

## "مقاله پژوهشی"

# اثر افزودن عصاره میوه گیاه آقطی (*Sambucus ebulus*) بر عملکرد رشد، فعالیت آنتی اکسیدانی سرم و ارزیابی ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حسین تقیان<sup>۱</sup>، محمدسوداگر<sup>۱\*</sup>، سیامک یوسفی<sup>۲</sup>، حامد پاکنژاد<sup>۱</sup>، علی حاجی بگلو<sup>۲</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- گروه شیلات، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۷

### چکیده

هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی بر عملکرد رشد، فعالیت آنتی اکسیدانی سرم و ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی کپور معمولی بود. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی  $7 \pm 1/08$  گرم به صورت مجزا با سه سطح عصاره میوه گیاه آقطی در رژیم غذایی شامل: ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد عصاره به ازای جیره و گروه شاهد به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، شاخص‌های رشد، آنتی اکسیدانی و بیان ژن‌های دخیل در ایمنی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی تاثیر معنی داری بر عملکرد رشد در مقایسه با گروه شاهد نداشت. شاخص‌های آنتی اکسیدانی تیمار تغذیه شده با سطح ۰/۳ درصد سبب کاهش معنی دار شاخص‌های آنتی اکسیدانی در مقایسه با سایر تیمارها و گروه شاهد گردید. علاوه بر این، ارزیابی نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن‌های *TNF-α* و *Lyz* در ماهی کپور معمولی نشان داد که سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی باعث افزایش معنی دار بیان این ژن‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که به کارگیری ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطی توانست به عنوان یک مکمل غذایی جهت بهبود شاخص‌های ایمنی و آنتی اکسیدانی کپور معمولی گردد. بنابراین، افزودن ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطی به جیره ماهی کپور معمولی توصیه می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** عصاره میوه آقطی، کپور معمولی، رشد، ایمنی، آنتی اکسیدان.

## مقدمه

رشد بهینه ماهیان ارتباط نزدیکی به نوع غذا و کیفیت مواد غذایی مورد استفاده دارد. امروزه بهره‌گیری از مکمل‌های غذایی از جمله راه‌کارهایی است که علاوه بر تأمین مواد مغذی جهت رشد و تکامل موجودات آبرزی، می‌توانند افزایش سلامت و مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا را به همراه داشته باشند. مکمل‌های غذایی یا افزودنی‌ها برای بهبود کارایی رشد، سلامت و زیبایی آبرزی، افزایش پایداری پلت و بهبود طعم غذا به کار می‌روند (Vulevic *et al.*, 2004).

در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبرزی پروری به عنوان محرک ایمنی جهت تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان رایج شده است (Rao *et al.*, 2006؛ قیاسی و همکاران، ۱۴۰۱). در بین محرک‌های ایمنی متعدد، محرک‌های ایمنی با منشأ گیاهی مطلوب‌تر می‌باشد (Harikrishnan *et al.*, 2011)؛ خطرات احتمالی کمتر بر موجود زنده و محیط زیست، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان بودن، پایداری و در دسترس بودن گیاهان دارویی توجهات زیادی را در سطح جهان به ویژه کشورهای پیشرفته به خود جلب نموده است (خدادادی و رنجبر، ۱۳۹۵).

برخی از مطالعات نشان داده‌اند که عصاره گیاهان مختلف می‌تواند باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، کاهش زمان دوره پرورش برای عرضه به بازار و کاهش هزینه‌های پرورش شوند (Javed *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر شناسایی گیاهان دارویی و بومی با خواص آنتی‌اکسیدان که در بهبود سلامتی موجودات زنده موثر باشد، بسیار مورد توجه محققان سازمان جهانی بهداشت قرار گرفته است.

گیاه دارویی آقطی از گونه‌های ارزشمند دارویی شمال ایران می‌باشد و سالیان درازی است که مردم بومی استان مازندران به طرق مختلف در طب سنتی از فرآورده‌های آن پیشگیری و درمان بیماری‌های شایع خود استفاده‌های دارویی می‌برند. این گیاه متعلق به خانواده Caprifoliaceae می‌باشد، گیاهی است چند ساله، عمدتاً خزان‌کننده با برگ‌های سبز رنگ، گوشوارک‌دار و حدود ۵ تا ۱۱ برگچه دارد که در اواخر بهار با گل‌های ریز سفید یا کرم رنگ پدیدار می‌شوند (حسینی شکرابی و همکاران، ۱۳۹۹).

بررسی‌های انجام‌شده نشان داده‌اند که میوه و سایر بخش‌های گیاه آقطی حاوی ترکیبات مختلف عصاره، فلاونوئیدهای (روتین، کوئرستین، ایزو کوئرستین، استراگالین و نیکتوفلورین)، اسیدهای فنلی، موسیلاژ، تانن، الکلوئید، تری‌ترین، پکتین، رزین و ویتامین A و C (در میوه‌ها)، آنتوسیانین، سیانوژنیک گلیکوزید (در برگ‌ها) و ویبورینک اسید، ساپونین، کارتنوئیدها، مشتقات کافنیک اسید، ایبولیتین‌ها و مواد فرار می‌باشد (Mumcuoglu *et al.*, 2007). در مطالعات آزمایشگاهی وضعیت ضد التهابی و ضد ویروسی این گیاه به علت وجود فلاونوئیدها و تری‌ترین‌ها گزارش شده است (Newall *et al.*, 1996). Bobek و همکاران، (۲۰۰۱) نشان دادند که رژیم حاوی عصاره گیاه آقطی اثر دفاعی آنتی‌اکسیداتیو را افزایش می‌دهد. ماهی کپور معمولی از گونه‌های مهم اقتصادی در آب شیرین به شمار می‌آید و از معدود گونه‌هایی است که می‌توان آن را به عنوان ماهی اهلی به شمار آورد. مقاومت بالا نسبت به تغییرات محیطی، گوشت لذیذ، رشد سریع و قدرت تطابق زیاد در محیط‌ها و شرایط مختلف آبی، سبب شده که از ماهی کپور به‌عنوان گونه

و با رعایت نکات بهداشتی خشک گردیدند و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. غذادهی ماهیان روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن، ۳ مرتبه در روز و در طی یک بازه زمانی ۶۰ روزه انجام گرفت.

