اثر افزودن سطوح مختلف لاکتوفرین گاوی بر عملکرد رشد و بیان چهار ژن کاندیدا برای پاسخ سیستم ایمنی در میگو های ببری (*Penaeus semisulcatus*)

رضا نهاوندی[۱]، آرش جوانمرد[۲]، مسعود صیدگر[۳]، مهدی مقیم[۴]

۱- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

۲- دانشگاه تبریز - دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

۳- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۴- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

نویسنده مسئول: دکتر رضا نهاوندی

RezaNahavandi91@gmail.com

چکیده:

امروز سناریوی اصلی تحقیقات در زمینه پرورش میگو، مباحث تغذیه ژنومیکس یا استفاده از مکملهای غذایی تقویت کننده پاسخ ایمنی و کنترل کننده بیماریهای متداول در پرورش متراکم آنهاست. در این راستا هدف از پژوهش حاضر، تاثیر فرمولاسیون جیره پایه با سطوح مختلف تیمارهای لاکتوفرین (شاهد، ۱۰۰ میلی گرم و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلو جیره)، بر عملکرد رشد و بیان ژنهای چهار ژن کاندیدا برای پاسخ سیستم ایمنی در درمیگو های ببری بود. بدین‌منظور در گام اول، گروه های آزمایشی در شرایط مدیریتی یکسان از لحاظ معیارهای دما، نور و دفعات تغذیه قرار گرفتند. در مجموع ، ۱۲۰ میگوی ماده به مدت سه ماه مورد رکوردبرداری صفات رشد (وزن زنده بدن ، طول کل و عرض بدن) به مدت ۳ ماه قرار گرفتند. طرح آزمایشی مورد استفاده پس از مشخص شدن غیرمعنی دار بودن وزن اولیه میگوها در بین تکرارهای هر تیمار(آزمون کواریت) طرح پایه کاملا تصادفی ۳ تیمار در ۴ تکرار(هر واحد ازمایشی ۱۰ میگو) طراحی گردید($p>0.05$). در گام دوم ، مطالعه مولکولی، RNA کل به ترتیب از هپاتوپانکراس ،هموسیت ها، اندام لنفاوی ، روده، تخمدان، عضله و آبشش، با استفاده از معرف Trizol استخراج شد و متعاقبا" سنتز cDNA توسط روش ترنسکریپتاز معکوس انجام شد. روش کمی Real-time با استفاده از توالی سیستم توالی یاب(ABIPRISM_7300) برای مطالعه پروفایل بیان چهار ژن مختلف کاندیدا بهمراه یک ژن بتااکتین(ژن مرجع) برای افزایش سیستم ایمنی با استفاده از SYBR green I مورد استفاده قرار گرفت. برای آزمون آماری از روش تجزیه واریانس و آزمون میانگین ها بر طبق دانکن استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن یک درصد لاکتوفرین(۱۰۰ میلی گرم به ازای یک کیلو جیره پایه) در مرحله اوایل پرورش باعث افزایش معنی دار رشد و افزایش بیان ژنهای پاسخهای ایمنی به تهاجم احتمالی عوامل بیماری زا می گردد. پیشنهاد می گردد که برای مطالعات بعدی تاثیر لاکتوفرین بر میگوهای آلوده شده با عوامل بیماریزای باکتریایی و ویروسی در مزارع پرورشی ایران بررسی شود.

کلمات کلیدی: میگو، ژنومیک تغذیه ای، بیان ژن، صفات رشد، لاکتوفرین، سیستم ایمنی.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

صنعت پرورش میگو یکی از محورهای درآمدزایی در آبزی پروری است که در سال ۱۹۷۰ به صورت تجاری مطرح شد و به سرعت در کشورهایی مانند ایالات متحده، ژاپن و غرب اروپا گسترش قابل توجهی یافت. حدود ۷۵٪ از میگو پرورشی در قاره آسیا به ویژه در کشورهای چین و تایلند تولید می‌شود و ۲۵٪ دیگر به طور عمده از امریکا لاتین که در آن برزیل بزرگترین تولید است تامین می گردد(Jory, 2003) .

