

Effects of hydroalcoholic extract of *Chenopodium album* on growth factors, antioxidant enzymes and expression of some immune-related genes in zebrafish (*Danio rerio*)

Shahriari, P.¹, Rahimi, R.^{1*} Shafiei, Sh.³, Nikookhah, F.⁴, Rahimi Pordanjani, H.⁵

1- Department of Fisheries Sciences, Faculty of Natural Resources and Earth Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2- Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: 8 July 2024

Accepted: 1 September 2024

Abstract:

Introduction: Farmed fish are exposed to several infectious diseases that can reduce the fish yield. Today, the use of medicinal plants as healthy way can decrease the mortality and improve the growth rates to achieve farmed fish sustainability. *Chenopodium album* contains many bioactive compounds that can be beneficial to the health of organisms. It is evident from the previous studies that this medicinal plant significantly has antimicrobial, antistress, immunostimulants, growth promotion and appetite stimulation properties. Considering the beneficial compounds and properties of the native plant, we aim to investigate the effects of various the dose of the hydroalcoholic extract of this plant on growth factors, antioxidant enzymes, and the expression of some immune genes in zebrafish as an important and widely used vertebrate model organism in scientific research.

Materials and methods: *C. album* was added to a basal diet at the rate of 0, 0.25, 0.50, 1 and 1.5 g kg⁻¹ and *Danio rerio* was fed this diet for 56 days. A total of 300 *D. rerio* with an average body weight of 181 ± 1.06 mg were randomly divided into five treatment groups with three replicates. The fish were fed twice a day (at 9:00 AM and 2:00 PM) at the rate of 3% of their biomass. Growth performance was calculated according to their equations and RNA purification and cDNA synthesis were done according to the manufacturer's instruction. Gene expression levels were also assessed applying a Real-Time PCR machine.

Results and Discussion: Final weight and weight gain were not significantly enhanced in treatment groups compared to those of the control ($p < 0.05$). Furthermore, the expression levels of lysozyme, IL10, TNF and TGF genes and the activity levels of antioxidant enzymes CAT and SOD, in treatment groups were significantly higher than the control treatment ($p < 0.05$). This may be due to the existence of polyphenols, phytochemicals, flavonoids, carotenoids and the antioxidant properties of the plant.

Conclusion: According to the results, we saw a better innate immune system in zebrafish following supplementation of a methanolic extract of *C. album*. Additionally, the zebrafish model seems applicable for elucidation of gene expression on the vertebrate organism and may contribute to our understanding of *C. album* products in human patients.

Keywords: *Chenopodium album*, growth, gene expression, antioxidant enzymes, zebrafish

* Corresponding Author: rrahimi@sku.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه سلمک (*Chenopodium album*) بر فاکتورهای رشد، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان برخی از ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

پژمان شهریاری^۱، روح‌اله رحیمی^{۱*}، شفیق شفیعی^۲، فرزانه نیکوخواه^۱، حسین رحیمی پردنجانی^۱

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۱۸

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به عنوان مکمل در رژیم غذایی ماهیان توجه زیادی را به خود جلب کرده است. گیاه سلمک (*Chenopodium album*) به عنوان یک داروی گیاهی حاوی ترکیبات فعال زیستی فراوانی می‌باشد که می‌تواند در سلامت موجودات مفید باشد. هدف از این مطالعه بررسی شاخص‌های رشد، میزان بیان ژن‌های ایمنی (LYZ, IL1, IL10, TNF, TGF) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (GPX, CAT, SOD) در ماهی گورخری (*Danio rerio*) پس از تغذیه با عصاره گیاه دارویی سلمک بود. تیمارهای آزمایشی شامل ماهیان تغذیه شده با غذاهای حاوی صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد عصاره گیاه سلمک بود. ماهی‌ها به مدت ۸ هفته و طی دو نوبت در روز غذادهی شدند. طبق نتایج از نظر شاخص‌های رشد و تغذیه تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی دیده نشد ($p > 0/05$). همچنین میزان بیان ژن IL1 در هیچ کدام از تیمارها معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). بیشترین میزان بیان ژن‌های LYZ، IL10، TNF و TGF در تیمارهای آزمایشی ۲، ۳ و ۴ مشاهده شد که با تیمار کنترل تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). از نظر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در آنزیم GPX تغییر معنی‌داری ایجاد نشد ($p > 0/05$) ولی فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در تیمارهای تغذیه شده با عصاره گیاهی سلمک به طور معناداری از گروه شاهد بیشتر بود ($p < 0/05$). به طور کلی جیره غذایی حاوی عصاره گیاهی سلمک تا سطح ۱ درصد، بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی گورخری تأثیرگذار بود. نتایج کلی این مطالعه حاکی از تأثیر مثبت عصاره گیاه سلمک به عنوان یک افزودنی طبیعی، در افزایش توان سیستم ایمنی ماهیان می‌باشد.

کلمات کلیدی: گیاه سلمک، رشد، بیان ژن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ماهی گورخری.

مقدمه

شیوع بیماری‌های عفونی و غیرعفونی یکی از مشکلات اساسی پرورش آبزیان به ویژه در سیستم‌های پرورش متراکم است (Cho and Le, 2012). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور مقابله با بیماری‌ها باعث افزایش مقاومت باکتری‌ها و اثرات مخرب زیست-محیطی می‌شود (Ghiasi et al., 2015). استفاده از واکسن‌های تجاری نیز به علت عدم تکامل ایمنی اختصاصی و پاسخ پادتنی ضعیف ماهیان، مرسوم نمی‌باشد (Ardo et al., 2008). لذا امروزه به منظور افزایش مقاومت ماهیان، استفاده از ترکیبات گیاهی محرک سیستم ایمنی جهت کنترل بیماری در صنعت آبی‌پروری توصیه می‌شود که نسبت به مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر است (Ndeda, 2022). ترکیبات گیاهی همچنین به دلیل قیمت پایین‌تر، در دسترس بودن و خطر کمتر برای جانور و محیط دارای ارجحیت هستند (Raa et al., 1996). عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی به دلیل داشتن تنوع مولکولی و همچنین تجزیه پذیر بودن نسبت به داروهای سنتتیک، نه تنها باعث ایجاد مقاومت دارویی در میکروب‌ها نمی‌شوند (Logambal et al., 2000; Olusola et al., 2013) بلکه از طریق بهبود عملکرد بیان ژن‌های ایمنی، باعث سلامت ماهی می‌شوند. سیستم ایمنی موجودات آبی با دریافت محرک‌های ایمنی، انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به بدن میزبان را شناسایی کرده و یک پیام ثانویه ایجاد می‌کنند که به گیرنده‌های سطح غشاء ارسال می‌گردد. تحریک گیرنده‌های سطح غشای هسته باعث می‌شود که انتقال پروتئین‌های فعال‌کننده‌ی فرایند رونوشت برداری از رشته DNA در داخل هسته و به دنبال آن بیان ژن و سنتز و ترشح سیتوکین و لیزوزیم

