فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال دوم/ شماره دوم/ بهار۹۳/ صفحات۷۰-۵۹

مطالعه فاکتورهای خونی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) پس از اضافه‌کردن عصاره هیدروالکلی گیاه اسفرزه (*Plantago ovata*)

محمدجواد محمدی*[۱]، مجتبی علیشاهی[۲]، امیر آرامون[۳]، رضا جهان‌تیغ[۴]

چکیده

در دهه اخیر پرورش ماهی توانسته بخشی از نیازهای پروتئینی بشر را فراهم کند. با توجه به اهمیت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* در آبزی پروری، افزایش بیماری‌های عفونی در مزارع پرورشی و همچنین عدم کارایی داروهای سنتزی، بر آن شدیم تا تأثیر عصاره گیاه اسفرزه *Plantago ovata* بر فاکتورهای خونی که یکی از نشانه‌های سلامت ماهی می‌باشد را مورد بررسی قرار دهیم. این تحقیق در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی یاسوج اجرا شد.۳۶۰ قطعه بچه‌ماهی با وزن متوسط ۵/۲۳±۳۰ گرم به چهار تیماردر سه تکرار تقسیم گردیدند. تیمارها باغذای حاوی صفر(کنترل)، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد عصاره به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد برخی فاکتورهای خونی تحت تأثیر عصاره قرار گرفتند بطوری‌که بین هماتوکریت، گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی(MCV) در تیمار ۱ درصد و کنترل افزایش معنی‌داری وجود دارد($P<۰/۰۵$). گلبول‌های سفید تحت تأثیر عصاره قرار نگرفتند($P>۰/۰۵$). می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی اسفرزه بر فاکتورهای خونی مربوط به گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلا تأثیر مثبتی دارد.

کلید واژه: اسفرزه، قزل‌آلای رنگین کمان، فاکتورهای خونی.

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، خوزستان، ایران(نویسنده مسؤول)
mohammadimjm@gmail.com
۲- گروه شیلات، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
۳- گروه شیلات، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- گروه شیلات، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۱- مقدمه

در عصر حاضر، به دلیل محدودیت برداشت آبزیان از دریاها و اقیانوس‌ها، آبزی‌پروری در آب-های داخلی مورد توجه اکثر کشورها قرار گرفته است. همچنین جامعه جهانی، از بعد دیگری نیز به اهمیت تولید و مصرف آبزیان پی برده است و آن «موضوع کیفیت مناسب و ارزش غذایی گوشت ماهی نسبت به سایر فرآورده‌های غذایی» است. افزایش تقاضای ماهی در ابتدا به دلیل رشد سریع جمعیت، درآمد ناشی از این فعالیت و همچنین ارجحیت ماهی بر سایر پروتئین های حیوانی رشد این صنعت را تسریع کرده است. صنعت آبزی پروری باید مؤثر، سودآور و دارای حداقل اثرات زیست محیطی باشد. غذاها، عملیات غذادهی و تأمین عناصر اساسی در پایداری، سودآوری و مناسب بودن آبزی پروری مدرن تعیین کننده هستند، زیرا هزینه‌های غذا، حدود ۳۰٪ تا ۷۰٪ از کل هزینه های عملیاتی را شامل می‌شوند. علاوه بر آن، مشخص شده است که تغذیه نقش مهمی‌را در عملکرد سلامتی و مقاومت در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. در نتیجه، کیفیت غذا و مدیریت تغذیه بسیار حساس و حائز اهمیت است (ابراهیمی، ۱۳۸۵). در صنعت آبزی پروری عوامل بیماریزا از عوامل کاهش دهنده تولید می‌باشد. برای حل این مشکل امروزه از محرک‌های ایمنی مختلف استفاده می‌کنند و از آنجا که برخی گیاهان دارویی دارای خواص مفید و متعدد از جمله تحریک سیستم ایمنی، رشد، خوا‌W ضد باکتریایی، ویروسی و انگلی هستند استفاده از آنها در مزارع پرورش ماهی سبب بهبود تولید می‌گردد (قاسمی، ۱۳۸۸). داروهای گیاهی به دلیل عواملی ارزش اقتصادی و کم‌هزینه‌بودن تولید، نداشتن اثرات تخریبی برمحیط زیست، کم‌بودن عوارض در مقایسه با داروهای شیمیایی از ارزش وجایگاه خاصی در درمان برخوردار می‌باشند(قاسمی، ۱۳۸۸).

