

مقاله علمی-پژوهشی:

اثر افزودنی پودر فلفل پاپریکا (*Capsicum annum*) بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای ایمنی ماهی زبرا (*Danio rerio*)

کسری لطفی^۱، سید پژمان حسینی شکرابی^{۱*}، مهدی شمسایی مهرجان^۱

*hosseini@srbiau.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

افزایش بازدهی غذا و بازماندگی از اهداف مهم آبی پروری نوین و پایدار می باشد. بدین منظور هدف از این پژوهش مطالعه اثرات پودر فلفل پاپریکا بر برخی فاکتورهای رشد و ایمنی ماهی زبرا بود که به مدت ۵۶ روز انجام شد. در این مطالعه تعداد ۴۸۰ عدد بچه ماهی زبرا (وزن اولیه ۰/۰۵ گرم و طول کل ۱/۷۱ میلی متر) به صورت تصادفی در ۱۲ مخزن تقسیم شدند و با جیره های غذایی غنی شده با ۰ (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ گرم پودر پاپریکا در هر ۱۰۰ گرم خوراک تغذیه شدند. بررسی شاخص های رشد و بازماندگی نشان داد که بیشترین مقادیر شاخص وزن نهایی (0.02 ± 0.42 گرم) و افزایش وزن بدن (0.03 ± 0.36 گرم) در تیمار ۳ درصد و کمترین آن در گروه شاهد مشاهده شد. پارامترهای ایمنی سرم خون ماهیان تغذیه شده با پودر فلفل پاپریکا شامل فعالیت لیزوزیم، IgM و سیستم کمپلمان (C3 و C4) همگی واجد اختلاف معنی داری با تیمار شاهد بودند ($p < 0.05$) بطوریکه حداکثر مقدار لیزوزیم سرم در سطح ۳ درصد پاپریکا و همچنین حداکثر مقادیر IgM و C3 به طور همزمان در تیمارهای ۲ و ۳ درصد پاپریکا مشاهده شد. علاوه براین، افزودن پودر پاپریکا در سطوح مختلف بدون اختلاف معنی دار در بین تیمارها سبب افزایش سطح کمپلمان C4 در مقایسه با ماهیان گروه شاهد شد ($p < 0.05$). به طور کلی، افزودن پودر پاپریکا در جیره غذایی ماهی زبرا در سطح ۳ درصد علاوه بر بهبود شاخص های رشد می تواند سبب تحریک سیستم ایمنی نیز شود و احتمالاً به عنوان یک محرک ایمنی عمل نماید.

لغات کلیدی: ماهی زبرا، *Capsicum annum*، سیستم ایمنی، رشد، محرک ایمنی

*نویسنده مسئول

مقدمه

مکمل‌های غذایی یا افزودنی‌ها برای بهبود عملکرد رشد و سلامت آبزیان، افزایش کیفیت خوراک و بهبود طعم خوراک بکار می‌روند. ماهیان اغلب در محیط پرورشی در معرض عوامل تنش‌زا و استرس‌زا متعدد و اجتناب‌ناپذیری قرار دارند که این عوامل سبب یک سلسله پاسخ‌های فیزیولوژیک و در نهایت تضعیف سیستم ایمنی بدن می‌شود (Barton, 2002). یکی از روش‌های معمول افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان، استفاده از ترکیبات محرک سیستم ایمنی بوده و این ترکیبات شامل انواع مواد سنتتیک شیمیایی و ترکیبات طبیعی می‌باشد. البته امروزه مواد افزودنی با منشأ طبیعی بخصوص ترکیبات گیاهی مورد توجه محققین قرار گرفته است (عنایت غلام‌پور و همکاران، ۱۳۹۵). در واقع، محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی با توجه به خطرات زیستی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور ارتقاء مکانیسم دفاع غیر اختصاصی و اختصاصی و همچنین افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها، در صنعت آبی‌پروری مورد توجه قرار گرفته‌اند (Dugenci et al., 2003).

فلفل از محصولات مهم کشاورزی بوده و انواع گوناگونی از آن (خانواده بادنجانیان) در سراسر دنیا برای استفاده خوراکی و پزشکی پرورش یافته است. فلفل گیاهی است که با توجه به گونه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال فراوانی است (Yanardag et al., 2003; Eidi et al., 2009). از دیر باز در طب سنتی مصرف روزانه فلفل در رژیم غذایی برای پیشگیری از دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی توصیه شده است (Howard et al., 2000). از مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتریایی فلفل ترکیبات اولئورزینی هستند که در میان آنها کاپسانتین ساختمان فنلی دارد و ماده موثره ایجاد کننده طعم تند فلفل است (مقدم‌نیا و همکاران، ۱۳۸۲). فلفل پاپریکا (*Capsicum annum*)، نوعی فلفل دلمه‌ای قرمز است که رنگ قرمز آن به دلیل حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی شامل رنگدانه‌های لیکوپن و کاراتنوئیدهای دکپسانتین، کپسوربین و کپسانتین می‌باشد (Fox et al., 2005; Deepaa et al., 2007; Sun et al., 2007; Kim et al., 2016). با مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی و