**تهیه عصاره:** نمونه‌ی گیاهی از رویشگاه‌های طبیعی استان مازندران تهیه و پس از تایید توسط گیاه‌شناس دانشکده گیاه پزشکی، در شرایط سایه و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. در این مطالعه از میوه گیاه برای تهیه عصاره استفاده شد. پس از آسیاب کردن، محتویات حاصله از الک با چشمه ۰/۵ میکرون عبور داده شدند تا پودر حاصله کاملاً یکدست و یکنواخت باشد. روش عصاره‌گیری به روش Hajdú و همکاران (۲۰۰۷) صورت گرفت؛ سپس عصاره اولیه به دست آمده در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تحت خلاء به مدت ۶ ساعت توسط دستگاه تبخیر دورانی تغلیظ شده و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

**سنجش شاخص‌های رشد:** جهت بررسی تاثیر عصاره میوه گیاه آقطنی بر شاخص‌های رشد ماهی کپور معمولی، زیست‌سنجی ماهیان در آخر دوره پرورش انجام گردید. ۲۴ ساعت قبل از هر بار زیست‌سنجی، تغذیه ماهیان متوقف و پس از حصول اطمینان از دفع کامل محتویات لوله گوارش، وزن ماهیان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ و طول آن‌ها با استفاده از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر مورد سنجش قرار گرفت. شاخص‌های رشد شامل میزان نرخ رشد ویژه (SGR)، افزایش وزن (BWG)، ضریب چاقی (CF)، و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در ماهی کپور معمولی بر اساس فرمول‌های ذیل تعیین گردید (Sajeevan et al., 2014):

ارجح در پرورش توأم کپورماهیان استفاده شود. همچنین از دیدگاه اقتصادی نیز بازار پسندی بالایی برخوردار می‌باشد و از جمله ماهیان مهم اقتصادی شیلاتی به‌شمار می‌رود (Chirwa et al., 2019؛ هرسیچ و آدینه، ۱۳۹۶؛ قیاسی و همکاران، ۱۳۹۹). با توجه به اهمیت اقتصادی این گونه پرورشی، هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر استفاده عصاره میوه گیاه آقطنی بر عملکرد رشد، برخی از شاخص‌های ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم و ارزیابی ژن‌های مرتبط با ایمنی (Lyz و TNF) در ماهی کپور معمولی بود.

## مواد و روش‌ها

**طراحی آزمایش:** برای انجام این پژوهش، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی  $1/08 \pm 7$  گرم از مرکز تکثیر و پرورش آبریان شهید رجایی ساری تهیه و به سالن پرورش ماهی شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان پس از دو هفته سازگاری با شرایط محیطی، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در چهار گروه تغذیه‌ای با جیره‌های حاوی ۰ (گروه شاهد)، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطنی تغذیه شدند (ایمنی و همکاران، ۱۳۹۴). در طول دوره غذادهی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری و بررسی می‌شد؛ دمای آب  $1/24 \pm$  ۲۸ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته  $0/5 \pm 7/1$  و میزان اکسیژن محلول نیز  $0/6 \pm 5/1$  میلی‌گرم در لیتر بود. برای خنثی کردن اثرات احتمالی محلول ژلاتین، تنها محلول ژلاتین ۵ درصد بدون عصاره میوه گیاه آقطنی به جیره گروه شاهد اسپری شد. جیره‌ها پس از آماده‌سازی، به مدت ۴۸ ساعت در هوای آزاد و دمای محیط

وزن اولیه (گرم) - وزن نهایی (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم)  
 $100 \times \text{وزن اولیه (گرم)} / \text{افزایش وزن (گرم)} = \text{درصد افزایش وزن (درصد)}$   
 $100 \times \text{طول دوره پرورش (روز)} / \text{[لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن نهایی]} = \text{نرخ رشد ویژه (درصد در روز)}$   
 $\text{افزایش وزن (گرم)} / \text{مقدار غذای مصرفی (گرم)} = \text{ضریب تبدیل غذایی}$   
 $\text{طول نهایی}^3 \text{ (سانتی متر)} / 100 \times \text{وزن نهایی (گرم)} = \text{ضریب چاقی}$

ایمنی (Lyz و TNF-a) از هر تیمار ۳ قطعه ماهی صید گردید. ماهیان صید شده قبل از نمونه برداری توسط پودر گل میخک به میزان ۵۰۰ میلی گرم در یک لیتر آب بی هوش شدند. پس از بیهوشی توسط پنبه آغشته به الکل سطح بدن ماهی کاملاً استریل شده و سریعاً اقدام به جمع آوری بافت پوست و روده گردید. نمونه بافت‌های به دست آمده در تیوپ‌های استریل قرار گرفتند و سریعاً به تانک ازت مایع منتقل شدند تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج RNA بر اساس روش Awad و همکاران (۲۰۱۳) توسط ماده هضم کننده RNAX- Plus و طبق دستورالعمل پیشنهادیه شرکت سازنده انجام شد. ارزیابی کیفی RNA کل توسط دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱٪ در دستگاه مستندساز ژل (ساخت انگلستان) با استفاده از پرتو فرابنفش صورت گرفت، همچنین، کمیت RNA که همان غلظت آن است، با استفاده از دستگاه نانودراپ (ساخت کشور انگلستان) در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر تعیین شد. در مرحله بعد، برای حذف DNA، از دستورالعمل به کارگیری آنزیم هضم کننده DNA با استفاده از کیت شرکت فرمنتاز محصول کشور آمریکا استفاده شد. برای سنتز cDNA نیز، از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت بایو ساخت کشور کره و طبق