گیاه اسفرزه یکی از گیاهان دارویی متعلق به خانواده *Plantaginaceae* است که حدود ۲۵۰ گونه می‌باشد دو گونه مهم این جنس *Plantago psyllium* و*Plantago ovata* می‌باشند که هر دو در ایران تحت عنوان اسفرزه خوانده می‌شوند و دارای مصرف زیاد در صنعت و داروسازی هستند. گیاه اسفرزه بومی ایران، هند و کشورهای خاورمیانه است(امیدبیگی، ۱۳۷۴).

از مصارف مهم گیاه اسفرزه در طب سنتیمی‌توان به استفاده جهت کاهش اوره خون، فشارخون بالا، رفع یبوست، مسمومیت و به صورت موضعی در بهبود دمل ها اشاره نمود(شریفی و همکاران ۱۳۹۰). این گیاه در کاهش کلسترول خون و درمان التهاب و اختلالات صفراوی ناشی از مشکلات دستگاه گوارشی، مفید است(Hornok, 1992). دانه این گیاه دارای موسیلاژ[1] به میزان ۲۰ تا ۳۰ درصد، که بر روی دانه‌ها قرار گرفته و در اثر هیدرولیز تولید د-گزیلوزان[2]، آرابینوز[1]، د-گالاکتوز[2]، د-

1. Mucilage
2. D-xylose

گالاکتورونیک اسید[1] می‌نماید. همچنین دانه های اسفرزه دارای پروتئین، قند، روغن ثابت و تانن می‌باشد. روغن ثابت آن متشکل از گلیکوزیدی به نام آکوبین[3] و بازهای مختلف، قند، استرول و پروتئین می‌باشد روغن دانه محتوی اسید لینولئیک است (تبریزی و همکاران؛ ۱۳۸۳; Sujata*et al.*, 2011).

شکل ۱. دانه گیاه اسفرزه

اصولاً بهبود وضعیت فیزیولوژیک و ایمنی ماهی، به طرق مختلف در بهبود فاکتورهای رشد مؤثر است(Raa*et al.*,1992). بررسی فاکتورهای هماتولوژیک در ماهی، وسیله‌ای مناسب برای سنجش وضعیت سلامت ظاهری ماهی و بررسی اثرات احتمالی برخی مواد ضد تغذیه ای اهمیت دارد (Lin et al., 2011). به دلیل اثرات مفید برخی گیاهان دارویی اندمیک ایران بر وضعیت فیزیولوژیک و سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان (Dugenci*et al.*, 2003) و اهمیت پرورشی آن، بر آن شدیم تا اثرات عصاره گیاه اسفرزه را بر روی فاکتورها خونی این گونه بررسی کنیم. در این تحقیق اثرات عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه که دارای خاصیت ضد باکتریایی ثابت شده (شریفی و همکاران،۱۳۹۰؛ Rifat*et al.*, 2006, Anjana*et al.*, 2009؛ Motamedi*et al.*, 2010) و ویژگی های مربوط به تحریک ایمنی در حیوانات خونگرم است (Rezaeipoor*et al.*, 2000) بر فاکتورهای خونی بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت.