تسهیل شود (Berbel-Filho et al., 2019). هر سلول برای آن‌که بتواند ساختار و کاربرد خود را کنترل کند نیاز به تنظیم و بیان ژن دارد (Deelen et al., 2014). سیتوکین‌ها، پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم و جزئی از تعدیل‌کننده‌های پاسخ ایمنی هستند (Zou and Secombes, 2016). از جمله سیتوکین‌های مهم گزارش شده در ماهیان، می‌توان اینترلوکین‌های (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12)، فاکتور عامل رشد تومور ($TGF-\beta$) و فاکتور نکروز تومور ($TNF-\alpha$) را نام برد (Bobe et al., 2001; Laing et al., 2003). نقش مهمی در تولید آنتی‌بادی و دفاع میزبان و همچنین تعداد زیادی از فرآیندهای زیستی مانند تنظیم سیستم ایمنی و جلوگیری از آسیب‌های بافتی دارند. بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی ماهیان را می‌توان با استفاده از گیاهان دارویی در رژیم غذایی تعدیل نمود (Mokhtar et al., 2023). پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل از فرم‌های فعال اکسیژن هستند که با اختلال در عملکرد مولکول‌ها مانند پروتئین‌ها، چربی و DNA موجودات، می‌توانند به طور مستقیم و غیرمستقیم به بافت‌ها آسیب برسانند (Kim et al., 2021). جهت تنظیم میزان تولید آنها در بدن، سیستم‌های دفاعی آنزیمی از قبیل سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) وارد عمل می‌شوند (Trenzado et al., 2006). از آنجا که این سیستم دفاعی به‌تنهایی قادر به از بین بردن رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در بدن نیست، به همین علت بدن نیاز به تأمین آنتی‌اکسیدان‌ها از منابع خارجی دارد که در این رابطه، گیاهان دارویی به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان‌های زیاد، توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های

پستاندارانی هم‌چون موش است، در بسیاری از آزمایش‌ها به‌عنوان نمونه آزمایشگاهی استفاده می‌شود (Ghazala et al., 2011; Crawford et al., 2008).

لذا با توجه به همسانی پروتئوم آن که شامل هشتاد درصد همولوژی با ژنوم انسان است و با در نظر گرفتن ترکیبات و خواص مفید گیاه بومی سلمک، در این تحقیق، اثرات عصاره هیدروالکلی این گیاه بر فاکتورهای رشد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان برخی از ژن‌های ایمنی در ماهی گورخری بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره‌سازی ماهی

تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی گورخری با میانگین وزنی $1/06 \pm 181$ میلی‌گرم خریداری و پس از انتقال به آزمایشگاه آبی‌پروری دانشگاه شهرکرد جهت سازگاری با شرایط محیطی و بررسی سلامت آنها به مدت یک هفته نگهداری شدند. پس از این مرحله، ماهیان در داخل ۱۵ عدد تانک فایبرگلاس ۲۰ لیتری با تراکم ۲۰ عدد در هر تانک به‌صورت کاملاً تصادفی توزیع شدند. تعداد تیمارها با احتساب گروه کنترل ۵ تیمار بود و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. میانگین فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طی دوره پرورش عبارت بود از: دما به میزان 26 ± 1 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۷ میلی‌گرم بر لیتر و pH به میزان ۷/۶. در طول دوره پرورش، آب به‌صورت دائم به وسیله سنگ هوا، اکسیژن‌دهی می‌شد. روزانه ۲۰ درصد حجم آب مخازن سیفون می‌شد که از این طریق غذای مصرف‌نشده و فضولات به بیرون از تانک تخلیه می‌شد.

آزاد را دارند (Agarwal and Sekhon, 2010, Young and Woodside, 2001, Kutluyer et al., 2017). به عنوان مثال، عصاره گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر بیان ژن IGF، فاکتور نکروز کننده تومور و سطح لیزوزیم در ماهی کپور معمولی تأثیر مثبت دارد و از طریق افزایش بیان نسبی سیتوکین‌های التهابی باعث بهبود وضعیت ایمنی در ماهی می‌شود (Jafari et al., 2023). همچنین عصاره گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) باعث بالاترین مقادیر بیان ژن‌های لیزوزیم، IL و TNF (Gharaei et al., 2019) و عصاره هیدروالکلی آنگوزه (*Ferula assafoetida*) باعث افزایش بیان نسبی ژن GH و IGF در در ماهی زبرا دانیو (Vahedi et al., 2018) می‌گردد.

سلمک (*Chenopodium album*) گیاهی شورپسند و به‌صورت علفی، درختچه‌ای یا بوته‌ای با شاخ و برگ آبدار و ضخیم می‌باشد. سلمک می‌تواند به‌عنوان غذا به‌طور کامل با برگ‌ها پخته‌شده و مانند اسفناج توسط انسان مصرف شود. فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد چربی، ضد سرطان و ضد التهاب، به اسیدهای فنولیک موجود در گیاه نسبت داده شده است. همچنین تنظیم متابولیسم بدن و حفاظت از کبد، اعصاب و قلب به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از پلی فنولیک‌ها در این گیاه است (Singh et al., 2023).