### سنجش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سرم:

به منظور بررسی تاثیر عصاره میوه گیاه آقطی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کپور معمولی، ۲۴ ساعت پس از اتمام دوره پرورشی و توقف تغذیه خون‌گیری از ساقه دمی ماهیان صورت گرفت. به این صورت که تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی صید و پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) با استفاده از سرنگ ۲ سی سی فاقد ماده‌ی ضد انعقاد عملیات خونگیری انجام شد. به منظور اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز از کیت‌های سنجش نونند سلامت و طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده و مندرج روی بسته استفاده گردید. از این رو، جهت اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش نیترو بلو تترازولیوم هیدروکلوراید استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر خواننده شد. فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز بر اساس میزان پروتئین موجود در بافت محاسبه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر ثبت شد. فعالیت آنزیمی کاتالاز نیز در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید.

### سنجش بیان نسی ژن‌های ایمنی

**نمونه برداری از بافت:** پس از اتمام دوره پرورش و تغذیه، به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با

دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد (Miandare et al., 2013).

آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از مطالعات قبلی گرفته شدند و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر آن‌ها به دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای انجام Real time PCR نمونه‌ها در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۳ تکرار با حجم ۲۰ میکرولیتر

حاوی ۱۰ میکرولیتر بافرسایبرگرین، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش رونده ژن هدف و رفرنس، ۱ میکرولیتر آغازگر پس رونده ژن هدف و رفرنس، ۲/۸ میکرولیتر آب تزریق، ۰/۲ آنزیم تگک پلیمرز و ۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده بود. نتایج به دست آمده توسط دستگاه Real time PCR تحت عنوان CT می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند (Miandare et al., 2013).

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در کپورماهیان معمولی.

ژن	توالی پرایمر	سایز محصول (bp)
<i>TNF-α</i>	رفت: GCTGTCTGCTTCACGCTCAA برگشت: CCTTGGAAAGTGACATTTGCTTTT	۱۰۶
<i>LYZ</i>	رفت: GTGTCTGATGTGGCTGTGCT برگشت: TTCCCAGGTATCCCATGAT	۱۶۰
<i>actin Beta</i>	رفت: CCCTGCATGGATGTGTGGAT برگشت: GGGTGACACCATCACCAGAG	۱۸۶

شد و تمامی نمودارهای احتمالی در نرم‌افزار Excel (۲۰۱۰) رسم گردید (Pfaffl et al., 2002).

### نتایج

#### بررسی شاخص‌های رشد

اثر سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی بر شاخص‌های رشد در جدول ۲ ارائه گردیده است. بر اساس نتایج مشخص گردید که سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی تاثیر معناداری بر وزن نهایی، افزایش وزن بدن، نرخ رشد ویژه، ضریب چاقی و ضریب تبدیل غذایی نداشته است ( $p > 0.05$ ). همچنین، هیچ تاثیری بر میزان بازماندگی نداشت و هیچ تفاوت معناداری میان

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه صورت پذیرفت. همچنین، نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف و بارتلت بررسی شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین می‌باشند. همچنین، داده‌های به دست آمده از سنجش بیان نسبی ژن‌های مربوطه در مقایسه با ژن رفرنس از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده

تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ).

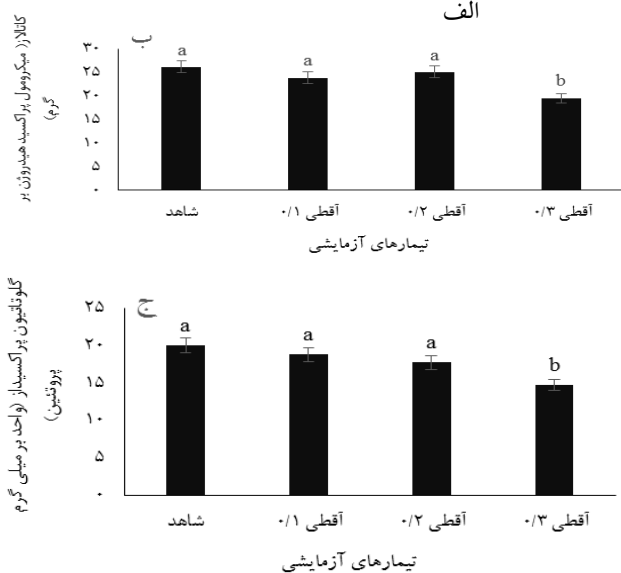
جدول ۲: بررسی شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آفتی در مدت ۶۰ روز