1. Arabinose
2. D-galactose
3. D-galacturonicacid
4. Aucubine

۲- مواد و روش ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انجام شد. تعداد ۳۶۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم از نظر ظاهری و با میانگین وزن ۵/۲۳ ±۳۰ گرم از یک مزرعه خصوصی خریداری و به سالن پرورش مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج انتقال داده شدند. ماهی به طور تصادفی در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۲۵۰ لیتری با جریان آب ۵ لیتر در دقیقه و دمای ۲±۱۲ در قالب چهار تیمار مختلف در سه تکرار، هر تکرار ۳۰ عدد ماهی در شرایط کاملاً یکسان (برای همه تیمارها و تکرارها) قرار داده شدند و به مدت یک هفته در تانک‌ها نگهداری و با غذای تجاری FFT خریداری شده از شرکت چینه تغذیه شدند تا با شرایط آزمایشگاهی سازگار شوند. این تحقیق طی یک دوره دو ماهه انجام شد که تیمارها با خوراک حاوی صفر(کنترل)، ۰/۱٪ ، ۰/۵٪ و ۱٪ عصاره اسفرزه تغذیه شدند. تهیه غذا بصورت تازه و بطور هفتگی با افزودن عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه تهیه شده در شرکت زردبند به غذا آماده می‌شد. در پایان دوره به صورت تصادفی از هر تکرار تعداد ۶ ماهی و در مجموع از هر تیمار ۱۸ ماهی را جدا کرده وپسازب یه وشکردنبا عصاره پودرگل میخک به وسیله سرنگ ۵ سی سی و سر سوزن ۲۱ و از طریق ورید ساقه دمی[1] خونگیری انجام گرفت، ماده ضد انتقاد مورد استفاده هپارین بود.

۲-۱- آزمایشات خون‌شناسی

هماتوکریت(PCV) به همان روش معمول و متداول برای پستانداران و پرندگان یعنی روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله های میکروهماتوکریت و سانتریفوژ نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت صورت گرفت (Fox *et al.*,1997).هموگلوبین به روش استاندارد سیانومت‌هموگلوبین انجام می‌گیرد. پس از مخلوط کردن ۰/۰۲ میلی لیتر خون با ۵ سی‌سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانومت‌هموگلوبین) و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، نمونه مخلوط‌شده به مدت ۱۰ دقیقه به منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه گردید(Goldenfarb*et al.*, 1971). شمارش کلی گلبول‌های قرمز(TRBC) ماهی به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت. برای این کار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق کننده نات-هریک استفاده شد. برای شمارش گلبول‌های قرمز تا درجه ۰/۵پی‌پت ملانژور قرمز

1 .Caudal vein

خون کشیده شد و سپس تا درجه ۱۰۱ با محلول رقیق‌کننده نات-هریک رقیق گردید(نسبت رقت ۱ به ۲۰۰) و سپس نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر نئوبار منتقل و پس از صرف زمان ۵ دقیقه برای ته-نشین شدن گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های قرمز با بزرگ‌نمایی ۴۰ در پنج مربع ثانوی از مربع اولیه مرکزی شمارش و تعداد سلول شمارش شده در ضریب رقت یعنی عدد ۱۰۰۰۰ ضرب گردید و تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌لیتر مکعب خون محاسبه شد(Ellis,1990). شمارش کلی گلبول‌های سفید(TWBC) به روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول‌های سفید پرندگان با رقیق‌کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده نات – هریک صورت گرفت. برای این‌کار و پس از انتقال نمونه رقیق شده به لام هماسیتومتر تعداد گلبول‌های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید(Schaperclaus*et al*., 1991).

۲۰۰ × (۱۰٪ +تعداد کل گلبولهای سفید در ۹ مربع بزرگ)= تعداد کل گلبولهای سفید در هر میکرولیتر خون

اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی(MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی(MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول های استاندارد موجود محاسبه گردید(Hu *et al*., 2005).

MCV=[(درصد) هماتوکریت × [۱۰ / تعداد گلبولهای سفید(میلیون در میلی‌متر مکعب)
MCV=[۱۰ × [هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) / تعداد گلبولهای سفید(میلیون در میلی‌متر مکعب)
MCHC=[۱۰۰ × [هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) / هماتوکریت(درصد)

۲-۲- روش آماری

برای آنالیز آماری نتایج تحقیق از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده گردید. برای مقایسه ی میانگین‌ها در بین تیمارها و نیز معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و تست تکمیلی دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد. کلیه داده ها بصورت میانگین± انحراف معیار گزارش گردید.

