبل از تنش شوری (خونگیری اول) ٦ ساعت پس از تنش (خونگیری دوم)، ٢٤ ساعت پس از تنش (خونگیری سوم) و ۷۲ ساعت پس از تنش (خونگیری چهارم) بود.

در هر کدام از دوره‌های خونگیری، از هر تیمار ۷ عدد ماهی به‌صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی آغشته به هپارین از ساقه دمی خونگیری شد و نمونه‌های خون به تیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی انتقال یافته و مورد بررسی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی: تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون با استفاده از لام نئوبار و بعد از رقیق‌سازی خون با محلول دایس شمارش شدند. مقدار هموگلوبین خون از کیت تجاری زیست شیمی و به روش سیان‌مت هموگلوبین و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Biochrom, libra S12) و در طول موج ٥٤٦ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار هماتوکریت نیز از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. برای این کار ابتدا لوله‌های مخصوص هماتوکریت (لوله‌های مویینه هپارینه) را از نمونه‌های خون پر کرده و سر لوله‌ها با استفاده از خمیر هماتوکریت بسته شد. سپس لوله‌ها درون دستگاه سانتریفیوژ میکروهماتوکریت (۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰) قرار داده شد. در نهایت با استفاده از خط‌کش هماتوکریت، مقدار هماتوکریت اندازه‌گیری شد (دایس و لوایس ۲۰۰۱).

روش‌های آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام شد و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن (Dancan) استفاده شد. اختلاف بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید. برای عملیات آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید.

نتایج

نتایج اثر سطوح مختلف عصاره گیاه گلرنگ روی شاخص‌های خونی بچه ماهیان کپورمعمولی تحت تنش شوری ppt ۱۰ و در زمان‌های مختلف قبل و بعد از قرارگیری در معرض شوری به‌صورت زیر ارائه شده است در طی دوره تنش شوری هیچ تلفاتی در ماهیان مورد بررسی مشاهده نگردید:

جدول ۱- تغییرات تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) بچه ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه گلرنگ تحت تنش شوری ppt ۱۰.

گلبول قرمز (mm3×106)	شاهد	تیمار عصاره ۰/۵ درصد	تیمار عصاره ۱/۵ درصد	تیمار عصاره ۳ درصد
قبل از تنش	۱/۲۱±۰/۰۲$^{b\ A}$	۱/۱۰۱±۰/۰۳$^{b\ B}$	۱/۰٦±۰/۰۵$^{a\ B}$	۱/۱±۰/۰۹$^{a\ B}$
٦ ساعت پس از تنش	۱/۳۲٦±۰/۰۵$^{a\ A}$	۱/۲۳۸±۰/۰۵$^{a\ AB}$	۱/۱±۰/۰۹$^{a\ C}$	۱/۱۵۸±۰/۰٤$^{a\ BC}$
۲٤ ساعت پس از تنش	۱/۰۳۷±۰/۰۵$^{c\ A}$	۱/۰۳۵±۰/۱$^{bc\ A}$	۰/۹۱۳±۰/۰۹$^{b\ B}$	۰/۹٤±۰/۰۵$^{b\ AB}$
۷۲ ساعت پس از تنش	۰/۹٦۷±۰/۰۲$^{c\ A}$	۰/۹٤۹±۰/۰۵$^{c\ AB}$	۰/۹۲۵±۰/۰۲$^{b\ B}$	۰/۹۲٤±۰/۰۲$^{b\ B}$

حروف انگلیسی بزرگ غیرمشابه در هر ردیف و حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵ است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

طبق جدول ٤-۱ نتایج نشان دادند که در زمان پیش از مواجهه شوری تعداد گلبول‌های قرمز بین تیمار ۱ (شاهد) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۵). در زمان ٦ ساعت پس از تنش نسبت به زمان پیش از تنش شوری در همه تیمارها گلبول‌های قرمز افزایش پیدا کرد که این افزایش تعداد فقط در تیمار ۱ و ۲ معنادار بود (P<۰/۰۵). سپس در زمان‌های ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از تنش، روند کاهشی معناداری در همه تیمارها مشاهده شد (P<۰/۰۵). کمترین تعداد گلبول‌های قرمز در تمام مراحل خون‌گیری مربوط به تیمار ۳ و بیشترین تعداد مربوط به تیمار ۱ بود. به صورتی‌که در همه مراحل خونگیری بین تیمار ۱ و ۳ اختلاف معناداری وجود داشت (P<۰/۰۵).