شاخص‌های رشد	شاهد	۰/۱ درصد	۰/۲ درصد	۰/۳ درصد
وزن اولیه (گرم)	۷/۱±۰/۱	۷±۰/۱	۷/۱±۰/۱	۷±۰/۱
طول اولیه (سانتی‌متر)	۷/۰۳±۰/۰۷	۷/۱۳±۰/۰۳	۶/۹۴±۰/۰۴	۷/۱±۰/۱۵
وزن نهایی (گرم)	۱۸/۹±۱	۱۷±۰/۶	۱۷/۵±۱/۳	۱۸/۴±۰/۴
طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۰/۳۶±۰/۱۰	۹/۹۴±۰/۱۳	۱۰/۱۷±۰/۲۲	۱۰/۲۶±۰/۱۲
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	۱۶۶±۱۸/۸	۱۴۲/۷±۷/۲	۱۴۶/۳±۱۹/۷ <sup>د</sup>	۱۶۳/۵±۷/۵
ضریب چاقی	۱/۶±۰/۱	۱/۷±۰/۱	۱/۶±۰/۱	۱/۷±۰/۱
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	۰/۸۱±۰/۰۶	۰/۷۴±۰/۰۲	۰/۷۵±۰/۰۶	۰/۸۱±۰/۰۲
ضریب تبدیل غذایی	۲/۹±۰/۱	۳/۱±۰/۱	۳/۱±۰/۲	۲/۹±۰/۰
بازماندگی (درصد)	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰

عدم وجود حروف انگلیسی نشانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد ( $p > 0.05$ ).

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم

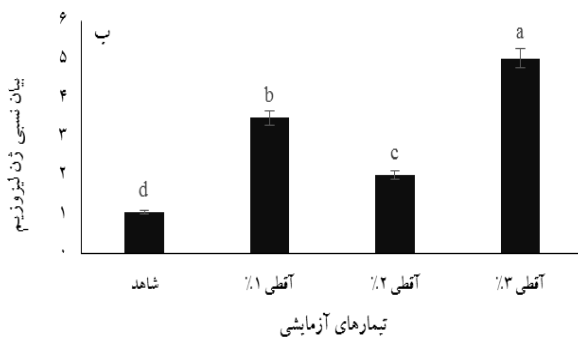
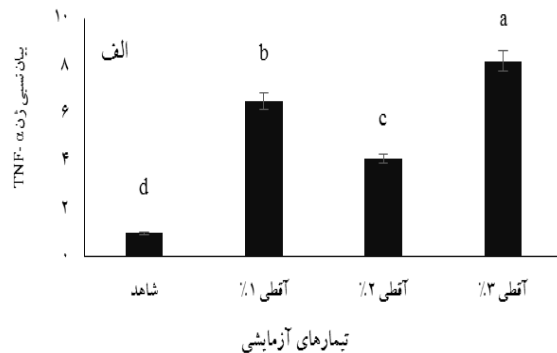
نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های آنزیمی تیمارهای آزمایشی در شکل ۱ ارایه گردیده است. همانطور که مشاهده می‌شود عصاره میوه گیاه آفتی در سطح ۰/۳ درصد، سبب کاهش معنادار شاخص‌های آنتی-اکسیدانی اندازه‌گیری در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد گردید ( $p < 0.05$ ). در تیمارهای تغذیه شده با سطوح ۰/۱ و ۰/۲ درصد عصاره میوه گیاه آفتی تاثیر معناداری در شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).



شکل ۱: غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون کپور ماهیان تغذیه شده با سطوح متفاوت عصاره میوه گیاه آفتی به مدت ۶۰ روز؛ الف) سوپراکسیداز دسموتاز، ب) کاتالاز و ج) گلوکاتایون پراکسیداز. حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون، نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

### مقادیر نسبی بیان ژن‌های ایمنی

ارزیابی نتایج حاصل از بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی کپور معمولی در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی باعث افزایش معنادار بیان ژن TNF- $\alpha$  و Lyz در مقایسه با گروه شاهد شد ( $p < 0.05$ )؛ به طوری که تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطی بیشترین و تیمار شاهد نیز کمترین میزان بیان نسبی این ژن را نشان دادند.



شکل ۲: بیان نسبی ژن‌های مرتبط با ایمنی؛ الف) TNF- $\alpha$  و ب) Lyz در ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقطی. حروف انگلیسی متفاوت بالای هر ستون نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

### بحث

امروز استفاده از رژیم غذایی حاوی محصولات گیاهی به دلیل طیف وسیعی از خواص مفید از جمله

تحریک و تقویت سیستم ایمنی در بسیاری از کشورها توسعه یافته است (Guardiola et al., 2016; Citarasu, 2010; Ahmadifar et al., 2014). در تحقیق حاضر نیز، از عصاره گیاهی جهت بررسی تاثیر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی استفاده گردید. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از عصاره میوه گیاه آقطی در سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد تاثیر معناداری بر شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی نداشته است. در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، حسینی شکرابی و همکاران (۱۳۹۹) بیان کردند که استفاده از عصاره گیاه آقطی با میزان ۱۰ گرم در کیلوگرم غذا سبب افزایش معنادار شاخص‌های رشد گردید. در تحقیق حاضر علی‌رغم این که عصاره‌های گیاهی بر سوخت و ساز بدن ماهیان تاثیرات مثبت می‌گذارند، هیچ تفاوتی در رشد گروه‌های تیمار و گروه شاهد مشاهده نشد. با این حال، نتایج نشان داد که سطوح متفاوت این عصاره هیچ تاثیر منفی روی رشد نداشت. در تقابل با نتایج مطالعه حاضر، Farrell و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای پس از بررسی تاثیر تغذیه موش‌ها با جیره‌های حاوی عصاره گیاه آقطی گزارش کردند که استفاده از عصاره این گیاه سبب کاهش وزن در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد شد.