در این راستا، شیوع بیماری های مختلف (بیماریهای باکتریایی و ویروسی، قارچها و تک یاخته‌ای ها) هنوز هم عمده ترین مانع اصلی و چالش تهدید کننده تولیدات جهانی میگو پرورشی محسوب می شود. در پرورش میگو، امکان استفاده از واکسیناسیون برای کنترل موفقیت آمیز بیماری ها عملا غیر ممکن است چرا که سیستم ایمنی میگوها قادر به تطابق ایمنی نیست (Bower et al., 1994).از سوی دیگر کاربرد آنتی بیوتیک ها نیز کارایی کمی در کنترل بسیاری از بیماری ها میگو دارد. علاوه بر این موارد مصرف آنتی بیوتیک در بسیاری از کشورها به دلیل حساسیتهای موجود مبنی بر احتمال باقی ماندن بقایای آنها در محصولات غذایی توسط دولتها ممنوع شده است. علی رغم دشواری‌های مختلف برای رهایی و یا کاهش مشکلات ناشی از بیماری در صنعت میگو، راهکارهای جایگزینی برای مرتفع کردن مشکلات ناشی از شیوع بیماری‌ها نیز پیشنهاد شده است (Flegel 1997) .

علم ژنومیک تغذیه‌ای(Nutritional Genomic) یا تغذیه مولکولی علمی است که در آن اثر متقابل بین تغذیه و ژنوم موجودات مورد بررسی قرار می گیرد(Humphrey *et al.*,2002) . این علم می تواند ارتباط مواد مغذی موجود در جیره-های غذایی را با بیان انفرادی ژنها مورد بررسی قرار دهد و با استفاده از نتایج حاصل بهترین سطح مکملها و افزودنی های مورد نیاز برای احتیاجات بدن و پاسخهای سیستم ایمنی، تولید مثل را برآورد کند(Devresse *et al.*,2000) .

لاکتوفرین یک گلیکوپروئتین(۸۰ کیلودالتون) چند کاره است که در خانواده ترانسفرین متصل شونده به یون آهن می باشد که اولین بار از شیر گاو جدا شده است و متعاقبا در شیر انسان نیز وجود آن به اثبات رسیده است (Actor *et al.*, 2009). لاکتوفرین به مقادیر مختلف از غدد ترشحی موجود در پستانداران مانند شیر، بزاق، اشک و مایع منی و از بعضی از گلبولهای سفید ترشح می شود(Brock, 2002). وظایف لاکتوفرین شامل: خاصیت آنتی باکتریال ، دفاع علیه عفونتهای معده ای- روده ای،ایجاد سینرژیسم با بعضی از ایمنوگلوبولینها ، پروتئینهای سیستم دفاعی، محرک رشد سلولهای بدن حیوانات به ویژه لنفوسیتها و سلولهای روده می باشد. بیشتر میکروارگانیسم ها و عوامل بیماری زای موجود، برای رشد خود به آهن احتیاج دارند. لذا لاکتوفرین با اتصال به آهن از رشد باکتری های نیازمند به آهن از طریق غیر قابل دسترس کردن آهن جلوگیری می کند(Baker 2005). یک مولکول لاکتوفرین قادر است که با دو مولکول آهن (Fe^{+3}) متصل شود.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

استفاده از افزودنی لاکتوفرین در جیره دامها و آبزیان توسط مطالعات متعددی توصیه و ارزیابی شده است Lonnerdal, (2009).

جمع بندی مطالعات پیشین در خصوص سیستم ایمنی، حاکی از این است که بی مهرگان آنتی بادی ندارد و به همین دلیل باید متکی به سیستم ایمنی ذاتی باشند(Arala-Chaves *et al*.,2000) . در واقع میگو حاوی سیستم گردش خون باز یعنی سیستم های جدا نشده خون و لنفی است. مایع داخل این سیستم باز همولنف نام دارد و در داخل آن، سلولهای هموسیت قرار دارند. این سلول‌ها نقش عمده ای در پاسخ ایمنی میگو به عفونت های باکتریایی و قارچی ایفا می کنند (Bachere *et al*., 2000). بطوریکه پپتیدوگلیکان ها و لیپوپلی ساکاریدها ی و بتاگلوکان های روی دیواره های سلولی باکتریها و قارچها الگوی شناختی و محرک پاسخ های واسطه ای هموسیتی ایجاد می شوند تا ارگانسیم مهاجم را محو کنند(Newman *et al*.,2001). این پاسخ ها شامل آگلوتیناسیون ، فاگوسیتوز، تولید رادیکال های آزاد و ترکیبات ضد میکروبی است.شناخت مکانیزمهایی دفاعی که توسط آن میگو مولکول غیر خودی را در سطح مولکولی تشخیص وبه آنها پاسخ میدهد از سناریوهای موجود برای تحقیق در دهه حاضر می باشد. یکی از این مکانیزمهای جالب سنتر رنگدانه ملانین است که ضمن اینکه نقش های شناخته شده مهمی در التیام زخم کوتیکول و واکنش های دفاعی زخم دارد متعاقبا پیش ساز متابولیتهای دیگری با عملکرد سمی بر روی رشد پاتوژنها هستند. در این ماجرای شگفت انگیز سیستم فعال کننده پروفنل اکسیداز (ProPO) عامل کلیدی و اصلی فعال شدن مسیر بیوشیمیایی تولید ملانین است. پروفنل اکسیداز (ProPO) یک اکسیداز حاوی عنصر مس دو است که اکسیداسیون مواد فنلی به کینون ها راکه بعدا" تبدیل به ملانین می شودرا کاتالیز می کند که در همولنف و یا سلوم(حفره بدنی) میگو قرار دارد(Cerenius 2004).