جدول ۲- تغییرات غلظت هموگلوبین خون بچه ماهیان کپورمعمولی تغذیه‌شده با سطوح مختلف عصاره گیاه‌گلرنگ تحت تنش شوری ۱۰ppt.

هموگلوبین (گرم/ دسی‌لیتر)	شاهد	تیمار عصاره ۰/۵ درصد	تیمار عصاره ۱/۵ درصد	تیمار عصاره ۳ درصد
قبل از تنش	۹/۷۳±۰/۷۹ a A	۹/۴۲±۰/۴۷ b A	۱۰/۵۴±۰/۹۳ b A	۱۰/۰۴±۰/۶۲ b A
٦ ساعت پس از تنش	۱۰/۰۴±۰/۴۱ a B	۱۰/۵۵±۰/۸۴ ab B	۱۲/۲۸±۰/۴۱ a A	۱۰/۱۲±۰/۹۵ b B
۲٤ ساعت پس از تنش	۹/٦±۰/٦۱ a B	۹/۷۹±۰/۵٤ b B	۱۲/۱۷±۰/۳٦ a A	۱۲/۰٦±۰/۷٤ a A
۷۲ ساعت پس از تنش	۱۰/٦±۰/٦٦ a B	۱۱/۱۸±۰/۳٦ a AB	۱۱/۷۸±۰/۲٤ a A	۱۱/۵۷±۰/۲۲ a A

حروف انگلیسی بزرگ غیرمشابه در هر ردیف و حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵ است. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است.

با بررسی مقدار هموگلوبین در زمان پیش از تنش شوری اختلاف معناداری در بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با ایجاد تنش شوری ٦ ساعت پس از مواجهه افزایش معنی‌دار فقط در تیمار ۳ مشاهده شد (P<۰/۰۵). افزایش هموگلوبین در تیمارهای ۲ و ٤ نیز در خونگیری‌های بعدی معنی‌دار شد (P<۰/۰۵) ولی در تیمار ۱ تفاوت معنی‌داری در تمام مراحل خونگیری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقدار هموگلوبین تیمار ۳ نسبت به تیمار ۱ در تمام مراحل خونگیری معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). همچنین در زمان‌های ۲٤ و ۷۲ ساعت تنش شوری، بین تیمار ٤ با تیمار ۱ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۳- تغییرات غلظت هماتوکریت بچه ماهیان کپورمعمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه گلرنگ تحت تنش شوری ۱۰ ppt.

هماتوکریت (درصد)	شاهد	تیمار عصاره ۰/۵ درصد	تیمار عصاره ۱/۵ درصد	تیمار عصاره ۳ درصد
قبل از تنش	۳۲±۱ c B	۳٤/۵±۱/۸ c AB	۳۵/۵±۱/۳۲ a A	۳۲±۱/۷۳ b B
٦ ساعت پس از تنش	۳٦/۵±۰/۸٦ b A	۳۸/۱٦±۱/۲۵ ab A	۳۸/۳۳±۱/۵۳ a A	۳٦/۳۳±۰/۵۸ a A
۲٤ ساعت پس از تنش	۳۸/۸۳±۰/٤۷ a A	۳٦/۱٦±۱/۸۹ bc AB	۳۵/۸۳±۲/۰۲ a B	۳٦/۰٦±۰/۹ a B
۷۲ ساعت پس از تنش	۳۸/۲۳±۰/۷۵ ab A	۳۹/٦٦±۱/۵۳ a A	۳۸/۱٦±۱/۰٤ a A	۳۷/۸۳±۱/۰٤ a A

حروف انگلیسی بزرگ غیرمشابه در هر ردیف و حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵ است. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است.