ماهی گورخری با نام علمی *Danio rerio* متعلق به خانواده کپورماهیان و از نوع ماهیان تخم‌گذار آب‌های شیرین مناطق گرمسیری است. این گونه به دلیل رژیم غذایی همه‌چیزخواری و سهولت تکثیر و همچنین جهت نسخه‌برداری و ویرایش ژنوم آن که بسیار شبیه

استخراج عصاره سلمک و نحوه استفاده

مقدار ۵۰۰ گرم از پودر برگ و بذر گیاه سلمک توزین و در ارلن ریخته شد و حدود ۱ لیتر اتانول ۹۶٪ به آن اضافه گردید. پس از مدت ۲۴ ساعت مخلوط به دست آمده توسط کاغذ صافی چندین بار فیلتر شد. عصاره صاف شده در دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت و سپس مخلوط حاصله توسط دستگاه روتاری تقطیر شد. این عصاره در دستگاه آون به مدت ۷۲ ساعت نگهداری گردید. مقدار ۰/۱ گرم عصاره در ۱۰۰ سی سی آب مقطر به خوبی مخلوط و از کاغذ صافی عبور داده شد. این عصاره به همراه ژلاتین ۱۵٪ به صورت روزانه به خوراک اضافه می‌شد و در اختیار ماهی قرار می‌گرفت. از ژلاتین به منظور فیکس کردن عصاره بر روی غذا استفاده می‌شد. برای ماهیان گروه کنترل آب ژلاتین ۱۵٪ بدون افزودن عصاره به آن، روی غذا اسپری شد (Mohamed et al., 2018).

غذادهی و سنجش شاخص‌های رشد

در طول آزمایش ماهیان با پنج سطح صفر (کنترل)، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ گرم عصاره در کیلوگرم

جیره، به مدت ۸ هفته تغذیه شدند. جهت تعیین میزان غذادهی، وزن بیوماس اولیه ماهیان در هر تانک محاسبه شد و سپس غذادهی به مقدار ۳ درصد وزن بدن ماهیان و در دو نوبت (۹ صبح و ۲ بعد از ظهر) به صورت دستی انجام شد. در پایان آزمایش، ابتدا ماهیان به مدت یک روز قطع غذا شدند. این عمل جهت کاهش استرس وارده به ماهی در زمان نمونه‌برداری بود. سپس از هر تانک تعداد ۳ عدد ماهی به صورت تصادفی گرفته و با استفاده از اسانس گل میخک با دوز ۱۰۰ ppm در مجاورت هوا بی‌هوش شدند. طول کل بدن ماهی (ابتدای سر تا انتهای دم) با استفاده از کولیس و وزن نهایی با استفاده از ترازو دیجیتال اندازه‌گیری و ثبت شد. در نهایت هر ماهی درون یک کرایوتیوپ گذاشته شد و پس از شماره‌گذاری آن داخل تانک ازت قرار داده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

جهت بررسی عملکرد رشد و تغذیه ماهیان، از رابطه‌های زیر استفاده گردید (Mohamed et al., 2018):

$100 \times (\text{تعداد بچه ماهیان ابتدای دوره} / \text{تعداد بچه ماهیان انتهای دوره}) = \text{SUR}$ (درصد بازماندگی

کل روزهای پرورش / $100 \times (\ln \text{وزن اولیه} - \ln \text{وزن نهایی}) = \text{SGR}$ نرخ رشد ویژه

$[\text{وزن اولیه} / (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی})] = \text{WG}$ میانگین وزن حاصله

افزایش وزن (گرم) / غذای مصرف شده (گرم) = FCR ضریب تبدیل غذایی

غذای مصرف شده (گرم) / $100 \times \text{افزایش وزن (گرم)} = \text{FER}$ کارایی غذایی

سیناژن و مطابق پروتکل مربوط به آن انجام شد. به طور خلاصه نمونه‌های هموژن شده ماهی (۵۰ میلی-گرم) در داخل ویال‌ها قرار داده شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول RNX به آنها اضافه شد. پس از

آنالیزهای مربوط به بیان ژن‌های ایمنی

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از سلول‌های ماهیان مورد مطالعه با استفاده از ماده هضم‌کننده RNX محصول شرکت

استناد به روش کار ارائه شده توسط کیت استفاده شد. طراحی آغازگرها برای ژن‌های مربوطه (TGF- β ، IL-1، IL-10، SOD and TNF- α ، CAT، GPX، LYZ، β ، actin) به ترتیب با کد ژن مرجع بتا-اکتین (β - actin) به ترتیب با کد دسترسی موجود در بانک ژن (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ انجام شد (Jafari *et al.*, 2023) (جدول ۱).

برای انجام واکنش Real time-PCR معرف‌های مورد نیاز برای تهیه محلول اصلی برای هر ژن شامل PCR Master Mix (۶ میکرولیتر)، پرایمر رفت (۰/۵ میکرولیتر)، پرایمر برگشت (۰/۵ میکرولیتر)، آب دو بار یونیزه (۴ میکرولیتر) بود که به ترتیب با هم مخلوط شدند. در نهایت ارزیابی شاخص‌های ایمنی با روش آستانه نسبی $\Delta\Delta Ct$ انجام شد. سپس تمامی بیان‌های ژن‌های هدف با آن مقایسه شده و افزایش یا کاهش آن مشخص گردید. میزان تکثیر محصول در این روش بر حسب یک منحنی با ۳ فاز رسم می‌شود.

$$\Delta C = Ct - \text{ژن هدف}$$

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گرفت. ثبت داده‌ها پس از هر مرحله نمونه‌برداری به وسیله نرم‌افزار Excel (Microsoft, 2016) انجام شد. تمام داده‌های درون‌متن به صورت $SE \pm Mean$ بیان شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (version 26) انجام گرفت. برای بررسی آماری داده‌ها ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط One Sample Kolmogorov-Smirnov Test ارزیابی گردید و در صورت نرمال بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها

ورتکس نمودن ویال‌ها (۲ دقیقه)، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. سپس، ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد و با دور ۱۲۰۰۰ دور در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس، فاز بالایی به ویال‌های جدید انتقال داده شد و به مقدار حجم برابر ایزوپروپانول اضافه شد و به آرامی تکان داده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ انجام گرفت. فاز بالایی خالی شد و برای شست‌وشو ویال‌ها با ۱ میلی-لیتر اتانول ۷۵ درصد پر شدند. سپس، در ۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. فاز بالایی دور ریخته شد و ویال‌ها در زیر هود قرار گرفتند و بعد به میزان ۴۰ میکرولیتر آب عاری از RNase به آن اضافه شد (Jensen *et al.*, 2018).

