



## تأثیر عصاره گیاهی شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی غیر اختصاصی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

ولی اله جعفری\*، حامد پاک نژاد، مرجان حسینی

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

### چکیده

طی دهه‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی به منظور افزایش رشد و ارتقای سیستم ایمنی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. این مطالعه به منظور نشان دادن اثر مکمل گیاهی عصاره شیرین بیان *Glycyrrhiza glabra* L. بر بیان ژن‌های فاکتور شبه انسولینی (IGF)، فاکتور نکروز کننده تومور (TNF) و لیزوزیم (Lyz) در بچه‌ماهیان کپور معمولی *Cyprinus carpio* انجام شد. ماهیان با میانگین وزنی  $9/0 \pm 0/05$  گرم به چهار گروه (هر گروه شامل سه تکرار) تقسیم شدند و با جیره‌های حاوی عصاره شیرین بیان در سطوح متفاوت صفر (شاهد)،  $0/5$ ،  $1$  و  $2$  درصد به مدت  $56$  روز تغذیه شدند. پس از پایان دوره پرورش نتایج نشان داد که با افزایش سطح مصرف عصاره شیرین بیان میزان افزایش وزن و نرخ رشد ویژه افزایش یافت و بالاترین مقادیر در ماهیان تغذیه شده با  $2$  درصد بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر تیمارها داشت ( $P < 0/05$ ). کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار  $2$  درصد بود. بیان ژن IGF نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای در تیمار  $2$  درصد بالاتر بود ( $P < 0/05$ ). سطح بیان ژن لیزوزیم نیز در تیمار  $2$  درصد بالاتر از سایر گروه‌ها بود و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و سایر تیمارها داشت ( $P < 0/05$ ). همچنین سطح  $0/5$  درصد عصاره باعث افزایش سطح بیان ژن TNF گردید که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ( $P < 0/05$ ). با توجه به نتایج این تحقیق عصاره شیرین بیان می‌تواند باعث افزایش رشد به واسطه افزایش بیان ژن IGF و همچنین بهبود سیستم ایمنی غیر اختصاصی کپور معمولی از طریق افزایش بیان ژن‌های لیزوزیم و فاکتور نکروز کننده تومور شود.

### نوع مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۷

تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰

\*نویسنده مسئول:

V.jafari.sh110@gmail.com

کلید واژه‌ها: بیان ژن، لیزوزیم، عصاره شیرین بیان، IGF، TNF

### مقدمه

در دهه‌های اخیر توسعه آبی‌پروری و کشت مترکم جهت افزایش تولید سبب بروز عوامل بیماری‌زا شده است از این‌رو مطالعات در خصوص سیستم ایمنی بدن ماهی و ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌ها افزایش پیدا کرده است (Magnadottir, 2010). با توجه به این‌که هدف اصلی آبی‌پروری درآمدزایی می‌باشد و  $50$  درصد هزینه‌های متغیر در آبی‌پروری مربوط به خوراک می‌باشد، استفاده از راهبردهای مناسب در تغذیه می‌تواند اثر قابل توجهی بر بهینه‌سازی سود داشته باشد. همچنین اگر بازماندگی ماهیان تا زمان رسیدن به وزن بازارپسندی افزایش یابد هزینه‌های بعدی پرورش کاهش می‌یابد (Cerezuela et al., 2011).

استفاده از محرک‌های ایمنی می‌تواند یک روش امیدوار کننده در فرایند پیشگیری از بیماری محسوب شود که به حفظ شرایط بهینه ماهی کمک می‌کند استفاده از این روش در صورتی که افزایش تولید و سود را به دنبال داشته باشد می‌تواند یک شیوه کاربردی در امر آبی‌پروری باشد (Bahi et al., 2017)