مقدار هماتوکریت نیز زمان پیش از تنش بین تیمار ۳ با تیمار ۱ و ٤ اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بعد از تنش شوری افزایش معنی‌داری در مقدار هماتوکریت تیمارهای ۱، ۲ و ٤ نسبت به قبل از شوری (خونگیری اول) مشاهده شد (P<۰/۰۵) ولی در تیمار ۳ افزایش معنادار نبود (P>۰/۰۵). با این وجود در زمان‌های ۲٤ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) ولی در خونگیری سوم، بین تیمار ۱ با تیمار ۳ و ٤ اختلاف معنادار شد (P<۰/۰۵).

جدول ٤- تغییرات تعداد گلبول‌های سفید (WBC) بچه ماهیان کپورمعمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره گیاه‌گلرنگ تحت تنش شوری ppt ۱۰.

گلبول سفید ($mm^3 \times 10^3$)	شاهد	تیمار عصاره ۰/۵ درصد	تیمار عصاره ۱/۵ درصد	تیمار عصاره ۳ درصد
قبل از تنش	۹±۰/٤$^{b\,C}$	۹/۸±۰/۲$^{b\,B}$	۹/٦٦±۰/۳$^{b\,B}$	۱۱/۰٦±۰/٤۱$^{a\,A}$
٦ ساعت پس از تنش	٦/۳۳±۰/۳$^{c\,B}$	۷/٦٦±۰/٤۱$^{c\,A}$	۷/۰٦±۰/٤۱$^{c\,A}$	۷/۲٦±۰/۳$^{b\,A}$
۲٤ ساعت پس از تنش	۱۱/٦±۰/٦$^{a\,A}$	۱۱/۸٦±۰/٦۱$^{a\,A}$	۱۱/۲٦±۱/۳۳$^{a\,A}$	۱۱/۰٦±۰/٦۱$^{a\,A}$
۷۲ ساعت پس از تنش	۱۱/٥٦±۰/۳۷$^{a\,A}$	۱۱/٤٦±۰/۳$^{a\,A}$	۱۰/۷۳±۰/٤۱$^{a\,B}$	۱۰/۳۳±۰/٤۲$^{a\,B}$

حروف انگلیسی بزرگ غیرمشابه در هر ردیف و حروف انگلیسی کوچک غیرمشابه در هر ستون، بیانگر اختلاف معنادار در سطح ۰/۰۵ است. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

در تعداد گلبول سفید قبل از مواجهه با تنش شوری کمترین تعدا در گروه شاهد اندازه‌گیری شد (P<۰/۰۵). همچنین بین تیمارهای ۲ و ۳ با تیمار ٤ اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) به صورتی‌که بیشترین تعداد گلبول‌های سفید مربوط به تیمار ٤ و بود. با ایجاد تنش شوری، ٦ ساعت پس از مواجهه تعداد گلبول‌های سفید نسبت به خونگیری اول به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵). همچنین ۲٤ ساعت پس از مواجهه بین تیمار ۱ با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در زمان ۷۲ ساعت پس از مواجهه، تعداد گلبول‌های سفید دوباره افزایش یافت به صورتی‌که در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ همین خونگیری نسبت به زمان پیش از تنش شوری نیز افزایش معنی‌دار شد (P<۰/۰۵). در تعداد گلبول سفید در تمامی تیمارهای مورد بررسی در زمان ۲٤ ساعت

پس از تنش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) اما در اندازه‌گیری این پارامتر در زمان ۷۲ ساعت پس از مواجهه بین تیمار ۳ و ٤ با تیمار ۱ و ۲ اختلاف معنی‌دار ثبت گردید (P<۰/۰۵).

بحث

تغییر در شاخص‌های خون‌شناسی از جمله واکنش‌هایی است که جانور در پاسخ به تنش از خود نشان می‌دهد. بخشی از این تغییرات مانند تغییر در اندازه سلول و میزان ذخیره هموگلوبین وابسته به ویژگی‌های گلبول قرمز است و بخشی دیگر به غلظت پلاسما بستگی دارد که می‌تواند اثر خود را به‌صورت تغییر در تعداد گلبول‌ها در واحد حجم و همچنین تغییر میزان هماتوکریت نشان دهد (میلیگان و وود ۱۹۸۱). با استفاده از مطالعات خون‌شناسی می‌توان تغییرات ایجاد شده در بافت‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی به وجود آمده در ماهی را تعیین نمود (یزدانی و همکاران ۲۰۱۳).