درصد بازماندگی نشان‌دهنده ایمنی در مقابل عوامل بیماری‌زا و استرس‌های محیطی می‌باشد با این حال، درصد بازماندگی ماهیان در این آزمایش در تمامی تیمارها تفاوتی با گروه شاهد نداشت و در کل دوره تلفاتی مشاهده نشد که شاید بتوان این موضوع را به کیفیت بالای آب و فراهم بودن شرایط بهینه پرورش و نگهداری نسبت داد، این نتایج با نتایج تحقیقات Akrami و همکاران (۲۰۰۹ a.b) و شفیقی و

بحر کاظمی (۱۳۹۷) در ارتباط با عدم تاثیر معنی دار محرک های ایمنی در درصد بازماندگی میزبان مطابقت دارد.

بررسی شاخص های آنتی اکسیدانی نشان داد که افزودن عصاره میوه گیاه آقطنی به جیره ماهی کپور معمولی تاثیر معناداری در فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز داشته است؛ به طوری که کاهش معناداری میان تیمار تغذیه شده با جیره حاوی عصاره میوه گیاه آقطنی ۰/۳ درصد با سایر گروه های آزمایشی و گروه شاهد مشاهده شد. میوه گیاه آقطنی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدان مانند ترکیب های فنلی می باشد. ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدهای موجود در گیاه آقطنی می توانند سلول را در برابر تخلیه گلوکاتایون احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیم های آنتی اکسیدانی محافظت نمایند (Młynarczyk *et al.*, 2018). همچنین این گیاه دارای مقادیر زیاد ویتامین C و E است و خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار زیادی دارد (Fazio *et al.*, 2013). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش اساسی در حفاظت از بافت های بدن در مقابل رادیکال های آزاد اکسیژن دارد و به منظور مقابله با رادیکال های آزاد سوپراکسید به مولکول اکسیژن معمولی یا هیدروژن پراکسید تبدیل می شود؛ بنابراین، از علل کاهش معنادار در غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار حاوی ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطنی در این مطالعه می توان به دلیل عملکرد مشابه ویتامین های C و E در حذف رادیکال های آزاد توجه نمود، زیرا در این صورت مقادیر کمتری از آنزیم سوپراکسید دیسموتاز صرف فرآیند خنثی سازی و دفع رادیکال های آزاد می شود و در نهایت مقادیر کمتری از آن ترشح شده و یا

در همان میزان همیشگی ترشح می شود (Farzollahi, 2013; Vetrivel *et al.*, 2019). کاتالاز نیز، آنزیم تجزیه کننده پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن می باشد و نقش مهمی در سیستم آنتی اکسیدانی دارد. غلظت اندازه گیری شده این آنزیم نیز تفاوت معناداری در تیمار تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطنی با سایر تیمارها و گروه شاهد نشان نداد. کاهش معنادار غلظت آنزیم کاتالاز در این تیمار می تواند به علت ترکیبات فنولیک موجود در عصاره میوه گیاه آقطنی باشد که خود به عنوان دهنده های هیدروژن، گیرنده های فلزات و احیا کنندگی عمل می کنند.

گلوکاتایون پراکسیداز آنتی اکسیدانی بسیار قوی می باشد که نقش اساسی در محافظت اجزای مهم سلولی را در برابر واکنش با گروه های عاملی اکسیژن دار (پراکسیدها و رادیکال های آزاد) دارد. گلوکاتایون با ترکیباتی که رادیکال آزاد دارند واکنش داده و ترکیب می شود و در نهایت از بدن خارج می گردد (Peixoto *et al.*, 2016). این آنزیم نیز در مطالعه حاضر در تیمار تغذیه شده با ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقطنی کاهش معناداری را نشان داد. همان طور که اشاره شد از آن جایی که گیاه آقطنی یکی از گیاهان دارای مقادیر بالای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد (Pliszka *et al.*, 2005; Zheng, and Wang, 2003)؛ مقادیر بالای آنتوسیانین ها در این گیاه یکی از عوامل حائز اهمیت در افزایش ایمنی آنتی اکسیدانی در نظر گرفته می شود (Młynarczyk *et al.*, 2018). به طور کلی می توان چنین بیان داشت که کاهش معنادار سطوح آنزیم های آنتی اکسیدانی در تیمار تغذیه شده با عصاره آقطنی در سطح ۰/۳ درصد گویای تاثیر موثر عصاره گیاه آقطنی

در خنثی کردن هیدروکسی رادیکال‌های آزاد بوده است که در نهایت منجر به کاهش میزان تولید پراکسید هیدروژن شده است و در پی آن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمتری تولید شده است؛ چرا که، بدن پیوسته در حال مواجهه با شرایطی است که ممکن است بر اثر استرس‌های محیطی نیاز به تولید این آنزیم‌ها و رساندن بدن به حالت پایدار باشد. در همین راستا می‌توان به موارد مشابه در ارتباط با استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان محرک ایمنی اشاره کرد. به عنوان مثال، Li و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی تاثیر گیاه آلیوم مونگولیسوم (*Allium mongolicum*) بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی سرماری (*Channa argus*) گزارش کردند که استفاده از این عصاره تغییر معناداری در میزان شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در این ماهی ایجاد نکرده است. نتایج حاصل از بررسی تأثیر افزودن ویتامین E و C به جیره ماهی قرل‌آلای رنگین‌کمان بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل: سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نیز سبب کاهش معناداری این آنزیم‌ها در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد شد (میرواقفی و همکاران، ۱۳۹۴) که نتایج تحقیقات فوق با نتایج این مطالعه همسو می‌باشد؛ چرا که عصاره میوه گیاه آقظی دارای مقادیر قابل توجهی ویتامین E و C است.