پراکسینکتین Peroxinectin یکی دیگر از عوامل همکاری کننده با سیستم فعال کننده پروفنل اکسیداز (ProPO) می باشد که در چسبندگی همولنف به عوامل خارجی و متعاقب ان فاگوسیتوز، ایفاگر نقش است. بعضی مطالعات مشابه، پراکسینکتین را به عنوان پروتئین آنتی اکسیدان نامیده اند که موجودات را در برابر تنش های مختلف اکسیداتیو محافظت می کند و در انتقال سیگنال داخل سلولی نقش دارد. cDNA ژن کد کننده این پروتین دارای ساختاری متشکل از ۹۴۲ جفت باز با ۵۹۴ جفت باز اغاز کننده نسخه برداری است که در نهایت کد ۱۹۸ اسید آمینه است(Liu *et al*., 2007).

پروتئین باند شونده به گلوکان(LGB) پروتینهای تشخیص دهنده الگوهای شناختی همولنف میگو در برابر پتیدوگلیکان ها و لیپوپلی ساکاریدها و بتاگلوکان های روی دیواره های سلولی باکتریها و قارچها می باشند که نقش مهمی را در عملکرد پاسخهای ایمنی داخلی در بی مهرگان و حشرات دارند. ساختار ناحیه کد شونده این ژن ۲۰۷۵ جفت باز و پروتئینی با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون را کد می کند(Chen *et al*., 2015) .

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

پدیده جالب دیگر اینکه چون LGB در فرایند سنتر رنگدانه ملانین است پیش ساز متابولیتهای دیگری است که با عملکرد سمی تاثیر ممانعت کننده بر روی رشد پاتوژنها دارند و برای اینکه سلولهای میزبان در این چالش مصون بماند و درجه سمیت کنترل شود پروتئینهای سرین (SP) فعالیت می کنند. لذا همیشه فعالیت سیستم پروفنل اکسیداز (ProPO) با فعالیت پروتئینهای سرین (SP) همزمانی دارد(Muta *et al*.,1991) .

با توضیحات فوق به منظور طراحی یک مطالعه ژنومیک تغذیه ای در میگو و فقدان اطلاعات مرتبط در دسترس هدف این پژوهش تاثیر فرمولاسیون جیره پایه با سطوح مختلف تیمارهای لاکتوفرین (شاهد، ۱۰۰ میلی گرم و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلو جیره)، بر عملکرد رشد و بیان ژنهای چهار ژن کاندیدا برای پاسخ سیستم ایمنی در درمیگو های ببری انتخاب شد.