آنتی باکتریالی ارقام مختلف فلفل دلمه‌ای با رنگ‌های متفاوت، گزارش شده است که فلفل‌های دلمه‌ای قرمز (پاپریکا) در مجموع ترکیبات فنولیک بیشتری نسبت به فلفل‌های سبز دارند و همچنین فلفل‌های دلمه‌ای قرمز دارای میزان بتا-کاروتن و کاپسانتین بیشتری می‌باشند (Sun et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2011). اگرچه در خصوص استفاده از فلفل پاپریکا در خوراک آبزیان به عنوان یک مکمل غذایی جهت افزایش رشد و بخصوص رنگ پذیری پوست و گوشت تحقیقات متعددی صورت گرفته اما تحقیقات درخصوص اثرات این ماده بر سیستم ایمنی محدود می‌باشد. برای مثال، افزایش وزن نهایی و نرخ بقاء بالایی از میگوهای موزی (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه شده با ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پودر پاپریکا گزارش شده است (Figueroa et al., 2003). Lee و همکاران (۲۰۱۰) به این نتیجه رسیدند که استفاده از ۸ درصد پودر پاپریکا در جیره غذایی ماهی زینتی *Zacco platypus* موجب بهبود عملکرد رشد و رنگ پوست این ماهی می‌شود. در تحقیقی دیگر، Yilmaz و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که استفاده از پودر پاپریکا با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به عنوان یک منبع طبیعی به جای آستاگزانتین سبب افزایش عملکرد رشد و رنگ‌پذیری پوست و گوشت ماهی تیلپیا موزامبیکا (*Oreochromis mossambicus*) می‌شود. Talebi و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر فلفل دلمه‌ای قرمز همراه با عملکرد رشد بهبود می‌یابد. علاوه بر این، Azimi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند، افزودن فلفل دلمه‌ای قرمز در سطح ۱۰ گرم در کیلوگرم در جیره غذایی ماهی فلاور (*Cichlasma* sp.) سبب افزایش جمعیت گلبول‌های سفید از فاکتورهای خونی و همچنین محتوای رنگدانه‌های پوست این ماهی می‌شود.

یکی از ماهیان محبوب پرورش‌دهندگان ماهیان زینتی، ماهی زبرا (*Danio rerio*) است (Hill et al., 2011). گورخرماهی (زبرا) از خانواده کپورماهیان از سویی، جزء ماهیان زینتی جذاب آب شیرین و مناطق گرمسیری است (Grunwald and Eisen, 2002) و از سوی دیگر، به دلیل نگهداری آسان، هم‌آوری بالا، اندازه کوچک، دوره

تهیه خوراک‌های آزمایشی

تهیه جیره‌های آزمایشی این تحقیق شامل اسپری مقادیر ۰ (جیره پایه یا شاهد بدون مکمل)، ۱، ۲، ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا در جیره تجاری (بیومار، فرانسه) با استفاده از ژلاتین ۲ درصد بود (نراقی و همکاران، ۱۳۹۷). پس از غنی‌سازی جیره‌ها با سطوح مختلف پودر پاپریکا، جیره‌ها در معرض هوای آزاد قرار گرفتند و پس از خشک شدن داخل ظرف پلاستیکی درب‌دار در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام مراحل ساخت غذا در مورد جیره گروه شاهد نیز انجام شد و فقط پودر پاپریکا به غذای گروه شاهد اضافه نشد. آنالیز ترکیبات تقریبی جیره تجاری مورد استفاده شامل ۵۸ درصد پروتئین، ۱۵ درصد چربی، ۰/۵ درصد فیبر، ۲/۶ درصد خاکستر و ۹ درصد رطوبت بود. دوره پرورش ماهیان با جیره‌های آزمایشی به مدت ۵۶ روز به طول انجامید. بچه ماهیان به صورت روزانه در سه نوبت (صبح، ظهر و شب) به میزان ۵ درصد وزن بدن ماهیان تغذیه شدند.

عملکرد رشد و بقا

عملیات زیست سنجی در روز اول و آخر آزمایش بدین صورت بود که ماهیان با پودر گل‌میخک بیهوش (۲ درصد) و سپس وزن آنها توسط ترازو دیجیتال با سه رقم اعشار و طول آنها توسط کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر ثبت شدند. در ادامه پارامترهای رشد و تغذیه طبق فرمول‌های ذیل محاسبه شد:

جنینی شفاف و دوره زندگی نسبتاً کوتاه در مطالعات پزشکی به عنوان یک مدل زیستی کاربرد زیادی دارد (Lawrence, 2007; Vasquez et al., 2012). هدف از این مطالعه استفاده از پودر فلفل پاپریکا در جیره غذایی بر برخی شاخص‌های رشد و پاسخ‌های سیستم ایمنی در ماهی زبرا برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روش کار

شرایط و محل پرورش

جهت انجام این آزمایش تعداد ۴۸۰ عدد بچه ماهی زبرا با وزن اولیه 0.05 ± 0.01 گرم و طول کل 1.72 ± 0.06 میلی‌متر از یکی از مراکز تکثیر ماهی در تهران خریداری و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران) منتقل شدند. ماهیان (۴۰ عدد ماهی در هر مخزن) به صورت کاملاً تصادفی در ۱۲ عدد آکواریوم با ابعاد $30 \times 30 \times 30$ سانتی‌متر رها سازی شده و به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط جدید نگهداری و با جیره پایه یا شاهد تغذیه شدند. فاکتورهای کیفی آب پرورش بصورت منظم مورد پایش قرار گرفته و این فاکتورها برترتیب شامل pH، اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)، دما (سانتی‌گراد) و نیتريت (میلی‌گرم در لیتر) در محدوده 0.05 ± 0.03 و $2.5/3.4 \pm 0.39$ ، $6/7 \pm 0.2$ ، $7/26 \pm 0.38$ نگه‌داری شدند. در این تحقیق دوره نوری پرورش ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد.