۳- یافته‌ها

نتایج حاصل از تحقیق در جدول شماره ۱ آورده شده، همانطور که مشخص است برخی از

فاکتورهای خونی تحت تأثیر عصارهقرار گرفته اند. میزان هماتوکریت(PCV)، تعداد گلبول قرمز(RBC)، حجم متوسط گلبولی(MCV) و متوسط هموگلوبین گلبولی(MCH) در تیمار ۱ درصد بیشترین مقدار را داشته و با تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). ولی میزان هموگلوبین(Hb)، میانگین غلظت هموگلوبین سلولی(MCHC) و تعداد گلبول‌های سفید(WBC) خون تحت تأثیر عصاره اسفرزه قرار نگرفته‌اند (P>۰/۰۵).

جدول شماره۱- فاکتورهای هماتولوژی مورد بررسی در تیمارهای مختلف (اطلاعات بر مبنای میانگین ± انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ است).

	تیمار ۱٪	تیمار ۰/۵٪	تیمار ۰/۱٪	کنترل
هماتو کریت (٪)	۳۷/۶۷±۳/۵۱ ^{a}	۳۵/۴۷±۴/۷۷ ^{ab}	۲۳/۳۳±۴/۰۵ ^{b}	۳۵/۴±۵/۴۸ ^{ab}
گلبولقرمز	۱/۵۳±۰/۲۲ ^{a}	۱/۳±۰/۱۵ ^{b}	۱/۲۸±۰/۲۱ ^{b}	۱/۱۳±۰/۲۲ ^{b}
MCV (fl)	۲۵۶/۱۲±۳۴/۸۱ ^{a}	۲۸۳/۱۶±۳۶/۹۱ ^{a}	۲۶۱/۷۸±۵۴/۶۷ ^{ab}	۳۲۷/۳۸±۹۵/۶۶ ^{b}
MCH (pg)	۵۰/۴۳±۱۸/۴۳ ^{a}	۶۰/۹۱±۱۷/۰۹ ^{ab}	۶۰/۷۴±۱۵/۰۵ ^{ab}	۶۸/۵۷±۲۳/۲۴ ^{b}
MCHC (٪)	۱۹/۹۷±۶/۷۴ ^{a}	۲۱/۰۷±۴/۶۷ ^{a}	۲۳/۴±۴/۸۱ ^{a}	۲۱/۰۵±۴/۱۲ ^{a}
گلبول سفید	۷/۴۶±۱/۰۵ ^{a}	۷/۴۱±۱/۶۵ ^{a}	۷/۵۶±۱/۲۲ ^{a}	۷/۳۸±۱/۶۶ ^{a}
هموگلوبین(g/dl)	۷/۴۱±۲/۲۸ ^{a}	۷/۴۱±۱/۸ ^{a}	۷/۵۶±۱/۶۹ ^{a}	۷/۳۸±۱/۲۳ ^{a}

۴- بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات صورت گرفته در گونه های مختلف ماهی انواع سلول‌های خونی محیطی ماهی را اریتروسیت‌ها، ترومبوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، هتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها و سلولهای نابالغ تشکیل می‌دهند و فعالیتی مشابه با فعالیت سلول‌های پستانداران برای آنها ذکر شده است (Feldman *et al*., 2000).

گلبول‌های قرمز ماهی برخلاف پستانداران هسته‌دار بوده و با پیشرفت روند تکاملی سلول، اندازه سلولی(MCV)، غلظت هموگلوبین گلبول(MCH) و غلظت هموگلوبین گلبولی(MCHC) افزایش می‌یابد (Feldman *et al*., 2000).

البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد بویژه ماهی بر خلاف حیوانات خونگرم بطور قابل توجهی تحت تأثیر فاکتورهای مختلف، مثل استرس، دما، فصل، تغذیه و... قرار دارد(Iwama, 1996).

نکته حائز اهمیت در مطالعه پارامترهای خون شناسی ماهی این است که پارامترهای خون شناسی ماهی به طور معنی‌داری تحت تأثیر مجموعه‌ای از عوامل محیطی و بیولوژیک ذکر شده قرار

دارند لذا ضرورت دارد در تفسیر نتایج حاصله از مطالعه پارامترهای خونی، از اثر عوامل مذکور بر پارامترهای خون‌شناسی آگاهی داشت (Luskova, 1998).