مواد و روش کار

تیمارهای آزمایشی

سه تیمار متفاوت(شاهد و یک میلی گرم و سه میلی گرم به ازای هر کیلو گرم جیره پایه) به عنوان تیمارهای آزمایشی طراحی شد. جیره پایه در پژوهش حاضر، ضمنا حاوی ۰/۱٪ شیر کم چرب بود. تجزیه تقریبی جیره پایه نشان داد که حاوی ۴۰/۷٪ پروتئین خام ، ۷/۴ ٪ چربی خام، ۱۳/۱۹٪ خاکستر و ۹ ٪ رطوبت بود. لاکتوفرین از شرکت تجاری Shangqiu Kangmeida Bio-Technology Co تهیه شد و به رژیم غذایی آزمایشی در سطوح مختلف با تصحیح مربوطه در مقدار شیر کم چرب اضافه شد. مخلوط تهیه شده با استفاده ازدمیدن هوا در ۳۸ درجه سانتی گراد در یک گرمخانه تا زمانی که سطح رطوبت حدود ۱۰ ٪ شود خشک شد. پس از خشک کردن، پلت آماده شده در ۴- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده ذخیره شد.میگوهای یک ماهه ، از استخر های پر شده از آب دریا با سیستم گردش مجدد آب (شوری ۲۳-۲۰ گرم در لیتر) در موسسه تحقیقاتی سیان لووای مالزی تهیه شد . میگوها به دمای اتاق (۰/۵±۲۶) و شوری ۲۰ گرم در لیتر درحوضچه های سیمانی (۶ × ۲ × ۱/۵ متر) مسقف و با جریان آب برگشتی به مدت ۲ هفته قبل از آزمایش سازگارشد. در طول دوره تطابق، میگو دو بار در روز با رژیم غذایی کنترل و ۵۰ ٪ تعویض آب هفتگی برای حفظ کیفیت آب تغذیه شدند.

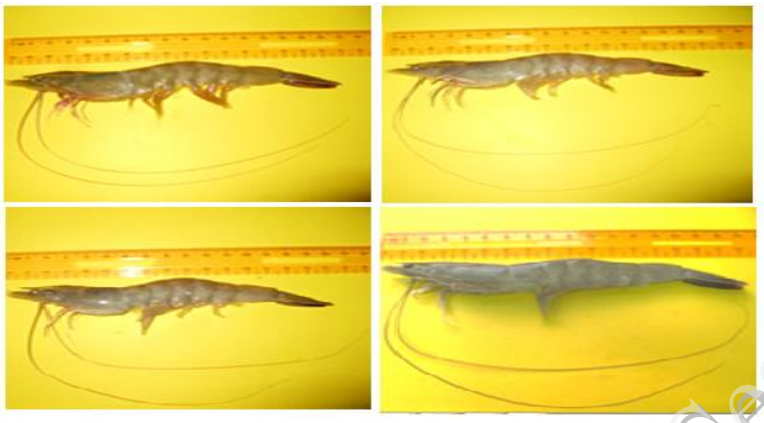
جدول ۱- ترکیب جیره غذایی پایه(محاسبات برای یک تن در نظر گرفته شده است)

اجزای جیره غذایی	لاکتوفرین		
	سه درصد	یک درصد	شاهد
پودر ماهی	۴۳۰	۴۳۰	۴۳۰
کنجاله سویا	۵۰	۵۰	۵۰
پودر مخمر	۲۵	۲۵	۲۵
پودر پوسته میگو	۷۰	۷۰	۷۰
آرد گندم	۳۵۳	۳۵۳	۳۵۳
سلولز	۱	۱	۱
شیر پس چرخ	۰	۰/۰۰۰۹	۱

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

پروبیوتیک	۱	۰/۰۰۱	۰
پودر گلوتن ذرت	۲۵	۲۵	۲۵
روغن ماهی	۲۰	۲۰	۲۰
مکمل معدنی	۲۱	۲۱	۲۱
مکمل ویتامینی	۴	۴	۴

برای بررسی پارامترهای رشد، وزن بدن ، طول کل و عرض بدن نمونه ها اندازه گیری شد. شکل بدن هر نمونه با روش truss network اندازه گیری شد.



شکل ۱- شمایی از تعدادی از اندازه گیریهای بیومتریک میگوهای تحت تیمارهای غذایی متفاوت

جداسازی RNA و سنتز cDNA

RNA کل به ترتیب از هپاتوپانکراس، هموسیت ها، اندام لنفاوی، روده، تخمدان، عضله و آبشش، با استفاده معرف Trizol جمع آوری و سپس مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت تجاریInvitrogen استخراج شد. برای حذف الودگیهای DNA از آنزیم از انزیم Dnase و حل کردن در آب DEPC شرکت پرومگای Promega استفاده شد و RNA کل تخلیص شده تا زمان آزمایش در فریزر منفی۸۰- درجه سانتیگراد برای محافظت از Rnase موجود در محیط نگهداری شد. قبل از ساخت cDNA غلظت نمونه های RNA و کیفیت انها توسط دستگاه نانودراپ شرکت اپندورف المان در طول موجهای ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ اندازه گیری شد. سپس دو میلی گرم از RNA کل(غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم) و ۰/۵ میکرو مول آغازگرهای اولیگو T و انزیم ترنسکریپتاز معکوس شرکت پرومگا امریکا استفاده شد برنامه ترموسایکلر برای سنتز cDNA ۵۰ درجه به مدت ۲ دقیقه و متعاقبا ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه برای غیر فعال کردن انزیم تنظیم گردید. سپس با استفاده از اغازگرهای طراحی شده برای چهار ژن کاندیدا و مسئول پاسخهای ایمنی در میگو به همراه یک ژن رفرنس(کنترل) رونویسی و آنالیز real-time PCR انجام شود. جزییات توالیها و مشخصات جایگاهها در جدول یک اورده شده است.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