هزینه‌های تغذیه و شیوع بیماری دو عامل مهم محدود کننده در آبی‌پروری می‌باشند. بنابراین بهبود کیفیت تغذیه به‌همراه افزایش ایمنی ماهی تاثیر به‌سزایی بر رشد و سودآوری در تمام مراحل آبی‌پروری خواهد داشت (Abu-Elala et al., 2013). در سال‌های اخیر استفاده از مکمل‌های غذایی طبیعی جهت پیشگیری و کنترل بیماری مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. در بسیاری از کشورها استفاده از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن طیف وسیعی از خواص مفید از جمله تحریک و تقویت سیستم ایمنی به منظور افزایش پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی افزایش یافته است (Guardiola et al., 2016). استفاده از گیاهان دارویی در جیره غذایی ماهی، موجب بهبود عملکرد سیستم ایمنی مانند افزایش فعالیت لیزوزیم، پاسخ آنتی‌بادی و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی در ماهی می‌شود (Harikrishnan et al., 2011). مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با اثرات مثبت استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی در جیره آبریان صورت گرفته است که می‌توان به بررسی اثر عصاره سرخار گل (*Echinacea purpurea*) بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Pourgholam et al., 2013)، عصاره خرما و گیاه غازیاقی (*Falcaria vulgaris*) بر روی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Chobkar, 2015)، (Hoseinifar et al., 2016)، گیاه گون (*Astragalus membranaceus*) و شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) بر ماهی سوف زرد (*Percafla vescens*) (Elabd et al., 2016) و گیاه سیر بر ماهی (*Lates calcarifer*) (Taplur, 2012) اشاره کرد.

گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra*، گیاهی چند ساله از خانواده بقولات (Fabaceae) می‌باشد (Amani et al., 2005). ریشه و ریزوم‌های شیرین بیان مصارف دارویی گسترده دارند. مواد فعال آن شامل ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و ایزوفلاونوئیدها، کومارین‌ها، استیل بنوئیدها و سایر ترکیبات مانند اسیدهای چرب، فنول‌ها، اسپاراژین، گلوکز، ساکارز و استرون می‌باشند. اصلی‌ترین مواد مؤثر آن، glycyrrhizic acid (جزء ساپونین‌ها)، glabridin (جزء ایزوفلاونوئیدها) و Isoliquiritigenin (جزء فلاونوئیدها) می‌باشند. فعالیت ضدالتهابی، ضد باکتری، ضد میکروب، ضد ویروس، ضد قارچ، ضد سرطان، ضد تومور، آنتی اکسیدان، محافظت کبدی، تقویت سیستم ایمنی، اثرات محافظت از قلب و هم‌چنین درمان زخم معده برای این گیاه به اثبات رسیده است (Asl and Hosseinzadeh., 2008). با توجه به ترکیبات و اثرات متعددی که از گیاه شیرین بیان گزارش شده است، هدف از این تحقیق بررسی اثرات این گیاه دارویی بر رشد و بیان برخی ژن‌های درگیر در ایمنی غیر اختصاصی ماهی کپور معمولی می‌باشد.

## مواد و روش

### تهیه ماهی و محل انجام آزمایش

تعداد ۳۰۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی از مرکز تکثیر و پرورش سیجوال تهیه و با تراکم ۱۰۰ عدد بچه‌ماهی در کیسه‌های پلاستیکی (یک سوم حجم کیسه آب کارگاه و حجم باقی‌مانده اکسیژن تحت فشار) ذخیره‌سازی و به مرکز تحقیقات آبی-

پروری شهید ناصر فضلی برآبادی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال داده شدند. این پژوهش با توجه به دوره پرورش (۱۴ روز سازگاری و ۵۶ روز پرورش) انجام شد.

### ذخیره‌سازی بچه ماهیان

بچه‌ماهی‌ها پس از انتقال به مرکز تحقیقات به مدت ۲ هفته جهت سازگاری با محیط جدید در مخازن ۲۵۰ لیتری ذخیره شدند و در این مدت با غذای اکستروود کپور معمولی (شرکت فرادانه؛ پروتئین ۰/۴۲، چربی ۰/۱۱، فیبرخام ۰/۴، خاکستر ۰/۱۰، فسفر ۰/۱۲) تغذیه شدند. پس از دوره سازگاری، بچه‌ماهی‌ها زیست‌سنجی شدند و با میانگین وزنی  $9/08 \pm 0/05$  گرم و با تراکم ۱۶ عدد در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. به منظور هوادهی محیط پرورشی، در هر یک از مخازن هوادهی ملایمی از طریق سنگ هوای متصل به کمپرسور مرکزی صورت گرفت. شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، pH، اکسیژن محلول و شوری آب اندازه‌گیری می‌شد و به ترتیب  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد،  $7/8 \pm 0/07$ ،  $5 \pm 0/65$  و  $0/1$  ppt بود. آب مورد استفاده برای پرورش آب شهری بود که جهت کلرزدایی به مدت ۲۴ ساعت درون مخازن ذخیره هوادهی می‌شد.