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی، تغذیه با جیره حاوی سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقظی باعث افزایش معناداری بیان ژن TNF- $\alpha$  و Lyz در ماهی کپور معمولی در مقایسه با گروه شاهد گردید. به طوری که بیشترین میزان بیان این ژن‌ها در تیمار حاوی سطح ۰/۳ درصد عصاره میوه گیاه آقظی به ثبت رسید. در سیستم ایمنی ماهیان و در رابطه با التهابات مولکول

سایتوکینی فاکتور نکروز کننده تومور نقش مهمی دارد که در پی ایجاد تحریک سیستم ایمنی از گلبول‌های سفید ترشح می‌شود که یک تعدیل کننده اصلی و سایتوکین موثر بر پاسخ‌های التهابی و ضد میکروبی می‌باشد (Grayfer et al., 2008) که علاوه بر خون در کلیه نیز تولید می‌شود (Savan and Sakai, 2006). صفری و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردند که استفاده از عصاره هیدرو الکلی گیاه آنگوزه توانست به واسطه افزایش بیان نسبی سایتوکین‌های التهابی به بهبود وضعیت ایمنی در ماهی گورخری (*Danio rerio*) کمک نماید. نتایج حاصل از پژوهش Zemheri-Navruz و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که استفاده از عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) در جیره غذایی ماهی کپور معمولی سبب افزایش معنادار بیان ژن TNF-a شده است. همچنین گزارش شده است که استفاده از عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) در جیره غذایی ماهی قرمز (*Carassius auratus*) افزایش معنادار در بیان ژن TNF-a را به دنبال داشت (Rashmei et al., 2020). فاکتور نکروز کننده تومور آلفا همانند سایر اعضای خانواده خود به صورت یک تریمر به پذیرنده‌ی خود متصل می‌شود. این حالت موجب اتصال متقاطع پذیرنده‌ها به وسیله لیگاند می‌شود که سپس موجب انتقال پیام به درون سلول می‌گردد. از جمله عناصر تغذیه‌ای که سبب افزایش ترشح سایتوکین‌ها، اینترلوکین‌ها و عامل نکروز توموری آلفا می‌گردند وجود مقادیر زیاد بتاگلوکان، پلی ساکاریدهای سولفاته و یا نوکلئوتیدها می‌باشد (قائدی و همکاران، ۱۳۹۳) که بر اساس گزارش Młynarczyk و همکاران (۲۰۱۸) گیاه آقظی یکی از منابع غنی پلی ساکاریدی می‌باشد که می‌تواند از جمله

عوامل توجیه کننده افزایش بیان ژن‌های ایمنی در این بررسی باشد. این فاکتور به صورت یک پیش پپتید ساخته می‌شود و سپس در درون سلول، به وسیله یک آنزیم مبدل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TACE)<sup>۲</sup> پردازش شده، به فرم بالغ خود بدل می‌شود که ترشحی است و ۱۵۷ اسید آمینه طول دارد. تمامی این مطالعات موید تاثیر مثبت برخی از عصاره‌های گیاهی بر شاخص‌های ایمنی ماهیان می‌باشند، که این نتایج نیز با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد.

لیزوزیم نیز، یکی از شاخص‌های بسیار مهم در سیستم ایمنی ماهی می‌باشد زیرا به طور مستقیم سبب فعال‌سازی لکوسیت‌ها و ماکروفاژها شده و عمل فاگوسیتوز را در ماهیان آب شیرین افزایش می‌دهد (Siwicki and Anderson, 1993). لذا افزایش آن می‌تواند از جمله موارد مهم جهت پیشگیری از بروز بیماری در ماهی باشد. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر، قرایی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) بر بیان ژن لیزوزیم در ماهی گورخری نشان دادند که تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف این عصاره افزایش معناداری در مقایسه با گروه شاهد داشتند. Beltrán و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که استفاده از پوست لیمو در جیره شانک ماهی (*Sparus aurata*) به مدت ۳۰ روز سبب افزایش معناداری در میزان شاخص‌های ایمنی در این ماهی شده است. لیزوزیم آنزیمی کاتیونی است که پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلول باکتریایی را می‌شکند، بنابراین تولیدمثل باکتری‌ها را در موجودات زنده مهار می‌کند (Saurabh and Sahoo, 2008). ترکیبات گیاهی می‌توانند سلول‌های کبدی و خونی را

تحریک به آزادسازی بیشتر لیزوزیم نمایند (Liu et al., 2016; Angela et al., 2020). سیستم ایمنی به تعداد محدودی از گیرنده‌های شناسایی الگو مانند گیرنده‌های شبه‌تول که مسئول شناسایی الگوهای عامل بیماری‌زا هستند، متکی است. فعال شدن این گیرنده‌ها سبب القا پاسخ‌های ایمنی شامل تولید ایزوزیم، سایتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین‌ها می‌شود (Angela et al., 2020). که این امر می‌تواند از دلایل توجیه افزایش بیان ژن‌های ایمنی در ماهیان کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقظی باشد. چرا که ترکیبات موجود در این گیاه مانند یک محرک سبب تحریک ایمنی و القای ایمنی ذاتی در ماهیان تغذیه شده با این عصاره در مقایسه با گروه شاهد گردید. با توجه به اینکه استفاده از عصاره‌های گیاهان مختلف در بسیاری از گونه‌های ماهیان سبب بهبود پاسخ ایمنی در آن‌ها شده است (Awad et al., 2013) و دسترسی به اغلب عصاره‌های گیاهی ارزان و آسان می‌باشد؛ لذا، بسیاری از محققین علاقه‌مند به استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان جایگزینی برای محرک‌های مصنوعی می‌باشند.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که جیره غذایی حاوی سطوح مختلف عصاره میوه گیاه آقظی بر شاخص‌های رشد در ماهی کپور معمولی تاثیر معناداری نداشت. ولی، استفاده از عصاره میوه گیاه آقظی در سطح ۰/۳ درصد سبب کاهش معنادار آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی گردید. استفاده از عصاره میوه این گیاه سبب افزایش معنادار در بیان ژن‌های ایمنی (TNF- $\alpha$  و Lyz) در کپور ماهیان شد. بنابراین می‌توان چنین بیان داشت

<sup>۲</sup>Tumor necrosis factor alpha

۳. خدادادی، م.، رنجبر، ش. و.، ۱۳۹۵. تأثیر افزودن پودر چای سبز *Camellia sinensis* به جیره‌ی غذایی بر برخی فاکتورهای ایمنی و پروتئین‌های سرم در ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*. مجله دامپزشکی ایران، ۱۲(۲)، ۴۳-۵۴.