افزایش وزن (گرم) = وزن ثانویه - وزن اولیه

$$\text{ضریب رشد ویژه (درصد در روز)} = \frac{(\text{لگاریتم طبیعی میانگین وزن ثانویه} - \text{لگاریتم طبیعی میانگین وزن اولیه})}{\text{دوره پرورش به روز}} \times 100$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \frac{\text{مقدار غذای خورده شده}}{\text{افزایش وزن}}$$

$$\text{بازماندگی (درصد)} = \frac{\text{تعداد ثانویه ماهی}}{\text{تعداد اولیه ماهی}} \times 100$$

$$\text{شاخص وضعیت} = \frac{\text{وزن ماهی}}{(\text{طول کل})^3} \times 100$$

جمع آوری مایعات فیزیولوژیک بدن

پس از اتمام طول دوره آزمایش، ۲۴ ساعت قبل ماهیان قطع غذا شدند و عملیات تهیه عصاره بدن از ماهیان صورت گرفت. شرح عملیات بدین نحو بود که ابتدا ۱۵ عدد ماهی را از هر تکرار بیهوش نموده، سر و دم آنها را قطع کرده و در داخل حاوی ۱۰۰ ماکرولیتتر بافر سیترات (۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۳/۸ درصد سیترات سدیم و pH برابر ۷/۴) به مدت ۲۰ دقیقه با ۷۹۰۰ نیروی جی در سانترفیوژ در دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت از مخلوط دو فاز شده، فاز بالایی برداشت شده (سر) و تا انجام آزمایشات سرولوژی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Blaxhall and Daisley, 1973).

اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان‌های C3 و C4 با استفاده از کیت تجاری (Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd., China) توسط دستگاه الیزا (ELISA) (الیزا ریدر مدل TS Elx800 محصول بایوتک کشور آمریکا) انجام شد (Saber et al., 2017). بدین نحو که کمپلمان‌های C3 و C4 در هر نمونه عصاره بدن با آنتی‌بادی موجود در کیت مخلوط گردید، پس از تشکیل کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن، جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت لیزوزیم عصاره بدن بر اساس روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* حساس به آنزیم لیزوزیم اندازه‌گیری شد. سه رقت از لیزوزیم سفیده تخم مرغ از ۰ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان استاندارد استفاده شد. محلول‌های استاندارد به همراه نمونه‌های عصاره بدن رقیق نشده با سه تکرار در تیوب‌های مخصوص (۲۵ میکرولیتر) تخلیه شده و ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی در بافر سیترات مذکور آماده و به هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن، تغییر میزان کدورت محلول‌ها در ابتدا و پس از ۴ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سنجش گردید و با مقایسه و معادل سازی نمونه با استاندارد، میزان

فعالیت در عصاره بدن بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. مقدار ایمنوگلوبولین IgM عصاره بدن با استفاده از کدورت حاصل از اتصال ایمنوگلوبولین با آنتی‌بادی ضد آن (تهیه شده از سرم موش) توسط کیت تجاری و الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر سنجش شد (Reyes-Becerril et al., 2008).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در این مطالعه با سه تکرار انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت و همچنین جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با خطای ۵ درصد استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج

عملکرد رشد و تغذیه

باتوجه به جدول ۱، افزودن سطوح مختلف پودر فلفل پاپریکا در جیره‌های مختلف آزمایشی اثر معنی‌داری را در شاخص‌های رشد بچه ماهیان زبرا داشت ($p < 0.05$) بطوریکه بیشترین مقدار وزن نهایی، طول بدن و افزایش وزن بدن مربوط به تیمار ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا و کمترین وزن نهایی مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین نرخ رشد ویژه بطور همزمان بصورت حداکثری در تیمار ۲ و ۳ درصد ثبت شد در حالیکه تیمار شاهد دارای بیشترین میزان ضریب تبدیل غذایی بود ($1/33 \pm 0/04$) و کمترین میزان آن در تیمار ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا ($1/08 \pm 0/09$) دیده شد ($p < 0/05$). همچنین پایین‌ترین شاخص وضعیت ماهیان زبرا در تیمار ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا ($1/79 \pm 0/07$) دیده شد. هیچگونه تفاوت معناداری در بین درصد بازماندگی ماهیان تا پایان دوره آزمایش مشاهده نشد ($p > 0/05$).

جدول ۱: میانگین شاخص‌های رشد و بازماندگی در بچه ماهیان زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف پودر فلفل پاپریکا به مدت ۵۶ روز

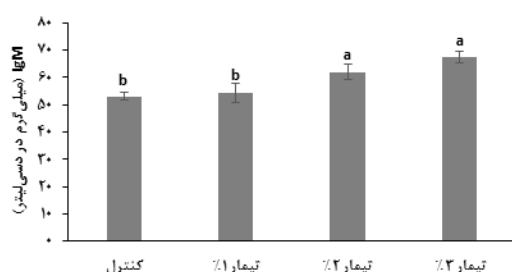
Table 1: Growth and survival indices in zebrafish fry fed with different levels of paprika powder for 56 days.