سنجش خلوص RNA استخراج شده با محاسبه نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۶۰ صورت گرفت. جذب نوری نمونه‌های RNA خوانده شده به کمک دستگاه نانودراپ در طول موج‌های گفته شده بین ۱/۷ تا ۲ بود که نشان‌دهنده درجه خلوص بالای نمونه‌های RNA بود. برای حذف آلودگی DNA از یک میکرولیتر DNase طبق پروتکل شرکت سازنده کیت استفاده شد. همچنین غلظت RNA استخراج شده از هر نمونه نیز توسط همین دستگاه بر حسب ng/ μ l سنجیده شد (Hoseinifar *et al.*, 2023). برای سنتز cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده (۱ میکروگرم)، برای ارزیابی ژن‌های مربوطه از کیت ساخت cDNA شرکت یکتا تجهیز ساخت ایران و با

از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) دامنه Tukey بررسی شد. میزان سطح معنی‌دار بودن در استفاده شد. اختلاف بین میانگین‌ها به وسیله آزمون چند این بررسی $p < 0.05$ بود.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای مطالعه بیان ژن‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری.

Table 1: Sequence of primers used to study the expression of immune and antioxidant genes in zebrafish (*Danio rerio*).

Gene name	Access Number	Sequences of primers (q-PCRf & q-PCRr)	Junction temperature (C°)	Application
IL-1 β	AY340959.1	CGTCTCCACATCTCGTACTCA GTGCTTTTCCTGTCCATCTCC	58	immune gene
IL-10	NM0010200785.2	TGGAGACCATCTGCCAACA GCATTTACCATATCCCGCT	58	immune gene
TNF- α	AY427649.1	CTGCTTCACGCTCCATAAGA CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	58	immune gene
TGF- β	NM_182873.1	TCTGGGAACTCGCTTTGTCTCCAA GCTGGTTTGCTTTACAGTCGCAGT	58	immune gene
LYZ	NM-139180.1	GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC CGTAGTCCTTCCCCGTATCA	58	immune gene
CAT	AJ007505.1	GCATGTTGGAAAGACGACAC GTGGATGAAAGACGGAGACA	58	antioxidant gene
GPX	NC_011476	GTGTGCCCTACGCAGGA CACACAGTTCTGCTGACACC	58	antioxidant gene
SOD	BC055516	CACACAGTTCTGCTGACACC GTCCGCACTTCAACCCTCA	58	antioxidant gene
β - actin	NM_131031.1	AGCAGATGTGGATCAGCAAG TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	58	Reference gene

نتایج

اختلاف معنی داری در شاخص‌های WG، SGR، SUR، FCR و FER بین تیمارهای مورد آزمایش مشاهده نشد ($p > 0.05$).

نتایج حاصل از تأثیر عصاره گیاه سلمک بر شاخص‌های رشد و تغذیه در ماهی گورخری به صورت میانگین داده‌ها \pm خطای استاندارد در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج حاصله در پایان دوره آزمایشی،

جدول ۲: عملکرد رشد و کارایی تغذیه پس از ۸ هفته آزمایش در ماهی گورخری تغذیه شده با دوزهای مختلف عصاره گیاه سلمک

Table 2: Growth performance and Feed efficiency after 8 weeks' trial in zebrafish fed with different doses of dietary *Chenopodium album*.

Body performance and Feed efficiency	Experimental treatments				
	C-0%	T1-0/25%	T2-0/5%	T3-1%	T4-1/5%
Initial weight (mg)	179.13 \pm 0.87 ^a	182.58 \pm 1.17 ^a	181.62 \pm 1.05 ^a	181.03 \pm 1.27 ^a	180.22 \pm 0.98 ^a
Final weight (mg)	290.46 \pm 1.87 ^a	294.52 \pm 1.97 ^a	299.19 \pm 2.90 ^a	293.24 \pm 1.77 ^a	287.13 \pm 0.52 ^a
WG (mg)	109.32 \pm 1.15 ^a	111.93 \pm 2.23 ^a	117.57 \pm 3.94 ^a	113.30 \pm 1.07 ^a	106.91 \pm 0.27 ^a
SGR	1.32 \pm 0.03 ^a	1.32 \pm 0.04 ^a	1.34 \pm 0.05 ^a	1.33 \pm 0.04 ^a	1.31 \pm 0.06 ^a
FCR	1.91 \pm 0.37 ^a	1.92 \pm 0.25 ^a	1.95 \pm 0.19 ^a	1.94 \pm 0.28 ^a	1.93 \pm 0.11 ^a
FER (%)	51.90 \pm 0.34 ^a	52.11 \pm 0.12 ^a	51.31 \pm 0.11 ^a	51.59 \pm 0.14 ^a	51.86 \pm 0.19 ^a
Survival rate (%)	92 \pm 1 ^a	90 \pm 3 ^a	92 \pm 3 ^a	91 \pm 2 ^a	90 \pm 4 ^a

Data are expressed as the Mean \pm SE

Different small letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

TGF در تیمارهای ۳، ۲ و ۴ تغذیه شده با عصاره گیاه سلمک به طور معناداری نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۱ بیشتر بود ($p < 0.05$). از نظر میزان بیان ژن IL1 در بین هیچ کدام از تیمارها تفاوت معناداری وجود نداشت ($p > 0.05$). همچنین از نظر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی CAT و SOD در تیمارهای تغذیه شده با عصاره گیاه سلمک مقدار بیان ژن بیشتری نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$). میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی GPX در بین تیمارها اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند.

تأثیر عصاره گیاه سلمک بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج به دست آمده از اثرگذاری عصاره گیاه سلمک بر بیان ژن‌های مربوط به ایمنی در ماهی گورخری به صورت میانگین \pm خطای استاندارد در جدول ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده در انتهای دوره آزمایشی، تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در بین تیمارهای آزمایشی دیده شد ($p < 0.05$). به طوری که میزان بیان ژن‌های لیزوزیم، TNF، IL10 و

جدول ۳: بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کل بدن ماهی گورخری پس از ۸ هفته تغذیه با دوزهای مختلف عصاره گیاه سلمک ($p < 0.05$).

Table 3: Expression of immune-related genes and Antioxidant enzyme activities in the whole body extract after 8 weeks' trial in zebrafish fed with different doses of dietary *Chenopodium album*.