جدول ۲- جزییات توالیها و مشخصات جایگاهها چهار ژن مسئول ایمنی و یک ژن رفرنس در مطالعه حاضر

نام ژن	توالی آغازگرها	دمای اتصال (سانتیگراد)	رفرنس
proPO	GCCTTGGCAACGCTTTCA CGCGCATCAGTTCAGTTTGT	۶۸	Lai *et a*l., 2005
LGBP	CATGTCCAACTTCGCTTTCAGA ATCACCGCGTGGCATCTT	۶۴	Cheng *et al*., 2005
PE	TGGACCTCGCGGGAGAT GACCGATAGCCACCATGCTT	۵۶	Liu *et al*.,2005
SP	CGTCGTTAGGTTAAGTGCGTTCT TTTCAGCGCATTAAGACGTGTT	۶۱	Jiménez-Vega *et al*.,2005
بتا اکتین	GAGCAACACGGAGTTCGTTGT CATCACCAACTGGGACGACATGGA	۶۸	AF300705

شرایط انجام تکثیر در یک پلیت ۹۶ خانه ای در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام شد در این محلول ۱۲/۵ میکرو کیت سایبرگرین دو برابر (PE Applied Biosystems)، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ پیکومول از هر آغازگر و ۹ میکرولیتر آب DEPC استفاده می کنند. برنامه ترموسایکلر برای تکثیر در یک چرخه سی و پنج سیکل شاما دمای واسرشت سازی ۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه دمای اتصال بر حسب هر ژن (مطابق جدول) یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه تنظیم و

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

بهینه سازی گردید. آب DEPC- به عنوان کنترل منفی جایگزین قالب شد. تجزیه و تحلیل داده های RT–PCR با نرم افزار SDS نسخه ۲,۰ (Perkin–Elmer Applied Biosystems) انجام شد .تعیین کمیتی نسبی بیان ژن با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به طور خلاصه ، آستانه چرخه PCR به عنوان تعداد چرخه که در آن افزایش معنی دار آماری در فلورسانس سبز SYBR در برابر رنگ منفعل داخلی، (ROX (ΔRn ، که برای اولین بار تشخیص داده شد تعریف شده است. تعداد کپی از ارزش ژن هدف و CTمعکوس مرتبط بود . بنابراین، یک نمونه حاوی تعداد بیشتری از نسخه از ژن هدف ، میزان Ct کمتر از یک نمونه با تعداد کمتر از نسخه از همان هدف بود.تفاوت در مقادیر CT ژن های ایمنی و مربوط به ژن کنترل β اکتین داخلی، به نام ΔCt ، برای نرمال کردن تفاوت در مقدار RNA کل اضافه شده به مخلوط واکنش cDNA و کارایی واکنش نسخه برداری معکوس محاسبه شد. ارزشΔCt در نمونه تحت درمان از ارزش ΔCt نمونه شاهد کم شد.تفاوت به عنوان ارزش ΔΔCt بیان شد که امکان اندازه گیری تغییر در بیان ژن های ایمنی در نمونه تیمار نسبت به نمونه شاهد را فراهم می آورد. تغییر ۳,۳ برابر در میزان Ct معادل یک تغییر ۱۰ برابر در بیان ژن نظر گرفته شد .

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصله از RT- PCR با روش تجزیه و تحلیل GLM مورد تحلیل قرار گرفتند. تفاوت در سطح ۰/۵ و یک درصد به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. بررسی تفاوت معنی داری بین تیمارهای با استفاده از نرم افزار های کامپیوتری(SAS SAS موسسه، کری ، NC ، ایالات متحده آمریکا) آزمون مقایسه چندگانه (توکی و دانکن) انجام شد . قبل از تجزیه و تحلیل، درصد داده های موجود با استفاده از arcsine قبل از تجزیه و تحلیل، برای رسیدن به سطح آماری p 0.05 >نرمال شد.