پارامتر	شاهد (۰)	۱ درصد	۲ درصد	۳ درصد
وزن نهایی (گرم)	0.27 ± 0.01^d	0.33 ± 0.01^c	0.37 ± 0.01^b	0.42 ± 0.03^a
طول کل نهایی (میلی‌متر)	3.20 ± 0.04^c	3.43 ± 0.01^b	3.44 ± 0.04^b	3.66 ± 0.03^a
افزایش وزن (گرم)	0.22 ± 0.01^d	0.27 ± 0.01^c	0.32 ± 0.01^b	0.36 ± 0.03^a
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	3.01 ± 0.09^b	3.18 ± 0.19^b	3.44 ± 0.26^a	3.62 ± 0.32^a
ضریب تبدیل غذایی	1.33 ± 0.04^a	1.24 ± 0.08^{ab}	1.23 ± 0.09^{ab}	1.08 ± 0.09^b
بازماندگی (درصد)	92.5 ± 0.0^a	93.75 ± 1.77^a	95.0 ± 0.0^a	97.5 ± 3.54^a
شاخص وضعیت (درصد)	2.53 ± 0.13^b	2.82 ± 0.09^a	2.28 ± 0.06^c	1.79 ± 0.07^d

* حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد است ($n=3$). داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

پارامترهای ایمنی سرم خون

فلفل پاپریکا مشاهده گردید (شکل ۲) که نشان دهنده اختلاف معنی دار در تیمارها بود ($p < 0.05$).

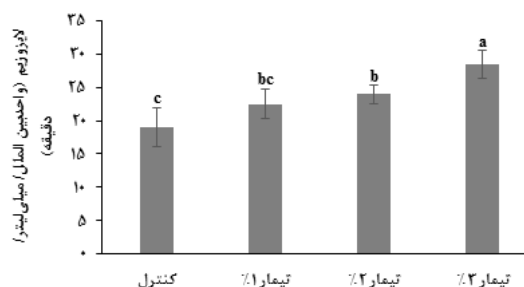


شکل ۲: میزان تغییرات IgM در بچه ماهی زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف پودر پاپریکا به مدت ۵۶ روز. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است. حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری است ($n=3$, $p < 0.05$).

Figure 2: Changes in IgM of zebra fish fed with different levels of paprika powder for 45 days. The antennas indicate standard deviations. Different letters indicate statistical significant difference between treatments ($n = 3$, $p < 0.05$).

با توجه به شکل ۳، میزان C3 در تیمارهای ۲ و ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا افزایش یافته بود و کمترین مربوط به گروه شاهد و ۱ درصد بود که دارای اختلاف معنی داری با سایر تیمارهای آزمایش بود ($p < 0.05$). علاوه بر این، تغییرات سطح کمپلمان C4 در سرم ماهی‌هایی تغذیه شده با افزودنی پودر فلفل پاپریکا همگی از نظر آماری در

با توجه به شکل ۱، بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم (28.5 ± 2.12) واحد بر میلی‌لیتر بر دقیقه) عصاره بدن متعلق به تیمار ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا بود که دارای اختلاف معنی داری با سایرین بودند ($p < 0.05$). همچنین کمترین میزان لیزوزیم در گروه شاهد (19.0 ± 2.12) واحد بر میلی‌لیتر بر دقیقه) اندازه گیری شد ($p < 0.05$).



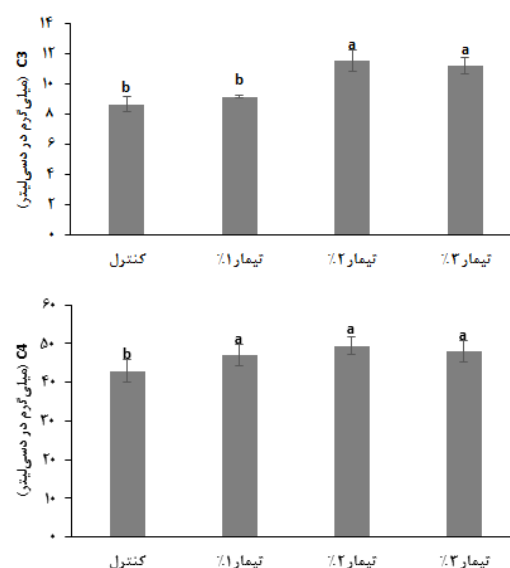
شکل ۱: تغییرات فعالیت لیزوزیم در بچه ماهی زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف پودر پاپریکا به مدت ۵۶ روز. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است. حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری است ($n=3$, $p < 0.05$).

Figure 1: Changes in the lysozyme activity of zebra fish fed with different levels of paprika powder for 45 days. The antennas indicate standard deviations. Different letters indicate statistical significant difference between treatments ($n = 3$, $p < 0.05$).