میزان تحریک و فعالیت ماهی از عوامل دیگر تأثیرگذار بر روی فاکتورهای خونی بوده است که توسط برخی از محققین از جملهwilhelm و همکاران در سال ۱۹۹۲ مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌است. آنها گزارش نموده‌اند که مقادیر پارامترهای خون‌شناسی در گونه‌های فعال و پرتحرک بطور معنی‌داری بالاتر از گونه‌های کم‌تحرک و با فعالیت کمتر می‌باشد (Wilhelm *et al.*, 1998). در مورد تأثیر محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژی تحقیقات متعددی انجام شده است و نتایج متفاوتی از تأثیر محرک های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژی ماهی گزارش گردیده است، برخی از محققین بی‌تأثیربودن کاربرد محرک‌های ایمنی بر فاکتورهای هماتولوژیک ماهی را گزارش کردند (Alishahi*et al.*, 2011 ؛Sakai, 1999 ؛Siwicki*et al.*, 1994).

ولی در تحقیقاتی دیگر محققین تغییر فاکتورهای هماتولوژیک را در اثر استفاده از محرک‌های ایمنی مثل ویتامین C گزارش نموده‌اند(Kajita*et al.*, 1990; Marian, 2004).

همچنین Harikrishnan (۲۰۱۲) افزایش فاکتورهای‌خونی (RBC،PCV و Hb) در ماهی *Epinephelus bruneus* در اثر تغذیه با ماده محرکه کیتوزان را گزارش نمود.

نتایج تحقیق جاری نشان داد که تجویز غلظت‌های مختلف عصاره گیاه اسفرزه بصورت خوراکی تأثیر معنی‌داری بر برخی فاکتورهای خونی مانند هماتوکریت(PCV)، تعداد گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی(MCV) و میزان متوسط هموگلوبین گلبولی(MCH) دارد($P<0.05$).

دانه‌های این گیاه دارای پروتئین، قند، روغن ثابت و تانن می‌باشد در نتیجه تأثیر این عصاره را می‌توان به مواد تشکیل دهنده و مؤثره آن نسبت داد، احتمالا در اجزای تشکیل دهنده این گیاه مواد محرکه‌ای وجود دارند که تجویز خوراکی آنها بویژه در غلظت ۱ درصد اثرات مثبتی بر روی بافت-های خون‌ساز دارد که باعث افزایش فعالیت و تحریک هماتوپوئتیک (خونسازی) در بافت‌های خونساز شده است.

گلبول‌های سفید یکی از اجزای مهم دفاع غیراختصاصی هستند که در خون، ارگان‌های لنفاوی و برخی بافت‌های دیگر حضور دارند و دارای فعالیت بیگانه‌خواری و تولید آنتی‌بادی می‌باشند (Iwama, 1996).

بر اساس مطالعات صورت‌گرفته در برخی از گونه‌های ماهی دامنه تغیرات انواع گلبول‌های سفید در خون محیطی بسیار متفاوت می‌باشد (Feldman *et al.*, 2000).

تعداد کلی WBCدر تحقیق حاضر علیرغم افزایش نسبی، فاقد تفاوت معنی‌دار بین تیمارها و گروه کنترل بود($P>0/05$). از آنجا که گزارشات متعددی از قدرت تحریک ایمنی عصاره های گیاهی

در آبزیان و افزایش گلبول های سفید خون وجود دارد (Lin *et al.*, 2011؛Alishahi et al., 2010 ؛ Lin et al., 2012) انتظار می‌رفت در این تحقیق نیز چنین افزایشی در تیمارهای تغذیه شده با عصاره اسفرزه مشاهده شود، ولی احتمالا ترکیبات مؤثره موجود در عصاره این گیاه برای القای تفاوت معنی‌داری در تعداد و نسبت گلبول‌های سفید خونی مناسب نبوده است.

در تحقیقاتی مشابه، Chang و همکاران (۲۰۰۶) در ماهی *Lateolabrax japonicus*، Gopalakannan (۲۰۰۶) در ماهی کپور معمولی و Siwicki و همکاران (۱۹۹۴) در ماهی قزل آلای رنگین کمان عدم افزایش تعداد گلبول های سفید بدنبال افزودن ماده محرکه به غذا را گزارش کردند.