نتایج و بحث

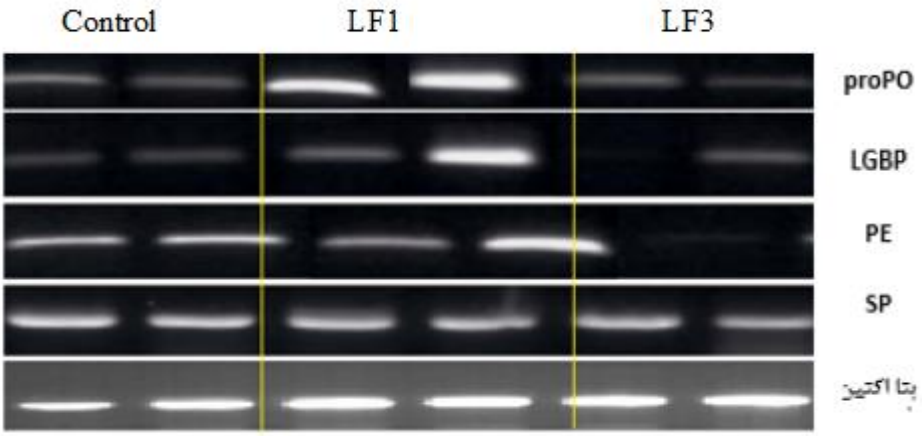
نتایج مطالعات پیشین نشان می دهد که جیره غذایی و خوراک و مدیریت خوراک نقش مهمی در مدیریت سلامت میگو بازی می‌کند. پاسخ ایمنی در میگو واکنشهایی از نوع انرژی بر است. این امر منجر به تغییرات در پارتیشن بندی مواد غذایی شده و متعاقبا مواد مغذی بیشتری را به سیستم ایمنی بدن هدایت می کند.

محرک های ایمنی ، ترکیباتی هستند که باعث تحریک مکانیسم های دفاعی غیر اختصاصی در موجودات می شوند. لاکتوفرین از جمله افزدونیهای خوراکی محسوب می شود که روی سیستم ایمنی دامهای اهلی، طیور و ابزیان نقش معنی دار خود را ثابت کرده است(Lonnerdal 2009).

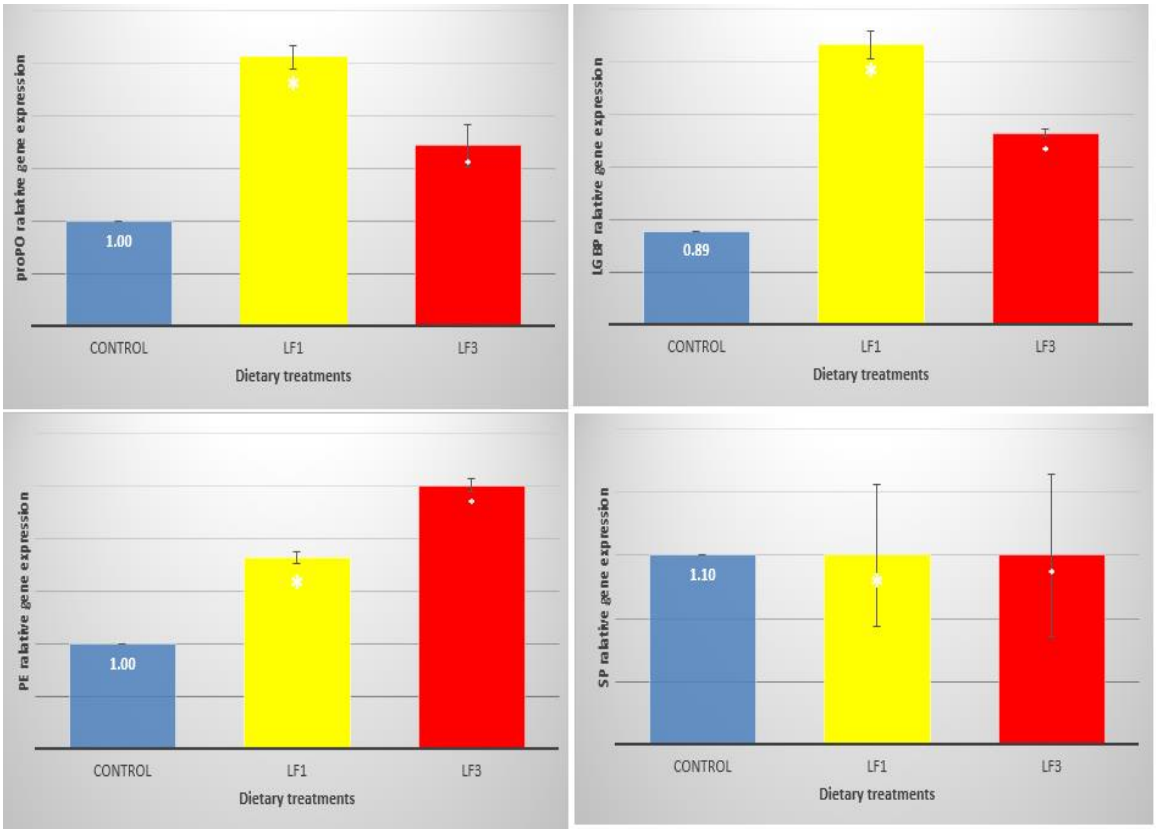
پروفایل مختلف بیان محصولات مربوط به ژنهای مختلف در جیره های مختلف در شکل ۲ و نمودارهای مقایسه‌ای بیان ژنهای کاندید برای افزایش پاسخ ایمنی بعد از نرمالاسیون داده های خام بیان زن در بین دو جیره حاوی یک و سه درصد