بیشترین میزان IgM در تیمارهای ۲ و ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا بود و کمترین در شاهد و تیمار ۱ درصد پودر

بر رشد و عوامل تغذیه‌ای تأثیر مثبت داشت و ضریب تبدیل غذایی را کاهش می‌داد که با نتایج این تحقیق منطبق است. در تحقیقی دیگر، کمالی و همکاران (۱۳۹۷) اثرات پودر فلفل دلمه‌ای قرمز و زنجبیل را بر ماهی اسکار مقایسه کردند و یافته‌ها حاصل از عملکرد بهتر فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای ماهیان تغذیه شده با ۵۵ میلی‌گرم فلفل قرمز در کیلوگرم غذا بود که با یافته‌های حاضر مطابقت دارند. تحقیقات متعددی اثرات مثبت فلفل قرمز بر رشد ماهیان را بیان نموده‌اند. برای مثال، ۸ درصد پودر فلفل قرمز سبب بهبود برخی شاخص‌های رشد بویژه افزایش وزن ماهی زینتی *Zacco platypus* شد (Lee et al., 2010). اثر بخشی مثبت پودر فلفل قرمز در سطح ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بر پارامترهای رشد، تغذیه و کیفیت لاشه ماهی تیلاپییای قرمز (*Oreochromis mossambicus*) بیان شده است (Yilmaz et al., 2013). فلفل قرمز علاوه بر غنی بودن از انواع ویتامین‌ها، مواد معدنی و به واسطه داشتن رنگدانه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و همچنین وجود سایر ترکیبات زیست فعال مثل کاپسایسین می‌تواند سبب بهبود عملکرد رشد، بهره‌وری غذا و سایر کارکردهای فیزیولوژیک بدن ماهی گردد (Talebi et al., 2013). فاکتور وضعیت چاقی نسبی را می‌توان برای مقایسه نسبی وزن یک نمونه ماهی با میانگین طول آن بکار برده می‌شود که تغییرات این شاخص علاوه بر کیفیت تغذیه و شرایط پرورش به گونه و شکل بدن ماهیان نیز مرتبط است (Kurkilahti et al., 2002). در این مطالعه با افزایش درصد پودر پاپریکا در جیره غذایی ماهی زبرا، شاخص وضعیت روند نزولی را طی کرد. این نتیجه نشان دهنده این مطلب است که به رغم افزایش معنی‌دار وزن، طول ماهیان رشد بالاتری یافته و نسبت قد به وزن در این گونه ماهی در طول دوره رشد سوماتیک بدن احتمالاً افزایش یافته که در نتیجه سبب کاهش این شاخص شده است. مشابه نتایج این مطالعه، روند کاهشی شاخص وضعیت در پاسخ به افزایش سطح اسید آراشیدونیک جیره غذایی در ماهی زبرا به دلیل افزایش رشد طولی ماهیان نسبت به وزن آنها گزارش شده است (خیابانی و همکاران، ۱۳۹۹).

یک سطح بوده ($p > 0.05$) اما در مقایسه با ماهیان گروه شاهد همگی افزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$).



شکل ۳: تغییرات اجزاء سیستم کمپلمان (C3 و C4) در بچه ماهی زبرا تغذیه شده با سطوح مختلف پودر پاپریکا به مدت ۵۶ روز. آنتنک‌ها نشان دهنده انحراف معیار است. حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری است ($n=3, p<0.05$).

Figure 3: Changes in the components of complement system (C3 and C4) in zebra fish fed with different levels of paprika powder for 45 days. The antennas indicate standard deviations. Different letters indicate statistical significant difference between treatments ($n=3, p<0.05$).

بحث

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که افزودن ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا در جیره بچه ماهیان زبرا سبب افزایش معنی‌داری برخی شاخص‌های رشد از جمله وزن نهایی بدن، افزایش وزن بدن، طول کل و ضریب رشد ویژه و همچنین کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی و شاخص وضعیت شد. Maniat و Ghotbeddin (۲۰۱۴) تأثیر سطوح مختلف پودر فلفل پاپریکا را بر برخی فاکتورهای رشد و تغذیه ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که پودر فلفل پاپریکا به میزان ۳ درصد

نتایج این مطالعه نشان داد مکمل سازی جیره غذایی ماهی زبرا با پودر پاپریکا سبب افزایش و بهبود سیستم ایمنی ماهیان در مقایسه با گروه شاهد می گردد. بیان شده است، فلفل پاپریکا منبع غنی از کاراتنوئیدها می باشد (Bjerkeng *et al.*, 2000). در واقع، کاراتنوئیدها یکی از شناخته شده ترین موادی هستند که با توجه به عدم ساخت آن در بدن باید همراه با غذا وارد بدن ماهی شده و با توجه به اثرات آنتی اکسیدان خود سبب تقویت سیستم ایمنی ماهیان می گردد (Segner *et al.*, 1989; Torrisen *et al.*, 1989). زیرا آنتی اکسیدانها رادیکالهای تولیدی را با مکانیسمهای مختلف خنثی می کنند و در نتیجه از پیامدهای منفی آنها مثل تخریب بافتی و بروز اختلالاتی فیزیولوژیک جلوگیری بعمل می آورند (Barja, 2004). بنابراین، بهبود پارامترهای سیستم ایمنی ماهیان زبرا تغذیه شده با پودر پاپریکا می تواند به دلیل وجود مقادیر مختلف ترکیبات پلی فنل به خصوص فلاونوئیدها و همچنین کاراتنوئیدها باشد. به طور مشابه، غیاثوند و شاپوری (۱۳۸۸) نشان دادند، ماهیان اسکار که با جیره های حاوی فلفل دلمه ای قرمز تغذیه شده بودند، سیستم ایمنی آنها بهبود یافته بود. Talebi و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثرات مثبت فلفل پاپریکا را بر سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل آلا ی رنگین کمان گزارش نموده اند. اگرچه تحقیقات متعددی اثرات فلفل را به عنوان یک افزودنی مفید در رژیم غذایی آبزیان بررسی نموده است، اما در این تحقیق برای اولین بار اثرات پودر فلفل بر ماهی زبرا به عنوان یک مدل زیستی انجام شده است. از جمله دلایل اهمیت بالای انجام اینگونه مطالعات در این نوع ماهی را می توان به علت شباهت های بالای ژنتیکی، فیزیولوژیک و فارماکولوژیک این ماهی با انسان، جهت تشخیص مواد طبیعی با پتانسیل های درمانی مختلف اشاره نمود (Goldsmith, 2004; Vasquez *et al.*, 2012). البته جهت تایید نتایج این گونه تحقیقات انجام وسیع سایر پژوهش های تکمیلی مورد نیاز است.