در این مطالعه با ایجاد تنش شوری افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون مشاهده شد که با یافته‌های روزانی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که استرس شوری و دما باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون در بچه ماهیان کپور معمولی شده است. همچنین صلاتی و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش شوری باعث افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین می‌شود. بابایی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۳) بیان داشت که افزایش تعداد گلبول‌های قرمز نشان‌دهنده افزایش میزان استرس در ماهیان است.

تعداد گلبول‌های قرمز قبل از تنش شوری در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای عصاره افزایش معنی‌داری را نشان داد. دادوران و همکاران (۲۰۱۳) و همچنین بهلویی اسکار و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از عصاره‌های گیاهی باعث افزایش برخی شاخص‌های خونی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شده است. نتایج این دو تحقیق در رابطه با اثر گیاهان دارویی در افزایش تعداد گلبول‌های قرمز با تحقیق حاضر همخوانی ندارد. همچنین علیشاهی و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثرات لوامیزول، ارگوسان و سه عصاره گیاهی سرخارگل، کندر و آویشن در ماهی کپور معمولی نشان دادند که تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای تغذیه شده با عصاره‌های نام برده شده فاقد تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد بود.

در تحقیق حاظر تعداد گلبول‌های سفید در خونگیری اول در تیمارهای عصاره نسبت به تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار بود. بابایی‌نژاد و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که بتافین و سیلی‌مارین اثر

معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. همچنین خانساری و همکاران (۲۰۱۲) و هاریکریشان و همکاران (۲۰۰۳) نتایج مشابهی ارائه دادند که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. بالا بودن تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای عصاره نسبت به تیمار شاهد می‌تواند نشان‌دهنده تحریک سیستم ایمنی در ماهیان تغذیه شده با عصاره باشد. به‌نظر می‌رسد اثر عصاره در افزایش تحریک و تقویت سیستم ایمنی ماهی به واسطه تحریک اندام تولیدکننده گلبول سفید می‌باشد (رازی و همکاران ۲۰۱۳).

از جمله عوامل مؤثر بر تعداد گلبول‌های سفید می‌توان به استرس، بیماری، عوامل آلاینده، تغذیه، شرایط اکولوژیک، سن و جنس اشاره کرد (چارمن ۱۹۹٦). در این مطالعه تنش شوری باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید در همه تیمارها شد. کاهش تعداد گلبول‌های سفید ممکن است به دلیل ترشح اپی‌نفرین در طول استرس و افزایش هورمون‌های استرس مثل کورتیزول باشد (دیویس و همکاران ۲۰۰۸). در مطالعه‌ای اولاده و اوگینی (۲۰۱۰) نشان دادند که تعداد گلبول‌های سفید گربه ماهی آفریقایی *Clarias gariepinus* تحت تأثیر استرس فلزات سنگین کاهش می‌یابد. آن‌ها گزارش کردند که افزایش هورمون‌های استرس باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید شده است.

هماتوکریت خون به‌عنوان یک شاخص مهم و رایج در تعیین سلامت و بیماری ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (هوستون و رافر ۱۹۹۷). براساس برخی مطالعات میزان هماتوکریت در ماهی تحت تأثیر استرس‌های فیزیکی افزایش می‌یابد (بارتون و همکاران ۱۹۸۵). حافظ امینی و عریان (۲۰۰۲) با مطالعه روی تغییرات شاخص هماتوکریت در ماهیان جوان کپورمعمولی تحت استرس شوری گزارش کردند که میزان هماتوکریت خون پس از ایجاد تنش شوری افزایش می‌یابد. جنسن و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه روی کفشک ماهی اروپایی *Platichthy flesus* تحت تنش شوری گزارش کردند که استرس شوری موجب افزایش شاخص هماتوکریت در این ماهی می‌شود. همچنین ییلدیز و اوزبیلک (۲۰۰۱) گزارش کردند که، افزایش شوری سبب افزایش میزان هماتوکریت در ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) گردید. در تحقیق حاضر نیز میزان هماتوکریت پس از قرا گرفتن تحت تنش شوری افزایش یافت. تغییر در شوری منجر به افزایش متابولیسم پایه و در نهایت افزایش نیاز اکسیژن ماهی می‌شود (ماکسیم و همکاران ۱۹۹۰). بنابراین افزایش میزان هماتوکریت را جهت افزایش منابع اکسیژن برای اندام‌های در پاسخ به درخواست متابولیک بیشتر در طی استرس