### نحوه ساخت و آماده‌سازی غذا

در این پژوهش چهار سطح عصاره گیاه شیرین بیان شامل؛ ۰ (تیمار ۱)، ۰/۵ (تیمار ۲)، ۱ (تیمار ۳) و ۲ (تیمار ۴) درصد در جیره غذایی در نظر گرفته شد.

برای آماده‌سازی جیره‌های آزمایش، ابتدا به میزان صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد عصاره، توزین و در آب ولرم حل شدند. سپس عصاره محلول در آب با ۲ درصد پودر ژلاتین مخلوط و بر روی جیره پایه اسپری گردید. این عمل بعد از بهم زدن خوراک چندین بار تکرار شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک گردید و تا زمان مصرف در بسته‌بندی‌های مناسب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### تغذیه و غذادهی

با توجه به نتایج حاصل از زیست‌سنجی که هر ۱۴ روز یک‌بار انجام می‌گرفت، غذای مورد نیاز برای دوره بعدی محاسبه می‌شد. غذادهی به میزان ۳ درصد وزن بدن و ۲ بار در روز انجام گرفت.

### نمونه برداری

نمونه‌برداری در شرایط استریل و پس از هشت هفته تغذیه با مکمل‌های غذایی انجام شد. ماهیان قبل از نمونه‌برداری توسط پودر گل میخک با دوز ۲۰۰ ppm بی‌هوش شدند و پس از آن سطح بدن با پنبه آغشته به الکل استریل شد و به سرعت بافت کبد و روده جمع‌آوری و به داخل ویال‌های از قبل استریل شده انتقال داده شد و بلافاصله ویال‌ها به تانک ازت منتقل شدند. در پایان نمونه‌برداری نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و تا زمان استفاده جهت استخراج RNA در آن-جا نگهداری شدند.

## استخراج RNA و سنتز cDNA

در این آزمایش استخراج RNA بر اساس دستورالعمل استخراج RNA توسط ماده هضم کننده RNX-Plus انجام شد. همچنین سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس سنتز cDNA شرکت جینت پایو (Genet Bio, Korea) و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

## انجام Real time PCR

PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ۴ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ ۲۰ میکرولیتر بود. برای ساخت مستر ۱۰ میکرولیتر بافر سایبر گرین، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پیش رونده ژن هدف، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر پس‌رونده ژن هدف، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمرز، ۱ میکرولیتر DMSO و ۶/۴ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. هر ویال مخصوص PCR، محتوی ۲ میکرولیتر cDNA و ۱۸ میکرولیتر مستر بود.

## طراحی پرایمر

جهت مطالعه بیان ژن از پرایمرهای اختصاصی ژن های هدف و رفرنس که بر اساس توالی های موجود در بانک ژن NCBI طراحی شدند استفاده گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای (IGF, TNF, Lyz) و ژن رفرنس (Beta-Actin)

شماره دسترسی	کارایی پرایمر	توالی	نام پرایمر
KP661168.1	۹۲٪	GGCAGTGGTGTGTTTTGTGTC	Carp IGF F
		CGTAGTCCTTCCCCGTATCA	Carp IGF R
AJ311800	۹۲٪	TGTGTGGTGTCCCTGCTGG	Carp TNF F
		TGGAAAGACACCTGGCTGTA	Carp TNF R
AB027305	۸۹٪	AGCCGCACACTGAACGCTGTG	Carp Lyz F
		AGGCGGTGCACACATAGTTGCC	Carp Lyz R
M24113.1	۹۱٪	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	Carp Beta F
		TACCTCCCTTTGCCAGTTTC	Carp Beta R

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

بیان نسبی ژن‌های IGF، TNF و Lyz با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ( $\Delta\Delta Ct$  برابر است با  $\Delta Ct$  ژن هدف منهای  $\Delta Ct$  کالیبراتور) توسط نرم افزار اکسل انجام شد (Miandare *et al.*, 2016). همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم افزار Spss22 و همچنین آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک طرفه (One - Way ANOVA) انجام شد.