در این مطالعه تغییرات سطح فعالیت لیزوزیم در سرم ماهی هایی تغذیه شده با ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا حداکثر بود. لیزوزیم یک آنزیم تجزیه کننده قوی موجود

در خون و بافت های لنفوئیدی ماهیان است و یکی از مهمترین فاکتورها در ایمنی ذاتی ماهیان محسوب می شود (Magnadottir, 2006). در ماهیان لیزوزیم عمدتاً به وسیله نوتروفیل ها و ماکروفاژها تولید می شود (Sakai, 1999). بنابراین، احتمال دارد پودر پاپریکا با تحریک این نوع از گلبول های سفید سبب افزایش سطح لیزوزیم سرم خون شود. همچنین می توان احتمال داد باتوجه به وجود کاروتنوئیدهای طبیعی در پاپریکا قدرت دفاع غیر اختصاصی ماهیان افزایش یافته و به طبع آن سطح لیزوزیم سرم خون ماهیان زبرا افزایش معنی دار یابد (بیگی کلشتری و همکاران، ۱۳۹۸).

در این مطالعه، بیشترین میزان IgM در تیمار ۲ و ۳ درصد پودر فلفل پاپریکا بود و کمترین در تیمار شاهد و ۱ درصد پودر فلفل پاپریکا مشاهده گردید. ایمونوگلوبولین ها در ارتباط مستقیم با لنفوسیت های B می باشند و در پاسخ به عوامل خارجی و در نتیجه ورود آنتی ژن ها به بدن ماهی ایجاد می شوند (Lobb and Clem, 1982). بنابراین، احتمال دارد پودر پاپریکا باتوجه به ترکیبات زیست فعال خود سبب برانگیختن تکثیر لنفوسیت ها و ترشح ایمونوگلوبولین M در سرم خون شود.

در این مطالعه اجزاء C3 و C4 سرم ماهیان تغذیه شده با پودر پاپریکا به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود. تغییرات اجزاء کمپلمان سرم در حفاظت سلامت ماهیان بسیار مهم بوده و بالا بودن سطوح C3 و C4 بیانگر بالابودن سطح سیستم ایمنی آنها به دلایل افزایش فعالیت های فاگوسیتوز، واکنش های التهابی، القاء و بهبود پاسخ های آنتی بادی ماهی است (Mauri *et al.*, 2011). سیستم کمپلمان مجموعه ای مشتمل بر بیش از ۳۵ نوع پروتئین سرمی بوده و مکانیسم اجرایی آن شامل ایمنی همورال و ایمنی غیر اختصاصی بوده که بهبود آن قابلیت ماهیان را در مقابله با عوامل عفونی افزایش می دهد (Sunyer *et al.*, 1997). جزء C3 ترکیب اصلی در آبشار کمپلمان است و در گروه پروتئین های فاز حاد جای داشته و در فرآیندهای التهابی حاد افزایش می یابد و اصولاً افزایش مقادیر کمپلمان به خصوص C3 موجب افزایش

فعالیت فاگوسیتوزیس می شود (Zhang and Cui, 2014). همچنین حضور C3 نقش کلیدی در انفجار تنفسی لوکوسیت های قدامی کلیه دارد (خارا و همکاران، ۱۳۹۲).

به عنوان نتیجه گیری، پودر فلفل پاپریکا به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در بچه ماهی زبرا مطرح شد. با توجه به نتایج حاصله پودر اضافه شده به جیره غذایی ماهیان در مقادیر ۲ و ۳ درصد برای بالا بردن سیستم ایمنی تأثیرگذاری معنی داری داشت. اما افزودن پودر فلفل پاپریکا به میزان ۳ درصد در جیره، اثر بالاتری در افزایش فاکتورهای وزن و کاهش ضریب تبدیل غذا و بهبود بهره وری غذا نسبت به سایر تیمارها دارد. تحقیقات تکمیلی در خصوص آنزیم های گوارشی و خون شناسی ماهی زبرا در اثر استفاده از پودر پاپریکا توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین وسیله از همکاری های پرسنل محترم مجتمع آزمایشگاهی رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع

بیگی کلستری، ع.، حسینی، س.و.، فرهنگی، م. و رفیعی، غ.ر.، ۱۳۹۸. اثر استفاده از سطوح مختلف پودر هویج بجای آستاگزانتین سنتتیک در جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان: بررسی اثرات رشد و شاخص های بیوشیمیایی سرم خون. تغذیه آبزیان، ۵ (۱): ۵۹-۷۰.

خارا، ح.، محمد زاده، وا.، قیاسی، م. و رهبر، م.، ۱۳۹۲. بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل آلائی رنگین کمان و واجد عفونت باکتریایی (در مزرعه پورشی استان مازندران). مجله توسعه آبی پروری، ۷ (۲): ۱۷-۲۳.