۴. شفیقی، ط.، بحر کاظمی، م.، ۱۳۹۷. تأثیر سطوح متفاوت پری بیوتیک اینولین جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیب لاشه بچه ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*). مجله علمی- پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۷(۲)، ۳۲-۲۳.

۵. صفری، ر.، مقدم‌فر، س.، ایمانپور، م. ر.، شعبانی، ع.، جعفر نوده، ع.، ۱۳۹۵. ارزیابی اثرات ناپلی غنی شده با ید بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در ماهی زبرا گوره خری (*Danio rerio*). مجله بوم‌شناسی آبزبان، ۶(۱)، ۹۳-۱۰۱.

۶. قائدی، ع.، صحافی، ه. ح.، ضرغام، د.، ۱۳۹۳. نقش تغذیه در افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهیان. نشریه آبزبان زینتی، ۱(۴)، ۲۸-۲۱.

۷. قرایی، ا.، ابراهیمی جرجانی، ح.، میردادره‌ریجانی، ج.، کلنگی میاندره، ح.، ۱۳۹۸. بررسی تاثیر عصاره گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) خوراکی بر بیان ژن‌های لیزوزیم، IL1 و TNF در ماهی گورخری. مجله آبزبان زینتی، ۶(۱)، ۵۰-۴۱.

۸. قیاسی، م.، سلیمانی، ن.، شجاعی، ل.، بینایی، م.، ۱۳۹۹. ارزیابی تغییرات برخی شاخص‌های خونی، سرمی و ایمنی ماهیان کپور معمولی طی زمستان گذرانی. توسعه آبی‌پروری، ۱۴(۱): ۸۱-۹۱.

۹. قیاسی، م.، بینایی، م.، قائدینیا، ب.، فارابی، س. م. و.، علوی، ا.، ۱۴۰۱. ارزیابی اثر اسانس

که عصاره میوه گیاه آقطی از جمله مواد طبیعی می‌باشد که بر عملکرد سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی اثر مثبت می‌گذارد و استفاده از عصاره آن از راه تجویز خوراکی توانست موجب بهبود شاخص‌های آنتی-اکسیدانی و سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی گردد. از این رو، به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره میوه گیاه آقطی به عنوان یک محرک ایمنی طبیعی و ارزان قیمت حاوی سطوح بالای پروتئین و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به عنوان مکمل غذایی مناسب برای ماهیان کپور معمولی در نظر گرفته شود. هر چند مطالعات گسترده‌تر جهت درک بهتر نقش عصاره میوه گیاه آقطی در پاسخ‌های ایمنی در سطح مولکولی مورد نیاز می‌باشد.

## سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

## منابع

۱. امینی، ب.، کرامت، ج.، حجت‌الاسلام، م.، جهادی، م.، محمودیان، ک.، ۱۳۹۴. ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه مرزه زراعی در روغن کلزا و روغن ماهی کیلکا. علوم غذایی و تغذیه، ۱۲(۳)، ۳۸-۲۹.
۲. حسینی شکرابی، س. پ.، شاه رکنی، ش.، نظری، ک.، شمسایی، م.، توتونچی، س.، ۱۳۹۹. تاثیر سطوح مختلف عصاره گیاه آقطی بر عملکرد رشد و پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی. مجله علمی شیلات ایران، ۳۰(۱)، ۸۳-۹۲.