## نتایج

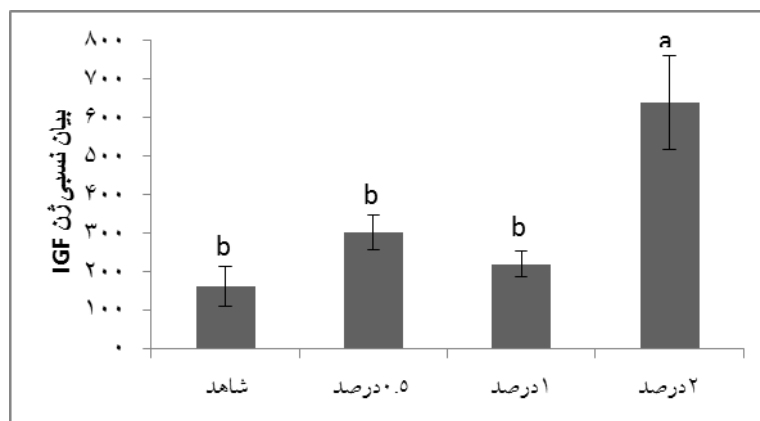
نتایج به دست آمده از ارزیابی فاکتورهای رشد نشان داد که با افزایش سطح مصرف عصاره شیرین بیان در جیره ماهی کپور میزان فاکتورهای وزن نهایی، افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه افزایش یافت به طوری که بیشترین مقدار در ماهیان تغذیه شده با ۲ درصد عصاره بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد و دیگر تیمارها داشت ( $P < 0/05$ ). همچنین کمترین مقدار ضریب تبدیل غذایی نیز در سطح معنی‌داری با سایر تیمارها و گروه شاهد در تیمار ۲ درصد بود ( $P < 0/05$ ). میزان بقا در همه گروه‌ها یکسان مشاهده شد.

جدول ۲. نتایج حاصل از ارزیابی فاکتورهای رشد تحت تأثیر استفاده از سطوح مختلف عصاره شیرین بیان

شاخص‌های رشد	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
میانگین وزن اولیه (گرم)	۹/۰۹±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۹/۰۷±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۹/۰۶±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۹/۱۰±۰/۰۴ <sup>a</sup>
میانگین وزن نهایی (گرم)	۱۵/۹۸±۰/۱۴ <sup>d</sup>	۱۶/۷۳۸±۰/۰۸ <sup>c</sup>	۱۷/۴۵±۰/۱۴ <sup>b</sup>	۱۸/۳۳±۰/۲۰ <sup>a</sup>
میانگین طول اولیه (سانتی‌متر)	۸/۶۴±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۸/۷۳±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۸/۶۶±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۸/۶۸±۰/۰۷ <sup>a</sup>
میانگین طول نهایی (سانتی‌متر)	۱۰/۳۴±۰/۳۱ <sup>a</sup>	۱۰/۵۶±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۱۰/۶۰±۰/۱۴ <sup>a</sup>	۱۰/۷۵±۰/۲۰ <sup>a</sup>
افزایش وزن بدن (گرم)	۶/۸۸±۰/۱۱ <sup>d</sup>	۷/۶۳±۰/۱۵ <sup>c</sup>	۸/۳۷±۰/۱۳ <sup>b</sup>	۹/۲۷±۰/۲۷ <sup>a</sup>
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۱/۰۰±۰/۰۱ <sup>d</sup>	۱/۰۸±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۱/۱۶±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۱/۲۵±۰/۰۳ <sup>a</sup>
شاخص وضعیت	۱/۴۲±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۴۴±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱/۴۶±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۱/۴۷±۰/۰۷ <sup>a</sup>
ضریب تبدیل غذایی	۲/۸۶±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۲/۶۰±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۲/۴۱±۰/۰۲ <sup>c</sup>	۲/۱۸±۰/۰۶ <sup>d</sup>
نرخ بقا (درصد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