ایجاد شده می‌توان توجیه نمود. این افزایش می‌تواند عکس‌العملی بر پاسخ به استرس باشد این افزایش ممکن است به‌علت جذب آب در گلبول های قرمز نیز باشد (میلگان و وود ۱۹۸۲).

همچنین نتایج این تحقیق نشان‌دهنده بالا بودن مقدار هماتوکریت در تیمارهای ۰/۵ و ۱/۵ درصد عصاره قبل از تنش شوری بوده است. بهلویی و اسکای (۲۰۰۱۲) نشان دادند که استفاده از گیاه سرخارگل (اکیناسه) باعث افزایش هماتوکریت می‌شود. در تحقیق دیگری داروکو و همکاران (۲۰۰۹) اثرات زیره سیاه بر روی پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. نتایج نشان‌دهنده افزایش هماتوکریت و تعداد سلول‌های لکوسیت خون در تیمار ۲/۵ درصد زیره سیاه بوده است. همچنین احمد و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر پودر دارچین بر افزایش درصد هماتوکریت را گزارش کردند.

تقریباً قسمت عمده اکسیژنی که در خون حیوانات حمل می‌گردد به هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز خون متصل می‌باشد (کلائوس و همکاران، ۲۰۰۸). افزایش غلظت هموگلوبین بر قابلیت انتقال گازهای تنفسی در خون، بازده قلب و افزایش وزن ماهی مؤثر است (کازرانی فراهانی ۲۰۰۹). در تحقیق حاضر تغییر معنی‌داری در مقدار هموگلوبین تیمارها قبل از تنش شوری مشاهده نشد. رازی و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی مشابه نشان دادند که پودر دارچین تغییری در هموگلوبین خون ماهی گرین‌ترور ایجاد نکرد. همچنین علیشاهی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که هموگلوبین در ماهیان تغذیه شده با عصاره‌های گیاهی تغییر معنی‌داری نداشت.

پس از تنش شوری نیز تغییر معنی‌داری در هموگلوبین تیمار شاهد در هیچ یک از دوره‌های خونگیری مشاهده نشد ولی در تیمارهای عصاره مقدار هموگلوبین افزایش معنی‌داری مشاهده شد. مصباح و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی استرس شوری بلند مدت بر شاخص‌های خونی ماهی بنی نشان دادند که مقدار هموگلوبین در مدت ۲۱ روز روند افزایشی داشته است. بعضی نویسندگان افزایش هماتوکریت و هموگلوبین را به‌دلیل افزایش ظرفیت حمل اکسیژن خون تحت شرایط استرس مزمن که درخواست انرژی بالا در ماهی را تحمیل می‌کند، می‌دانند. در بررسی حاضر به‌نظر می‌رسد ماهیان با حفظ و افزایش هموگلوبین خون قادر بوده‌اند با تعداد کمتری از گلبول‌های خونی نیاز اکسیژنی و استرسی پیش آمده را تأمین نمایند به گونه‌ای که ۷۲ ساعت پس از تنش شوری در ماهیان تغذیه شده با عصاره، مقادیر هموگلوبین بالاتر بوده و تعداد گلبول قرمز آن‌ها کمتر از گروه شاهد اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت افزودن عصاره گلرنگ در غلظت ۱/۵ درصد جیره باعث کمک به حفظ بهتر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی کپور معمولی در مواجهه با تنش شوری تحت کشنده می‌شود. هرچند که برای اظهار نظر قطعی در این زمینه بررسی‌های تکمیلی کمک کننده خواهد بود.