Factor	Experimental treatments				
	C-0%	T1-0/25%	T2-0/5%	T3-1%	T4-1/5%
IL1	1.00 ± 0.14 ^a	1.05 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.09 ^a	1.24 ± 0.17 ^a	1.21 ± 0.31 ^a
IL10	0.96 ± 0.05 ^b	1.06 ± 0.15 ^b	1.35 ± 0.21 ^a	1.44 ± 0.11 ^a	1.49 ± 0.26 ^a
TNF	1.11 ± 0.05 ^b	1.06 ± 0.08 ^b	1.48 ± 0.12 ^a	1.35 ± 0.18 ^a	1.49 ± 0.21 ^a
TGF	1.26 ± 0.24 ^b	1.14 ± 0.33 ^b	1.74 ± 0.11 ^a	1.95 ± 0.27 ^a	2.21 ± 0.38 ^a
LYZ (U mL ⁻¹)	6.45 ± 0.59 ^b	7.24 ± 0.76 ^b	8.21 ± 0.11 ^a	8.74 ± 0.33 ^a	8.66 ± 0.19 ^a
GPX (U mL ⁻¹)	1.15 ± 0.31 ^a	1.28 ± 0.19 ^a	1.18 ± 0.15 ^a	1.24 ± 0.39 ^a	1.47 ± 0.39 ^a
CAT (U mL ⁻¹)	1.24 ± 0.09 ^b	1.68 ± 0.13 ^a	1.57 ± 0.22 ^a	1.68 ± 0.31 ^a	1.85 ± 0.42 ^a
SOD (U mL ⁻¹)	1.06 ± 0.05 ^b	1.29 ± 0.14 ^a	1.55 ± 0.31 ^a	1.73 ± 0.29 ^a	1.81 ± 0.55 ^a

Data are expressed as the Mean ± SE

Different small letters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

بحث

داد در حالی که سطوح بالاتر (۱/۵-۱ درصد)، احتمالاً به دلیل وجود عوامل ضد تغذیه‌ای باعث کاهش رشد آنها شد (Kuebutornye *et al.*, 2024) که با نتایج این مطالعه همخوانی نداشت.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به کارگیری عصاره سلمک میزان فعالیت لیزوزیم را به‌ویژه در ماهیان تیمار شماره ۴ افزایش می‌دهد. نتایج مشابهی در فعالیت آنزیم لیزوزیم با استفاده از انواع جیره‌های حاوی گیاه دارویش روی ماهی تیلایپای نیل (Park and Choi, 2012)، قارچ چاگا (*Inonotus obliquus*) روی ماهی هامور دندان نیش (*Epinephelus bruneus*) (Harikrishnan *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013)، پودر زنجبیل روی ماهی سفید (*Rutilus kutum*) (Zoheiri *et al.*, 2016)، پودر پیاز روی ماهی فلاندر (Cho and Lee, 2012) و پودر سیاه‌دانه (Yousefi *et*

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، تغییر خاصی در ضریب فاکتورهای رشد در تیمارهای تغذیه شده با عصاره گیاه سلمک مشاهده نشد که احتمالاً سطوح استفاده شده از این عصاره جهت تاثیر بر فاکتورهای رشد کافی نبوده است. از سوی دیگر، رشد بسیار پایین ماهی گورخری از نظر فیزیولوژی باعث شده که تغییر شاخص‌های رشد چشم‌گیر نباشد. همچنین گونه‌های مختلف ماهیان بر حسب توانایی خود در متابولیسم و جذب مواد شیمیایی گیاهی، ممکن است واکنش‌های متفاوتی از نظر رشد نشان دهند. بسته به مقدار و نوع گونه گیاهی، افزودنی‌های گیاهی در رژیم غذایی می‌تواند رشد را تغییر دهد. در یک مطالعه افزودن روغن نرولی تولید شده از شکوفه نارنج در غذای کپورماهیان تا سطح نیم درصد رشد را افزایش

سلول‌های بدن شده و ژن‌های سیتوکین مانند TNF و IL-10 شروع به تولید و افزایش می‌کند. با این حال، برخی از گونه‌های ماهی سطوح بالاتری از ژن‌های سیتوکین را بیان می‌کنند (Singh et al., 2023; Sattanathan et al., 2022). مشابه این نتایج روی ماهی گورخری عصاره هیدروالکلی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) به میزان ۲٪ در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی (TNF-alpha و IL1B) اثر مثبت نشان داد و علت آن کاهش رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم ایمنی ماهی به واسطه وجود متابولیت‌های ثانویه، مواد مؤثره در گیاه ذکر شد (Safari et al., 2018). در یک مطالعه دیگر افزودن پودر پوست لیمو (دوزهای ۱/۵ و ۳/۵ درصد) به جیره غذایی ماهی شانک موجب افزایش بیان ژن‌های ایمنی IL1 β شد (Beltrán et al., 2017). نتایج مشابهی نیز توسط سایر محققین در رابطه با افزایش TNF- α و IL-1 با استفاده از ترکیبات گیاهی مختلف از جمله گیاه گون روی ماهی کپور معمولی (Yuan et al., 2007)، چای سبز روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Nootash et al., 2013)، عصاره گیاه بومادران در ماهی کاراس‌طلایی (Nezhadmoghadam et al., 2018) گزارش شده است. در مطالعه روی ماهی کپور معمولی نیز افزایش معنی‌دار ژن‌های رشد (IGF-I، GH) و ایمنی (Lyz، IL-1) به طور قابل توجهی تحت تأثیر مکمل‌های غذایی اسید سیتریک و آب لیموترش (*Citrus limon*) قرار گرفتند (Roohi et al., 2024). همچنین عصاره آنغوزه (Safari et al., 2016) و گیاه آقطی (Taghiyan et al., 2023) به جیره غذایی تأثیر مثبتی بر بیان ژن‌های مرتبط با رشد و ایمنی ماهیان داشت. علاوه بر این، برخی از گیاهان مانند سیر، زردچوبه و جلبک

(al., 2021)، گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*) (Safari et al., 2016) روی ماهی کپور معمولی و عصاره انگور روی ماهی زبرا (Hoseinifar et al., 2023) گزارش شده است. در این مطالعه افزایش مقدار لیزوزیم احتمالاً به دلیل تأثیر ترکیبات عصاره هیدروالکلی سلمک بوده که تعداد فاگوسیت‌های ترشح‌کننده لیزوزیم را تغییر داده و به این ترتیب مقدار لیزوزیم سنتز شده در سلول افزایش پیدا کرده است. ترکیبات گیاهی می‌توانند سلول‌های کبدی و خونی را تحریک به آزادسازی بیشتر لیزوزیم نمایند (Taghiyan et al., 2023).