این نتایج نشان دهنده تأثیر عصاره اسفرزه بر فاکتورهای خونی مربوط به گلبول‌های قرمز می-باشد به عبارت دیگر افزودن این عصاره به جیره غذایی، می‌تواند بدنبال آن بهبود وضعیت سلامت، رشد و ایمنی و افزایش میزان بازماندگی را داشته باشد. می‌توان با خالص‌سازی مواد مؤثره و مطالعه روی این عصاره از آن به عنوان جایگزینی گیاهی مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها استفاده نمود.

فهرست منابع

۱. **ابراهیمی،ع، (۱۳۸۵)**، تغذیه و نیازهای غذایی ماهیان در آبزی پروری، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد صنعتی اصفهان، ۳۰۴ صفحه.

۲. **امیدبیگی، ر،(۱۳۷۴)**،رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی، انتشارات فکرروز، ۲۸۳ صفحه، چاپ اول.

۳. **تبریزی، ل؛ نصیری، م؛کوچکی، ع،(۱۳۸۳)**، ارزیابی درجه حرارت‌های حداقل بهینه و حداکثر جوانه زنی اسفرزه و پسیلیوم، مجله پژوهش های زراعی ایران، جلد ۲، شماره ۲.

۴. **رضایی‌پور، ر؛ کمالی نژاد، م؛کاظمی فروز، ف ؛ فدایی، ش،(۱۳۸۲)**، بررسی اثرات چهار گیاه دارویی بر سیستم ایمنی سلولی، مجله علوم پزشکی، جلد ۱، شماره ۲، پی درپی ۲، صفحه ۷۳-۷۸.

۵. **شریفی،ا ؛ جاهد، س؛ خسروانی، س.ع؛ نغماچی،م،(۱۳۹۰)**،مطالعه خواص ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسفرزه، مجله ارمغان دانش، دوره ۱۶ شماره ۲، صفحه ، ۱۹۱ – ۱۱۰.

۶. **قاسمی پیربلوطی، ع،(۱۳۸۸)**، گیاهان دارویی و معطر(شناخت وبررسی اثرات آنها)، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، ۵۰۰ صفحه.

7. **Alishahi, M., M. M. Ranjbar, M. Ghorbanpour , R. Peyghan, M. Mesbah,**

M. Razijalali. 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research 4(3):85-91.

8. **Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Esmaeilli Rad, A. 2011**. Effects of dietary Silybummarianum extract on immune parameters of the common carp (*Cyprinus carpio*). J. Vet. Res. 66, 3: 255-263.

9. **Anjana S, Rani V, Padmini R. 2009**. Antibacterial activity of some medicinal plants used by tribals against uti causing pathogens. World Applied Sciences Journal ; 7(3): 332-9.

10. **Chang, Q., Liang, M., Wang, J., Sun, J. 2006**. Influence of chitosan on the growth and non-specific immunity of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). Marine fisheries research, 27(5): 17-27.

11. **Dugenci, S.K., Arda, N., Cand and A. 2003**. Some medicinal plants as immuno stimulants for fish. Journal of Ethnopharamacology., 88: 99–106.

12. **Ellis, A.E. 1990**. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S.; Fletcher, T.C.; Anderson, D.P.; Roberson, B.S.; van Muiswinkel, W.B. (eds.), Techniques in fish immunology. New Jersey. SOS Publications p. 101-113.

13.**Feldman,B.F., Zinkl, J. G., Jain, N. C. 2000.**Schalm's Veterinary Hematology.(5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins. viruse. Philadelphia, USA. p. 1120-1124.

14.**Fox, H.E.,White, S.A., Koa, M.F., Fernald, R.D. 1997.** Stress and dominance in a social fish. The Journal of Neuroscience. 16(17): 6463–6469.

15.**Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall. T., Brosious, E. 1971.** Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Am. Journal of Clinical Pathology. 56: 35–39.

16. **Gopalakannan, A. and Arul,V. 2006.**Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of Aeromonashydrophila infection in ponds. Aquaculture 255, 179–187.