خیابانی، ع.، کرامت، ع.، اورجی، ح.، اسماعیلی فریدونی، ا. و حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۹۹. تأثیر سطوح مختلف مکمل غذایی اسید آراشیدونیک بر شاخص های رشد و بازماندگی ماهی گورخری (*Danio rerio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹ (۲): ۱۷۹-۱۹۱. URL: <http://isfj.ir/article-1-2309-fa.html>

عنایت غلامپور، ط.، جعفری، و.، ایمانپور، م.ر. و کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۵. بررسی بیان ژن CYP19(a) و عملکرد تولید مثلی ماهی گورخری (*Danio rerio*) تغذیه شده با جیره غنی شده با عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۴ (۳): ۲۷-۴۲.

غیاثوند، ز. و شاپوری، م.، ۱۳۸۸. تأثیر رنگدانه های طبیعی و مصنوعی و مقایسه اثر آنها بر ماهی اسکار سفید (*Astronotus ocellatus*). زیست شناسی دریا، ۱ (۱): ۷۸-۸۵.

کمالی، م.، جرجانی، س.، قلیچی، ا. و کمالی، م.، ۱۳۹۷. تأثیر فلفل قرمز (*Capsicum annum*) و زنجبیل (*Zingiber officinale*) بر شاخص های رشد، تغذیه، بازماندگی و ترکیب لاشه ماهی اسکار *Astronotus ocellatus*، نشریه توسعه آبی پروری، ۱۲ (۴): ۱۰۷-۱۲۰.

مقدم نیا، ع.، حیدری، ب.، پورهادی، م. و برادران، م.، ۱۳۸۲. مقایسه اثرات درمانی پماد حاوی ماده موثر فلفل قرمز و ژل دیکلوفناک را در درمان استئوآرتریت تک مفصلی، مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۵ (۳): ۱۲-۱۷.

نراقی، م.، شمسایی مهرجان، م.، رجبی اسلامی، ه. و حسینی شکرابی، س.پ.، ۱۳۹۷. تأثیر مکمل سازی رژیم غذایی با پودر جلبک نانوکلوپسیس (*Nannochloropsis oculata*) بر برخی شاخص های خونی بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۲۷ (۶): ۱۰۵-۱۱۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118400

- Azimi, A., Imanpoor, M.R., Maleknejad, R. and Shokrollahi, S., 2014.** Effects of natural (red bell pepper and tomato) and synthetic (astaxanthin and α -carotene) pigments on flower horn fish (*Cichlasoma Sp.*) blood parameters. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(11): 2761-2767.
- Barja, G., 2004.** Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, 27(10): 595-600. DOI: 10.1016/j.tins.2004.07.005
- Barton, B.C., 2002.** Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42: 517-525. DOI: 10.1093/icb/42.3.517
- Bjerkeng, B., Storebakken T. and Liaaen-Jensen, S., 2000.** Response to carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*, 91: 153-162. DOI: 10.1016/0044-8486(90)90184-O
- Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973.** Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5: 771-781. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001.** Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte function: effect on gut and head kidney leucocyte. *Fish and Shellfish Immunology*. 11: 1-13. DOI: 10.1006/fsim.2000.0287
- Deepaa, N.C., Kaura, B., Georgea, Singhb, B. and Kapoor, H.C., 2007.** Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 40: 121-129. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.09.016
- Dugenci, S.K., Arda, N. and Candan, A., 2003.** Some medicinal plants as immune stimulants for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 99-106.
- Eidi, A., Eidi, M. and Badiei, L., 2009.** Antinociceptive effects of ethanolic extract of parsley (*Petroselinum crispum* L.) leaves in mice. *Medical Science Journal of Islamic Azad*, 19(3): 181-186.
- Figueroa, J.A., Islas, R.P., Palafox, J.P. and Carter, E.V., 2003.** Pigmentation of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2(2): 101-108.
- Fox, A.J., Poze-Insfran, D.D., Lee, J.H., Sargent S.A. and Talcott, S.T., 2005.** Ripening-induced chemical and antioxidant changes in bell peppers as affected by harvest maturity and postharvest ethylene exposure. *Horticultural Science*, 40(3): 732-736. DOI: 10.21273/HORTSCI.40.3.732
- Ghasemnezhad, M., Sherafati, M. and Payvast, G.L., 2011.** Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different

- harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3(1): 44-49. DOI: 10.1016/j.jff.2011.02.002
- Goldsmith, P., 2004.** Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(5): 504-512. DOI: 10.1016/j.coph.2004.04.005
- Grunwald, D.J. and Eisen, J.S., 2002.** Headwaters of the zebrafish-emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 3(9): 717-724. DOI: 10.1038/nrg892
- Hill, J.E., Kapuscinski, A.R. and Pavlowich, T., 2011.** Fluorescent Transgenic Zebra *Danio* More Vulnerable to Predators than Wild-Type Fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140: 1001-1005. DOI: 10.1080/00028487.2011.603980
- Howard, L., Talcott, S., Brenes, C. and Villalon, B., 2000.** Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48: 1713-20. DOI: 10.1021/jf990916t
- Kim, J.S., Lee, W.M., Rhee, H.C. and Kim, S., 2016.** Red paprika (*Capsicum annum* L.) and its main carotenoids, capsanthin and β -carotene, prevent hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junction intercellular communication. *Chemico-biological Interactions*, 254: 146-155. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.05.004
- Kurkilahti, M., Appelberg, M., Hesthagen, T. and Rask, M., 2002.** Effect of fish shape on gillnet selectivity: a study with Fulton's condition factor. *Fisheries Research*, 54(2): 153-170. DOI: 10.1016/S0165-7836(00)00301-5
- Lawrence, C., 2007.** The husbandry of Zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269:1-20. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077
- Lee, C.R., Pham, M.A. and Lee, S.M., 2010.** Effects of dietary paprika and lipid levels on growth and skin pigmentation of Pale Chub (*Zacco platypus*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(6):724-732. DOI: 10.5713/ajas.2010.90462
- Lobb, C.J. and Clem, L.W., 1982.** Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Developmental & Comparative Immunology*, 6(3): 473-479.
- Magnadottir, B., 2006.** Innate immunity of fish (overview.) *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2): 137-151. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Maniat, M., Ghotbeddin, N., Rajabzadeh, E. and Mohamadi Azaram, H., 2014.** Effect of different levels of paprika on some growth factors, survival and biochemical body composition of benni fish (*Mesopotamichthys sharpeyi*). *Academic Journal of Science Publication*, 3(3): 223-229.
- Mauri, I., Romero, A., Acerete, L., Mackenzie, S., Roher, N., Callol, A., Cano, I., Alvarez M.C. and Tort, L., 2011.** Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*)