منابع

1. Ahmad, M.H., El Mesallamy, A.M.D., Samir, F., and Zahran, F. 2011. Effect of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) on Growth Performance, Feed Utilization, Whole-Body Composition, and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia. Journal of Applied Aquaculture. 23: 289–298.
2. Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., and Zargar, A. 2011. Safety and growth stimulating effects of Levamisole, Oragusan and three plant extracts in common carp. Journal of Veterinary Research. (67)2: 135-142. (In Persian)
3. Babaii Nezhad, L., Bahrkazemy, M., Saeedi, A.A., and Khan Zamany Mohammadi, M. 2013. Effects of two anesthetic lidocaine, sodium bicarbonate and herbal clove oil on blood parameters and cortisol in broodstock of white fish of Caspian Sea (*Rutilus frisiikutum*). Breeding and Aquaculture Sciences Journal. (2)1: 11-22. (In Persian)
4. Barton, B.A., and Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases. 1: 3-26.
5. Barton, B.A., Weiner, G.S., and Schreck, C.B. 1985. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdnen*) to acute handling stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 42: 710-717.
6. Bohlouli Oskoii, S., Tahmasebi Kohyani, A., Parseh, A., Salati, A.P., and Sadeghi, E. 2012. Effects of dietary administration of Echinacea purpurea on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish physiology and biochemistry. 38(4): 1029-1034.
7. Clauss, T.M., Dove, A.D.M., and Arnold, J.E. 2008: Hematologic Disorders of Fish. Veterinary Clinic of North America Exotic Animal Practice. 11(3): 445-462.
8. Dacie, J.V., and Lewis, S.M. 2001. Practical Haematology. 9th edition. Churchill Livingstone, London, 633p.

9. Dadvaran, S.P., Ghaeni, M., and Askari Sari, A. 2013. The effect of garlic (*Allium sativum*) extract on some blood and immune indices fish trout fingerlings. Journal of Herbal Drugs. (4)4: 162-169. (In Persian)
10. Davis, A.K., Maney, D.L., and Maerz, J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology. 22(5): 760-772.
11. Dorucu, M., Ozesen Colak, S., Ispir, U., Altinterim, B., and Celayir, Y. 2009. The Effect of Black Cumin Seeds, *Nigella sativa*, on the Immune Response of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Mediterranean Aquaculture. 2(1): 27-33.
12. Erdemoglu, N., Kupeli, E., and Yesilada, E. 2003. Anti–inflammatory and antinociceptive assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 89: 123–129.
13. Fan, L., Zhao, H.Y., Xu, M., Zhou, L., Guo, H., Han, J., and Guo, D.A. 2009. Qualitative evaluation and quantitative determination of 10 major active components in *Carthamus tinctorius L*. by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. Journal of Chromatography A. 1216(11): 2063-2070.
14. Francis-Floyd, R. 2009. Stress- Its Role in Fish Disease. University of Florida, IFAS Extension, 1-4.
15. Ghahraman, A. 1996. Caryofits in Iran (Plant Systematics), Press Center, Tehran University, the second volume, 187p. (In Persian)
16. Ghasemi Pirbalooti, A., Pir Ali, A., Pishkar, Gh.R., Jalali, S.M.A., Raisi, M., Jafarian dehkordi, M., and Hamedi, b. 2011. The effect of several medicine herb on the immune system of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*). Journal of Herbal Medicines. 2: 149-155. (In Persian)
17. Ghelichpour, M., Shabani, A., and Shabanpour, B. 2010. Genetic diversity of the two populations of common carp (*Cyprinus carpio*) in Gharahsu and Anzali regions using eight microsatellite markers. Taxonomy and Biosystematics. 5: 41-48. (In Persian)
18. Hafez Amini, P., and Oryan, Sh. 2002. Effects of sodium chloride stress on hematocrit and hemoglobin in common carp. Iranian Scientific Fisheries Journal. (3)11: 13-22. (In Persian)
19. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., and Heo M.S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture. 317: 1-15.
20. Harikrishnan, R., NishRani, M., and Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41–50.
21. Houston, A.H., and Rupert, R. 1997. Immediate response of hemoglobin system of gold fish (*Cyprinus auratus*) to tempera change. Canadian Journal of Zoology. 54: 1731-1741.