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

لاکتوفرین در شکل ۳ آورده شده است . همچنین مقایسه خصوصیات رشد در بین سه جیره آزمایشی شاهد، یک درصد و سه درصد لاکتوفرین در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۲: پروفایل مختلف بیان محصولات مربوط به ژنهای مختلف در جیره های مختلف



شکل ۳: نمودارهای مقایسه‌ای بیان ژنهای کاندید برای افزایش پاسخ ایمنی بعد از نرمال سازی داده های خام بیان زن در بین تیمارهای آزمایشی.

برای مطالعه پروفایل بیان چهار ژن مختلف کاندیدا بهمراه یک ژن بتااکتین(ژن مرجع) برای افزایش سیستم ایمنی با استفاده از SYBR green I مورد استفاده قرار گرفت. برای آزمون از روش تجزیه واریانس و آزمون میانگین ها بر طبق

دانکن استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن یک درصد لاکتوفرین(۱۰۰ میلی گرم به ازای یک کیلو جیره پایه) در اوایل مرحله پرورش باعث افزایش معنی دار رشد و افزایش بیان ژنهای پاسخهای ایمنی به تهاجم احتمالی عوامل بیماری زا می گردد.

نتایج این تحقیق نشان داد که میگوهایی که با جیره حاوی لاکتوفرین ۱ درصد تغذیه شده بوند ، در اوایل پرورش دارای بیشترین وزن بدن (۱/۶۶ ± ۹۳/ ۲۸۰میلی گرم) و طول کل (۰/۹۱± ۳۷/۳۳ میلیمتر) بودند . همچنین استفاده از جیره حاوی لاکتوفرین ۱ درصد موجب بروز تفاوت معنی داری از لحاظ وزن بدن و طول کل میگوهای مورد آزمایش نسبت به جیره شاهد و جیره حاوی لاکتوفرین ۲ درصد شد . لذا بر اساس یافته های این تحقیق ، برای دستیابی به حداکثر رشد وزنی و طولی میگوی ببری افزودن لاکتوفرین به مقدار ۱ درصد به جیره غذایی توصیه می شود.

مطالعات مشابه دیگر نیز در رابطه با فعالیت ضدویروسی (Ellison et al)، ضدباکتریایی ، ضدقارچی ،(Van der Strate *et al.*, 2001) ضدانگلی ،(Kirkpatrick *et al.*, 1971) ضدالتهابی و ،(Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009) نیز خاصیت تنظیم کنندگی سیستم ایمنی این ماده (Breton-Gorius *et al.*, 1980) گلیکوپروتئینی را تأیید نموده است. همچنین لاکتوفرین دربهبود وضعیت ایمنی زایی ناشی از واکسنها و در نتیجه افزایش مقاومت در برابر بیماریها تأثیر بسزایی دارد(Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009) .

Sakai و همکاران (۱۹۹۵) نیز تأثیر ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم لاکتوفرین را بر فعالیت فاگوسیتوزی ماهی قزل آلای رنگین کمان بررسی کردند و نتایج آن ها افزایش معنی دار فعالیت فاگوسیتوزی را در تیمار لاکتوفرین در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد.