17.**Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C., Heo, M. 2012.** Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in

Epinephelus bruneus against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquaculture. 326-329: 46–52.

18.**Hornok, L. 1992.** Cultivation and Processing of Medicinal Plants. Academ. Pub. Budapest.

19.**Hu, F., Hepburn, H.R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S.E., Daya, S. 2005.** Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. Journal of Ethnopharmacology. 100: 276-283.

20.**Ispir.U., and M.MustafaDorucu. 2005.** A Study on the Effects of Levamisole on the Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Turk J Vet AnimSci, 29: 1169-1176.

21. **Iwama, G. and T.Nakanishi .1996**. The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish, pp: 73-114.

22. **Kajita Y, Sakai M, Atsuta S, Kobayash M.1990.**The immunonodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol*;25:93e8.

23. **Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., Luo L., Pan Y. 2012.** Effects of dietary chitosan oligosaccharides and Bacillus coagulans on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Aquaculture 342-343: 36- 41.

24. **Lin, S., Pan, Y., Luo, L., Luo, L. 2011.** Effects of dietary b-1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Fish & Shellfish Immunology. 31, 788-794.

25. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrand A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry 193, 265–275pp.

26. **Luskova,V. 1998.** Factors affecting haematological indices in free-living fish populations. Acta Vet. 67: 249-255.

27. **Marian, M.P. 2004**. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against Vibrio harveyi infections. Aquaculture, 237, pp. 9-20.

28. **Misra.C.K.,B.K.Das. S.C. Mukherjee. and P.K. Meher. 2006.** The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeorohita*. Fish & Shellfish Immunology, 20 : 728-738.

29.**Motamedi H, DarabpourE,Gholipour M, Seyyednejd SM. 2010**. antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of *planta goovata* and oliveriadecumbens endemic in iran against some pathogenic bacteria. International Journal of Pharmacology;6(2):117-22.

30.**Raa. J., Roerstad, G. Engstad. R. Robetsen. B. 1992**. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections Diseases in Asian Aquaculture (I. M. Shariff, R. P. Subasinghe and J. R. Arthus, eds.), p. 39-50. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

31.**Rezaeipoor R., Saeidnia S., Kamalinejad., M. 2000.** The effect of *Planta goovata* on humoral immune responses in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology, Volume 72, Issues 1–2, 1. Pages 283-286.

32. **Rifat – UZ-Zaman ,Akhtar MS, Khan MS**. **2006.** In vitro antibacterial screening of Anethumgraveolens L Fruit Cichoriumintybus L leaf . Plantagoovata L. Seed husk and *Polygonum viviparum*L . Root extracts against Helicobacter pylori .Int J Pharmacol; 2: 674-77.

33. **Roed, K.H., Fjalestad, K.T., Strømsheim, A. 1993.** Genetic variation in lysozyme activity and spontaneous haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 114, 19– 31pp.

34.**Sakai, M.1999**. Curent Research status of fish immunostimulant. J. Aquaculture. 172:63-92.

35. **Schaperclaus, W., Kulow, H., Schreckenbach, K. 1991.** Hematological and serological technique. In: Fish Disease. Kothekar, VS. (ed.) (2nd ed.). Connaught circus, Gulabprimlani, Oxonian press Pvt. Ltd. New Delhi, India. p. 71-108.

36.**Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994.** Dietary intake of Immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41: 125-139.

37. **Sujata S., Rashmi S., Neeraj K., and Rajnish K.,2011**. Wound healing activity of ethanolic extract of *Planta goOvata* (Ispaghula) seeds. Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (07); 2011: 108-111.
38. **Vasudeva Rao. Y., M. Romesh. A. Singh And R. Chakrabarti. 2004.** Potentiation of antibody production in Indian majorcarp *Labeo rohita*, rohu, by *Achyranthes aspera* as aherbal feed ingredient. Aquaculture, 238: 67–73.

39.**Wilhelm, F. D., Eble, G. J., Kassner, G., Caprario, F. X., Dafre, A. L., Ohira, M. 1992.** Comparative hematology in marine fish. Comp. Biochem. Physiol. 102: 311-21.