22. Jensen, F.B., Lecklin, T., Busk, M., Bury, N.R., Wilson, R., Wood, C.M., and Grosell, M. 2002. Physiology impact of salinity increase at organism and red blood cell levels in European flounder (*Platichthy flesus*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 274: 159-174.
23. Kazerani Farahani, M. 2009. Evaluation of some haematological parameters in some of the fish family Acipenseridae. Journal of Animal Biology. (1)2: 57-61. (In Persian)
24. Khansari, A., Yavari, V., Alishahi, M., Mousavi, S.M., Ghorbanpoor, M., Bastami, K.D., and Azizi, S. 2013. Effects of *Oliviera decumbens* and *Satureja khuzestanica* extract on some immunological and haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Comparative Clinical Pathology. 22(3): 339-342.
25. Li, H.X., Han, S.Y., Wang, X.W., Ma, X., Zhang, K., Wang, L., and Tu, P.F. 2009. Effect of the carthamins yellow from *Carthamus tinctorius L*. on hemorheological disorders of blood stasis in rats. Food and Chemical Toxicology. 47(8): 1797-1802
26. Maxime, V., Peyraud-Waitzenegger, M., Claireaux, G., and Peyraud, C. 1990. Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid– base status and 02 affinity of haemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar L*.). Journal of Comparative Physiology. 160: 31– 39.
27. Mesbah, M., Mohammadian, T., Karami, A., Molayem Raftar, T., and Nazari, M. 2015. The effects of Salinity on some blood parameters and cortisol in Benny fish (*Mesopotamichthys Sharpeyi*). Journal of Aquatic Ecology, (2)5: 68-78. (In Persian)
28. Milligan, C.L., and Wood, C.M. 1982. Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Journal of Experimental Biology. 99: 397-415.
29. Ololade, I.A., and Oginni, O. 2010. Toxic stress and hematological effects of nickel on African catfish, *Clarias gariepinus*, fingerlings. Journal of environmental chemistry and Ecotoxicology. 2(2): 014-019.
30. Plante, S., Audet, C., Lambert, Y., and Deianone, J. 2003. Capmarision of stress responses in wild and captive winter flouder (*Pseudopleuronectes americanus walbaum*) brood stock. Aquaculture Research. 34: 803- 812.
31. Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L., and Schreck, C.B. 2006. Whole- body Cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. Aquaculture. 258: 565- 574.
32. Roozi, E., Mooraki, N., Zorriye Zahra, S.G., and Haghighi, M. 2013. The effect of cinnamon in the diet of fish on Green Terror indices, blood, blood glucose and survival. Breeding and Aquaculture Sciences Journal. (3)1: 41-52. (In Persian)

33. Rozani, S.A., Haghi, N., and Avarje, S. 2013. The effects of salinity and temperature stress on blood factors of Common carp fry. Aquatic Physiological and Biotechnology. (2)1: 1-19. (In Persian)
34. Rubio, V.C., Sánchez- Vázquez, F.J., and Madrid, J.A. 2005. Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. Physiology and Behavior. 85(3): 333-339.
35. Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. 172: 63-92.
36. Salati, A.P., C., Baghyan Zade, A., Soltani, M., Peyghan, R., and Riyazi, Gh. 2010. Haematological parameters and plasma metabolic response to different salinity levels in common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian journal of veterinary medicine. (2)4: 49-52. (In Persian)
37. Yazdani Sadati, M.A., Hoshyar, E., Bany, A., Kazemi, R., Hallajian, A., and Poordehqhan, M. 2013. The study seasonal changes blood indices of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in the enclosure Journal of exploitation and aquaculture. (2)2: 17-32. (In Persian)
38. Yildiz, H.Y., and Uzbilek, M.K. 2001. The evaluation of secondary stress response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after exposing to the saline water. Fish Physiology and Biochemistry. 25: 287-292.
39. Yilmaz, S., Ergün S., and Türk, N. 2012. Effects of cumin-supplemented diets on growth and disease (*Streptococcus iniae*) resistance of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Journal of Aquaculture. 64: 1-5.
40. Zhou, X., Tang, L., Xu, Y., Zhou, G., and Wang, Z. 2014. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius L*. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. Journal of ethnopharmacology. 151(1): 27-43.