یافته پژوهشی

این مطالعه نشان داد که افزودن یک درصد لاکتوفرین(۱۰۰ میلی گرم به ازای یک کیلو جیره پایه) در مرحله اوایل پرورش باعث افزایش معنی دار رشد و افزایش بیان ژنهای پاسخهای ایمنی به تهاجم احتمالی عوامل بیماری زا می گردد. پیشنهاد می گردد که برای مطالعات بعدی تاثیر لاکتوفرین بر میگوهای آلوده شده با عوامل بیماریزای باکتریایی و ویروسی در مزارع پرورشی ایران بررسی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش بر خود فرض می دانند که از کمکهای مالی تامین شده از سوی وزارت آموزش عالی مالزی و دانشگاه پوترا، مالزی و کمک فنی تشکر نمایند.

منابع

Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML.2009. Lactoferrin as a natural immune modulator. Curr Pharm Des;15:1956- 1973.

Arala-Chaves, M. and T. Sequeira. 2000. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? Aquaculture 191:247-258.

Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191:3-11. Browdy, C.L., D. Bratvold, A.D. Stokes and R.P. McIntosh. 2001. Perspectives on the application of closed shrimp culture systems. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001 (C.L. Browdy and D.E. Jory, eds.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 20-34.

Baker E.N. 2005. Lactoferrin: A multi-tasking protein par excellence. Cellular and Molecular Life Sciences 62,2529–2530.

Breton-Gorius J, Mason D, Buriot D, Vilde JL, Griscelli C .1980. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections

Brock J.H. (2002) The physiology of lactoferrin. Biochemistry and Cell Biology 80, 1–6.

Cerenius L., Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev.2004;198:116–126.

Chen Y.Y., Chen J.C., Kong H.Y., Kuo Y.I., Lin Y.C., Chang Y.H., Huang C.H. Lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binds to seaweed polysaccharide and activates prophenoloxidase system in white shrimp. 2015. Unpublished work.

Cheng, W., C. H. Tsai and J. C. Chen. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule β-1,3-glucan binding protein LGBP) from the white shrimp Fish & Shellfish Immunology 18: 297-310.

Chien, Y-H., C-H. Pan and B. Hunter. 2002. The resistance to ammonia stress by Penaeus monodon juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. In: Book of Abstracts. World Aquaculture 2002. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, p. 134.

Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy. Am J Pathol; 99(2):413–428.

Devresse, B. 2000. Nucleotides – a key nutrient for the immune system of shrimp? Aqua Feed International 3(2):35-39.

Ellison RT, Giehl TJ, Laforce FM (1988) Damage of the membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect Immun; 56(11): 2774–2781.

Journal of Aquatic Caspain Sea (J.A.C.S)

Flegel, T.W. 2001. The shrimp response to viral pathogens. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001 (C.L. Browdy and D.E. Jory, eds). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. pp. 254-278.

Humphrey, B.D., E.A. Koutsos and K.C. Klasing. 2002. Requirements and priorities of the immune system for nutrients. In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's 18th Annual Symposium (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 69-78.

Kirkpatrick CH, Green I, Rich RR, Schade AL (1971) Inhibition of growth of Candida albicans by iron-response in rainbow trout (Oncorhynchusmykiss). Aquacult Res; 43:1451–1459.

Lai, C. Y., W. Cheng and C. M. Kuo. 2005. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish & Shellfish Immunology 18: 417-430.

Liu H., Jiravanichpaisal P., Cerenius L., Söderhäll I., Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*.J. Biol. Chem. 2007;282:33593–33598.

Liu, C. H., W. Cheng and J. C. Chen. 2005. The peroxinectin of white shrimp Litopenaeus vannamei is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription alginolyticus infection. Fish & Shellfish immunology. 18: 431-444.

Lonnerdal B. (2009) Nutritional roles of lactoferrin. Current Opinion in Clinical Nutrition& Metabolic Care 12,293–297.

Newman, S.G. and R.A. Bullis. 2001. Immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001 (C.L. Browdy and D.E. Jory, eds.). The World Aqua. Soc., Baton Rouge, LA, USA, pp. 226- 237.

Sakai M., Kobayashi M. and Yoshida T(1999).Activation of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. Comparative Biochemistry Physiology, 110B, 755–759

Van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK (2001) Antiviral activities of lactoferrin. Antiviral Res; 52(3): 225-239.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)