طبق نتایج این مطالعه، در تیمارهای تغذیه شده با عصاره گیاه سلمک نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های TNF، IL10 و TGF مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت عصاره گیاهی سلمک در بهبود سیستم ایمنی غیراختصاصی سلولی ماهی است. زیرا گیاه سلمک حاوی ترکیبات آمینواسید سینامیک، فلاونوئیدها و کارتونوئیدها می‌باشد. فلاونوئیدها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد و مهار ان-اف کاپا بی (NF- κ B)، یک کمپلکس پروتئینی کنترل‌کننده رونویسی دی ان ای) تأثیر قابل توجهی دارند. علاوه بر این، این گیاه دارای انرژی، کربوهیدرات‌ها، فیبر، چربی، پروتئین، ویتامین‌های تیامین، ریوفلاوین، نیاسین، ویتامین B₅، ویتامین B₆، ویتامین B₉، ویتامین C، کلسیم، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، پتاسیم، سدیم و روی بوده که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی، ضدسرطان، ضدجوش، ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد تحلیل عصبی هستند (Hoseinifar et al., 2023). در نتیجه وجود انواع ترکیبات فعال زیستی در این گیاه، باعث تحریک

های SOD, CAT, GPx و شد. همچنین، مهار H_2O_2 توسط ازگیل وابسته به غلظت بوده و منجر به کاهش استرس اکسیداتیو شد (Patra et al., 2023) که منطبق با نتایج این مطالعه بود. اثرات تقویت کننده انواع عصاره های گیاهی بر سیستم آنتی اکسیدانی ماهیان در بسیاری از ترکیبات گیاهی مانند عصاره زردچوبه روی ماهی زبرا (Kim et al., 2021)، عصاره دانه رازیانه روی کپور معمولی (Ahmadniaye Motlagh et al., 2023) گزارش شده است. همچنین با افزودن ۱ درصد پودر پیاز جیره غذایی فیل ماهی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز افزایش معنی داری را نشان داد (Akrami et al., 2015). در یک مطالعه روی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان تغذیه شده با ۵۰۰ میلی گرم اسانس آویشن معمولی، نعنای وحشی و مریم گلی حداقل تغییرات فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتیون ردوکتاز و گلوکاتیون ترانسفراز در بافت کبد ماهی گزارش شد (Sönmez et al., 2015).

نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده از این بررسی، می توان گفت که عصاره گیاهی سلمک تا سطح ۱ درصد به عنوان یک محرک ایمنی، قابلیت استفاده در جیره غذایی ماهی گورخری را دارد. به طور کلی این گیاه با افزایش بیان ژن های مرتبط با ایمنی ماهی، مقاومت ماهیان را در مقابل استرس ها و تنش های محیطی افزایش داده و موجب کاهش تلفات می شود. به هر حال، مطالعات بیشتری در رابطه با غلظت های مطلوب این گیاه روی گونه های مختلف ماهیان و همچنین مطالعات بیوشیمیایی و بافت شناسی ماهیان پس از تغذیه با این مکمل گیاهی مورد نیاز است.

دریابی (*Asparagopsis taxiformis*) در رژیم غذایی خفاش ماهی گرد (*Platax orbicularis*) باعث افزایش بیان ژن های TGF- β 1 مرتبط با سیستم ایمنی شد (Reverter et al., 2016) که مشابه با نتایج این مطالعه بود.

در مطالعه حاضر بیان ژن آنزیم های گلوکاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در تیمارهای حاوی سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه سلمک افزایش قابل ملاحظه ای را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد که احتمالاً به دلیل وجود مواد زیست فعالی مانند پلی فنل ها و فنالوئیدها و ترکیب آنتی اکسیدانی بالا در عصاره گیاه سلمک است که از سلول ها در برابر رادیکال های آزاد اکسیژن محافظت می کند (Usman et al., 2010). سلمک به دلیل داشتن اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها خواص آنتی اکسیدانی قوی داشته که می تواند اکسیداسیون لیپید، استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد را کاهش دهد. به طور کلی مکانیسم آنتی اکسیداسیون شامل از بین بردن رادیکال های آزاد و یا مهار تولید گونه های فعال اکسیژن است که با این کار از آسیب های سلولی و مولکولی جلوگیری می شود (Singh et al., 2023, Osawa and Kato, 2005). مشابه با نتایج این مطالعه سایر محققان نشان دادند که استفاده از ۱ درصد رزماری و زنجبیل بر کیلوگرم غذا منجر به کاهش مالون دی آلدئید و افزایش آنتی اکسیدان کل و گلوکاتیون پراکسیداز در ماهی تیلاپپای نیل می شود (Antache et al., 2013). در مطالعات دیگر نیز افزودن ۱ درصد عصاره متانولی برگ ازگیل به جیره غذایی قزل آلاهی رنگین کمان به علت اثرات آنتی-اکسیدانی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گیاه به عنوان یک عصاره گیاه دارویی باعث افزایش فعالیت آنزیم-

- the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 275(1-4), pp.26-33. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.022
7. 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 & shellfish immunology*, 64, pp.426-436. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.03.042
 8. Berbel-Filho, W.M., Rodríguez-Barreto, D., Berry, N., Garcia De Leaniz, C., Consuegra, S., 2019. Contrasting DNA methylation responses of inbred fish lines to different rearing environments. *Epigenetics*, 14(10), pp.939-948. DOI: 10.1080/15592294.2019.1625674
 9. Bobe, J., Goetz, F.W., 2001. Molecular cloning and expression of a TNF receptor and two TNF ligands in the fish ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), pp.475-481. DOI: 10.1016/s1096-4959(01)00353-0
 10. Chang, C.S., Huang, S.L., Chen, S., Chen, S.N., 2013. Innate immune responses and efficacy of using mushroom beta-glucan mixture (MBG) on orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 35(1), pp.115-125. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.04.004
 11. Cho, H.C., Lee, S.M., 2012. Onion powder in the diet of the Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): Effects on the growth, body composition and lysozyme activity. *World Aquaculture Society*, 43 (1), pp.30- 38. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2011.00489.x
 12. Crawford, A.D., Esguerra, C.V. and de Witte, P.A., 2008. Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. *Planta Medica*, 74(06), pp.624-632. DOI: 10.1055/s-2008-1034374
 13. Deelen, J., Beekman, M., Codd, V., Trompet, S., Broer, L., Hägg, S., Fischer, K., Thijssen, P.E., Suchiman, H.E.D., Postmus, I., 2014. Leukocyte telomere