- enzyme activities and genes expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 107, 379-384.
16. Awad, E., Austin, D., Lyndon, A.R., 2013. Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Aquaculture, 388, 193-197.
17. Bobek, P., Nosalova, V., Cerna, S., 2001. Inflation of diet containing extract of black elder (*Sambucus nigra*) on colitis in rats. Bratislava, 50(6), 643-648.
18. Beltrán, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A., Esteban, M.Á., 2017. Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the antioxidant status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and shellfish immunology, 64, 426-436.
19. Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18(3), 403-414.
20. Chirwa, E.R., Kassam, D., Jere, W.L., 2019. The farming of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in malawi: Review about history and policy research directions. International Journal of Social Sciences: Current and Future Research Trends, 1(1), 56-69.
21. Farzollahi, H., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., 2019. Single and combined effects of Chicory (*Cichorium intybus* L.) and Hypericum perforatum extracts on immune indices and antioxidant enzymes activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science, 1, 165-176.
22. Farrell, N.J., Norris, G.H., Ryan, J., Porter, C.M., Jiang, C., Blesso, C.N., 2015. Black elderberry extract attenuates inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. British Journal of Nutrition, 114(8), 1123-1131.
23. Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R.F., Gabriele, B., 2013. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. Food chemistry, 140(4), 817-824.
- اکالپتوس بر شاخص‌های رشد، خون، ایمنی و افزایش مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان کپور پرورشی. توسعه آبی پروری، ۱۶(۲): ۱۳۱-۱۱۹.
۱۰. میرواقفی، ع.، علی، م.، اسدی جمنانی، ف.، ۱۳۹۴. بررسی تأثیر افزودن ویتامین E سلنیوم و C به جیره بر پارامترهای شاخص در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۲(۴): ۴۸-۳۳.
۱۱. هرسیج، م.، آدینه، ح.، ۱۳۹۶. امکان‌سنجی پرورش ماهی کپور معمولی در پساب تصفیه شده از ضایعات کشتارگاهی طیور: بررسی کیفیت آب، عملکرد رشد و ترکیبات بدن. توسعه آبی پروری، ۱۱(۳): ۱۲۳-۱۳۵.
12. Ahmadifar, E., Mansour, M.R., Amirkolaie, A.K., Rayeni, M.F., 2014. Growth efficiency, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of thymol-carvacrol. Animal Feed Science and Technology, 198, 304-308.
13. Akrami, R., Hajimoradloo, A., Matinfar, A., Abedian Kenari, A., Alimohammadi, A., 2009a. The effects of dietary inulin on growth performance, nutrition, survival and body composition of juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of World Aquaculture Society, 40(6), 771-779.
14. Akrami, R., Ghelichi, A., Manuchehri, H., 2009b. Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Marine Science and Technology, 4, 1-9.
15. Angela, C., Wang, W., Lyu, H., Zhou, Y., Huang, X., 2020. The effect of dietary supplementation of *Astragalus membranaceus* and *Bupleurum chinense* on the growth performance, immune-related

- Nikinmaa, M., 2013. Developmental transcription of genes putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate, *General and comparative endocrinology*, 182, 41-47.
32. Mumcuoglu, M., Ferne, M., Safirman, D., 2007. Elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Encyclopedia of Dietary Supplements. Biotechnology*, 7(18), 3188-3192.
33. Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., Łysiak, G.P., 2018. Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of functional foods*, 40, 377-390.
34. Newall, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. 1996. *Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals*. London, The Pharmaceutical Press. pp.104-110.
35. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 36-36.
36. Pliszka, B., Wazbinska, J., Puczel, U., Huszcza-Ciolkowska, G., 2005. Biologicznie czynne związki polifenolowe zawarte w owocach różnych odmian hodowlanych i dziko rosnącego bzu czarnego. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2(507), 443-449.
37. Peixoto, M.J., Svendsen, J.C., Malte, H., Pereira, L.F., Carvalho, P., Pereira, R., Gonçalves, J.F., Ozório, R.O., 2016. Diets supplemented with seaweed affect metabolic rate, innate immune, and antioxidant responses, but not individual growth rate in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 2061-2071.
38. Rao, Y.V., Das, B.K., Jyotirmayee, P., Chakrabarti, R., 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(3), 263-273.
39. Rashmei, M., Shekarabi, S.P.H., Mehrgan, M.S., Paknejad, H., 2020. Stimulatory effect of dietary chasteberry (*Vitex agnus-*
24. Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C., Esteban, M.A., 2016. Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and shellfish immunology*, 52, 298-308.
25. Grayfer, L., Walsh, J.G., Belosevic, M., 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(5), 532-543.
26. Hajdú, Z.1, Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., Falkay, G., Cossuta, D., Máthé, I., 2007. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnuscastus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research*, 21(4), 391-404.
27. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo., M.S., 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317, 1-15.
28. Javed, M., Durrani, F.R., Hafeez, A., Khan, R.U., Ahmad, I., 2009. Effect of aqueous extract of plant mixture on carcass quality of broiler chicks. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*, 4(1), 37-40.
29. Li, M., Zhu, X., Tian, J., Liu, M., Wang, G., 2019. Dietary flavonoids from *Allium mongolicum* Regel promotes growth, improves immune, antioxidant status, immune-related signaling molecules and disease resistance in juvenile northern snakehead fish (*Channa argus*). *Aquaculture*, 501, 473-481.
30. Liu, Y., Song, L., Sun, Y., Liu, T., Hou, F., Liu, X., 2016. Comparison of immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after knock down of Toll and IMD gene in vivo. *Developmental & Comparative Immunology*, 60, 41-52.
31. Miandare, H.K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K.T.,

lingonberries. Journal of Agricultural and food Chemistry, 51(2), 502-509.

- castus*) extract on immunity, some immune-related gene expression, and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish (*Carassius auratus*). Fish and Shellfish Immunology, 107, 129-136.
40. Sajeevan, S., Varkey, A. M. T., Vadakkedath, M., 2014. Biometric parameters of the Redline torpedo fish *Puntius denisonii* Day 1865, an endemic barb in the Western Ghats Hotspots of Southern India. International Journal of Aquatic Biology, 2(2), 75-84.
41. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland, 105-12.
42. Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture research, 39(3), 223-239.
43. Savan, R., Sakai, M., 2006. Genomics of fish cytokines. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 1(1), 89-101.
44. Vulevic, J., Rastall, R.A., Gibson, G.R., 2004. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. FEMS microbiology letters, 236(1), 153-159.
45. Vettrivel, C., Pugazhendy, K., Meenambal, M., Jayanthi, C., 2013. Curative Efficacy of *Spirulina* against lead acetate toxicity on the *Cyprinus carpio* (Linn.) Fresh Water Fish. Int. Journal of Pharmaceutical and Biological Science Archiv, 4(3), 537-542.
46. Zemheri-Navruz, F., Acar, Ü., Yılmaz, S., 2019. Dietary supplementation of olive leaf extract increases haematological, serum biochemical parameters and immune related genes expression level in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish and shellfish immunology, 89, 672-676.
47. Zheng, W., Wang, S.Y. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and