- under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1): 182-188. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.10.006
- Reyes-Becerril, M., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F., Civera-Cerecedo, R. Gracia-López, V. and Barbosa-Solomieu, V., 2008.** Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280(1): 39-44. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.056
- Saberi, A., Zorriehzahra, M.J., Emadi, H., Kakoolaki, S. and Fatemi, S.M.R., 2017.** Effects of *Chlorella vulgaris* on blood and immunological parameters of Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) fry exposed to Viral Nervous Necrosis (VNN) virus. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(2), 494-510.
- Sakai, M., 1999.** Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2): 63-92.
- Segner, H., Arend, P., Von-Poeppinghaussen, K. and Schmidt, H., 1989.** The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of the liver. *Aquaculture*, 79: 381-390. DOI: 10.1016/0044-8486(89)90480-8
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C.T., Janes, M. Prinyawiwatkul, W. and No, K.H., 2007.** Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, 72(2): 98-102. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2006.00245.x
- Sunyer, J.O., Ort, L.T. and Lambris, J.D., 1997.** Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish (*Sparus aurata*). *Biochemical Journal*, 326(3): 320-326. DOI: 10.1042/bj3260877
- Talebi, M., Khara, H., Zorriehzahra, J., Ghobadi, S.H., Khodabandelo, A. and Mirrasooli, E., 2013.** Study on effect of red bell pepper on growth, pigmentation and blood factors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Journal of Zoology*, 8 (1): 17-23. DOI: 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7136
- Torrison, O.J., Hardy, R.W. and Shearer, K.D., 1989.** Pigmentation of salmonids carotenoid deposition and metabolism. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1: 209-225.
- Vasquez, P.I., Osorio, F., Riquelme, S., Castro, S. and Herzog, R., 2012.** Zebrafish: A model for behavioral pharmacology. *Revista de Farmacologia de Chile*, 5(1): 27-32.
- Yanardag, R., Bolkent, S., Tabakoglu-Oguz, A. and Ozsoy-Sacan, O., 2003.** Effects of (*Petroselinum crispum*) extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26: 1206-10. DOI: 10.1248/bpb.26.1206
- Yilmaz, S., Ergun, S. and Soytaş, N., 2013.** Enhancement of growth performance and

pigmentation in red *Oreochromis mossambicus* associated with dietary intake of astaxanthin, paprika, or capsicum. *Evol's Publication*, 65: 1-7.

Zhang, S. and Cui, P., 2014. Complement system in zebrafish. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(1): 3-10. DOI: 10.1016/j.dci.2014.01.010.

Effects of dietary paprika powder (*Capsicum annum*) on some growth performance, survival rate, and immunological parameters of zebrafish (*Danio rerio*)

Lotfi K.¹; Hosseini Shekarabi S.P.^{2*}; Shamsaie Mehrgan M.¹

* hosseini@srbiau.ac.ir

1- Department of Fisheries Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

One of the major objectives in the modern and sustainable aquaculture industry is to increase the feed efficiency and survival rate. The present study is aimed to investigate the effect of paprika powder on some growth performance and immunological parameters in zebrafish for a period of 56 days. In this study, a total of 480 zebrafish fry (initial weight of 0.05g and length of 1.71 mm) were randomly divided into 12 tanks and fed with 0 (control), 1, 2, and 3 g of paprika powder per 100 gram of feed. The results of the growth indices and survival rate indicated that the highest weight gain (0.42 ± 0.02 g) and body weight increase (0.36 ± 0.03 g) was observed in 3% of paprika powder ($P < 0.05$). Immunological serum parameters including lysozyme, IgM, complement components (C3 and C4) which represented significant differences in comparison with the control group ($P < 0.05$). The highest activity level of lysozyme was observed in 3% of paprika powder and the highest levels of C3 and IgM were measured in both 2% and 3% of paprika powder. Moreover, addition of paprika powder at different levels without any significant differences between the treatments increased C4 level compared to the control group ($P < 0.05$). On the whole, dietary supplementation of paprika powder in zebrafish feed at the level of 3% led to the improvement of the growth performance as well as immunity modulation and probably can act as an immunostimulant.

Keywords: Zebrafish, Pepper, *Capsicum annum*, Growth, Immunity, Immunostimulant

*Corresponding author