سپاسگزاری

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

منابع

1. Agarwal, A., Sekhon, L.H., 2010. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human fertility*, 13(4), pp.17-225. DOI: 10.1038/aja.2010.183
2. Ahmadniaye Motlagh, H., Horie, Y., Rashid, H., Banaee, M., Multisanti, C.R. and Faggio, C., 2023. Unveiling the effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed essential oil as a diet supplement on the biochemical parameters and reproductive function in female common carps (*Cyprinus carpio*). *Water*, 15(16), pp.2978. DOI: 10.3390/w15162978
3. Akrami, R., Rahnema, B., Chitsaz, H., Razeghi Mansour, A., 2015. Effects of dietary inulin on growth performance, survival, body composition, stress resistance and some hematological parameters of Gibel carp juveniles (*Carassius auratus gibelio*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(4), pp.1072- 1082. DOI: 10.22092/IJFS.2018.114505
4. Altmann, S. M., Mellon, M. T., Distel, D. L., Kim, C.H., 2003. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Virology*, 77(3), pp.1992-2002. DOI: 10.1128/jvi.77.3.1992-2002.2003
5. Antache, A., Crister, V., Iulia, R., Grecu, I.R., Ion, S.P., Mocanu, M.C., 2013. The Influence of Rosemary Sea Buckthorn and Ginger on Oxidative Stress at *Oreochromis niloticus* Reared in a Recirculating Aquaculture System. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 70, pp.110-116.
6. Ardó, L., Yin, G., Xu, P., Váradi, L., Szigeti, G., Jeney, Z. and Jeney, G., 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance

20. Jafari, V., Paknejada, H., Hosseinia, M., 2023. The effect of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on IGF, TNF and lysozyme genes expression in *Cyprinus carpio* fingerlings. *Journal of Aquatic Ecology*, 13(2), pp.97-107. (In Persian). DOI: Jensen, H.M., Korbut, R., Kania, P.W., Buchmann, K., 2018. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *PloS one*, 13(7), pp.e0200016. DOI: 10.1371/journal.pone.0200016
21. Kim, S., Kim, M., Kang, M.C., Lee, H.H.L., Cho, C.H., Choi, I., Park, Y., Lee, S.H., 2021. Antioxidant effects of turmeric leaf extract against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in vitro in vero cells and in vivo in zebrafish. *Antioxidants*, 10(1), pp.112. DOI: 10.3390/antiox10010112
22. Kuebutornye, F.K.A., Roy, K., Folorunso, E.A., Mraz, J., 2024. Plant-based feed additives in *Cyprinus carpio* aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 16(1), pp.309-336. DOI: 10.1111/raq.12840
23. Kutluyer, F., Sirkecioğlu, A.N., Aksakal, E., Aksakal, F.İ., Tunç, A., Günaydin, E., 2017. Effect of Dietary Fish Oil Replacement with Plant Oils on Growth Performance and Gene Expression in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annals of Animal Science*, 17(4), pp.1135-1153. DOI: 10.1515/aoas-2017-0010
24. Laing, K.J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T. and Secombes, C.J., 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor- α . *European Journal of Biochemistry*, 268(5), pp.1315-1322. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.01996.x
25. Logambal, S.M., Venkatalakshmi, S., Michael, R.D., 2000. Immunostimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* Linn. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*, 430, pp.113-120. DOI: 10.1023/A:1004029332114
26. Mohamed, G.A., Amhamed, I.D., Almabrok, A.A., Barka, A.B.A., Bilen, S., length associates with prospective mortality independent of immune-related parameters and known genetic markers. *International journal of epidemiology*, 43, pp.878-886. DOI: 1093/ije/dyt267
14. Yousefi, M., Adineh, H., Reverter, M., Khademi Hamidi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Hoseinifar, S.H., Doan, H.V., 2021. Protective effects of black seed (*Nigella sativa*) diet supplementation in common carp (*Cyprinus carpio*) against immune depression, oxidative stress and metabolism dysfunction induced by glyphosate. *Fish & Shellfish Immunology*, 109, pp. 12-19. 10.1016/j.fsi.2020.11.032
15. Gharaei, A., Ebrahimi, Jorjani, H., Miradr Harijani, J., Miyandare Kolangi, H., 2019. Effect of dietary Tribulus Terrestris extract on expression of lysozyme, IL1 and TNF genes in *Danio rerio*. *Journal of Ornamental Aquatics*, 6(1), pp.41-49. (In Persian).
16. Ghazala, R., Tabinda A. B., Yasar. A., 2011. Growth response of Juvenile grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*) fed isocaloric diets with variable protein levels. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 21(4), pp.850-856.
17. Ghiasi, M., Aqajani, S.A., Binaye, M., Poorgholami, R., Babalyan Amiri, A., 2015. Effect of Aqueous Extract of Hypericum (*Hypericum perforatum*) index of blood, serum and survival of rainbow trout (heat stress). *Journal of Fishery Science and Technology*, 5(2), pp.101-91. DOI: 10.5812/cardiovascmed.31326
18. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S., 2012. Effect of Inonotus obliquus enriched diet on hematology, immune response and disease protection in kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 344-349. pp.48-53. DOI:
19. Hoseinifar, S.H., Fazelan, Z., El-Haroun, E., Yousefi, M., Yazici, M., Van Doan, H., Paolucci, M., 2023. The effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on growth performance, antioxidant status, and immunity of zebrafish (*Danio rerio*). *Fishes*, 8(6), pp.326. DOI: 10.3390/fishes8060326

- tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunology*, 32, pp.1016–1021. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.02.023
34. Patra, I., Prima Dewi, A., Fawzi, M., Hussam, F., Obayes, I.K. Jamal, M.A., Hammoodi, H.A., Abbass, Z.R., Dadras, M. and Narimanizad, F., 2023. Effects of Dietary Medlar (*Mespilus germanica* L.) Extract on Growth Performance, Innate Immune Characteristics, Antioxidant Status, and Responses to Crowding Stress in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 7613330, pp.1-13. DOI: 10.1155/2023/7613330
35. Raa, J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3), pp.229-288. DOI: 10.1080/10641269609388587
36. Reverter, M., Saulnier, D., David, R., Bardon-Albaret, A., Belliard, C., Tapissier-Bontemps, N., Lecchini, D., Sasal, P., 2016. Effects of local Polynesian plants and algae on growth and expression of two immune-related genes in orbicular batfish (*Platax orbicularis*). *Fish & shellfish immunology*, 58, pp.82-88. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.09.011
37. Roohi, Z., Imanpour, M., Safari, R., 2024. Evaluating effect of dietary administration of citric acid and lemon juice (*Citrus limon*) on growth performance, serum and mucus immune responses, related-genes expression of growth (GH, IGF-I) and immune (Lyz, IL-1) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*, 18(3), pp.78-95. (In Persian). DOI: 10.71901/jad-2024-1-748
38. Safari, R., Hoseinifar, S.H., Nejadmoghadam, S., Jafar, A., 2016. Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary Ferula (*Ferula assafoetida*). *Fish & shellfish immunology*, 55, pp.242-248. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.05.038
39. Safari, R., Vahedi Amiri, F., Shabany, A., Hoseinifar, S.H., Kolangi Miandareh, H., 2018. Effect of Supplementation of Diet with *Ferula assafoetida* Hydroalkohalic Elbeshti, R.T., 2018. Effect of celery (*Apium graveolens*) extract on the growth, haematology, immune response and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Science and Technology Bulletin*, 7(2), pp.51-59. DOI: 10.33714/masteb.457721
27. Mokhtar, D.M., Zaccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M.T., Sayed, R.K., 2023. Main components of fish immunity: An overview of the fish immune system. *Fishes*, 8(2), pp.93. DOI: 10.3390/fishes8020093
28. Ndeda, V., 2022. Exploring Genus Amaranthus as a promising fishmeal alternative in aquaculture: A mini review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 10(6), pp.146-151. DOI: 10.22271/fish.2022.v10.i6b.2839
29. Nezhadmoghadam, S., Imanpoor, M.R., Jafari, V., Safari, R., 2018. Effect of Achillea millefolium on mucosal immune response and immune related (TNF-alfa) gene expression in Goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Aquaculture Development*, 5(4), pp.87-100. (In Persian). DOI: 10.22069/japu.2021.19358.1598
30. Nootash S., Sheikhzadeh N., Baradaran B., Oushani A.K., Moghadam M.R.M., 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), pp.1916-1923. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.09.030
31. Olusola, S.E, Emikpe, B.O, Olaifa, F.E., 2013. The potentials of medicinal plants extracts as bioantimicrobial in aquaculture. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 3, pp.404-412.
32. Osawa, T. and Kato, Y., 2005. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043(1), pp.440-451. DOI: 10.1196/annals.1333.050
33. Park, K.H., Choi, S.H., 2012. The effect of mistletoe, *Viscum album coloratum*, extract on innate immune response of Nile

- N.O., Olawore, N.O., Edewor, T.I., Saliu, B.K., 2010. Chemical constituents and anti-inflammatory activity of leaf essential oil of Nigerian grown *Chenopodium album* L. *Experimental and Clinical Transplantation*, 9, pp.181. DOI: 10.17877/DE290R-8905
46. Vahedi, F., Safari, R., Shabani, A., Hoseinifar, H., Kolangi Miandareh, H., 2018. Effects of dietary administration of hydroalkohalic extract of ferula (*Ferula assafoetida*) on growth, antioxidant related genes expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Aquaculture Development*, 12(1), pp.89-98. (In Persian). DOI:
47. Young, I.S., Woodside, J., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, pp.176-186. DOI: 10.1136/jcp.54.3.176
48. Yuan, C., Li, D., Chen, W., Sun, F., Wu, G., Gong, Y., Tang, J., Shen, M., Han, X., 2007. Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 33, pp.93-101. DOI: 10.1007/s10695-006-9120-7
49. Zoheiri F., Imanpour M.R., Hajimoradlo A., Hoseinifar S.A., 2016. Effect of *Zingibar officinale* on growth, immunity mucosal and hematological factors in *Rutilus kutum*. *Journal of Applied Ichthyological research*, 5(1), pp.12-19. (In Persian).
50. Zou, J. and Secombes, C.J., 2016. The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), pp.23.86. DOI: 10.3390/biology5020023
- Extract on Immune Related (IL-1 β and TNF-alpha) Gene. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*, 11(3), pp.55-66. (In Persian).
40. Sattanathan, G., Liu, W.C., Padmapriya, S., Pushparaj, K., Sureshkumar, S., Lee, J.W., Balasubramanian, B., Kim, I.H., 2022. Effects of Dietary Blend of Algae Extract Supplementation on Growth, Biochemical, Haemato-Immunological Response, and Immune Gene Expression in *Labeo rohita* with *Aeromonas hydrophila* Post-Challenges. *Fishes*, 8(1), pp.1-22. DOI: 10.3390/fishes8010007
41. Singh, S., Singh, A., Hallan, S.S., Brangule, A., Kumar, B., Bhatia, R., 2023. A Compiled Update on Nutrition, Phytochemicals, Processing Effects, Analytical Testing and Health Effects of *Chenopodium album*: A Non-Conventional Edible Plant (NCEP). *Molecules*, 28(13), pp.4902. DOI: 10.3390/molecules28134902
42. Sönmez, A.Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., Biswas, G., 2015. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, pp.165-175. DOI: 10.1007/s10695-014-0014-9
43. Taghiyan, H., Sudagar, M., Yousefi, S., Paknejad, H., Hajibeglou, A., 2023. Effect of dietary of Magnolia (*Sambucus ebulus* L) fruit extract on growth performance, serum antioxidant activities and evaluation of immunity-related genes (TNF- α and LYZ) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Aquaculture Development*, 17(1), pp.1-14. (In Persian). DOI: 10.61186/aquadev.17.1.1
44. Trenzado, C., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Morales, A., E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254, pp.758-767. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.020
45. Usman, L.A., Hamid, A.A., Muhammad,