## مقادیر نسبی بیان ژن IGF در کبد بچه ماهی کپور معمولی

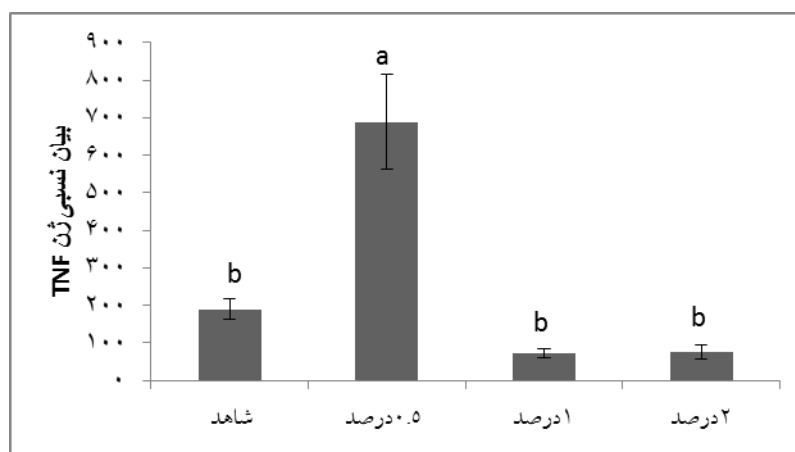
در این تحقیق بیان ژن IGF ارزیابی شد و نتایج حاصل نشان داد که در پایان دوره هشت هفته‌ای تغذیه ماهی‌ها با جیره حاوی عصاره بیان ژن IGF دارای یک الگوی افزایشی بود به طوری که گروه شاهد کمترین سطح بیان ژن و گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد بیشترین سطح بیان ژن را داشت و دارای اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها بود ( $P < 0.05$ ).



شکل ۱. بیان نسبی ژن IGF تحت تاثیر استفاده از سطوح مختلف عصاره شیرین بیان در ماهی کپور معمولی

## نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن TNF

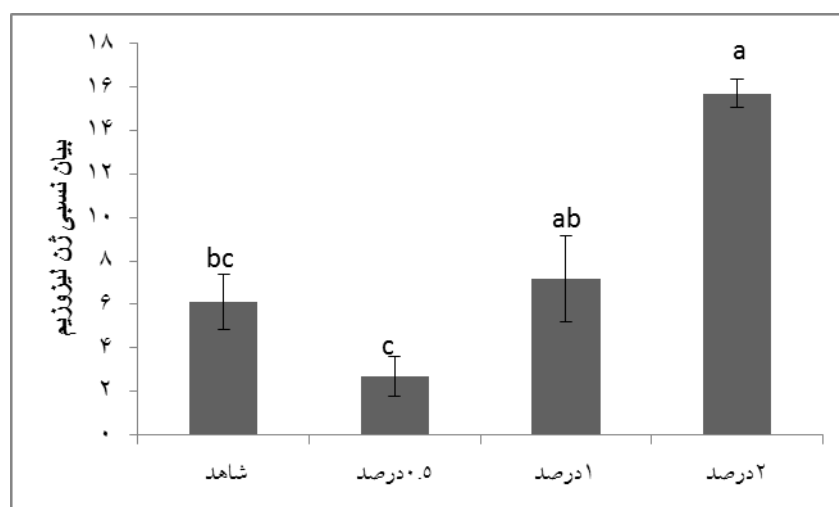
نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن TNF نشان داد که پس از ۸ هفته تغذیه ماهیان با عصاره شیرین بیان بیشترین سطح بیان در تیمار تغذیه شده با ۰/۵ درصد بود که اختلاف معنی داری با سایر گروه‌ها ( $P < 0.05$ ) داشت ولی بین سایر تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).



شکل ۲. بیان نسبی ژن TNF تحت تاثیر استفاده از سطوح مختلف عصاره شیرین بیان در ماهی کپور معمولی

## نتایج حاصل از ارزیابی بیان ژن لیپوزیم

این تحقیق نشان داد که در پایان دوره هشت هفته‌ای تغذیه با جیره حاوی عصاره شیرین بیان، بیان ژن مذکور در تیمار تغذیه شده با ۲ درصد دارای بالاترین سطح بیان بود و اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳. بیان ژن لیزوزیم تحت تأثیر استفاده از سطوح مختلف عصاره شیرین بیان در ماهی کپور معمولی

### بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص شد که استفاده از عصاره گیاه شیرین بیان باعث افزایش میزان رشد و بیان نسبی ژن IGF بچه ماهی کپور معمولی شد. دلیل این افزایش می‌تواند افزایش مصرف خوراک ناشی از افزایش اشتها به دلیل تحریکات حسی ناشی از حضور MELRs در جیره غذایی و افزایش جذب مواد مغذی و بهبود مصرف غذا باشد که در واقع موجب رشد بهتر می‌شود (Amani *et al.*, 2015). همچنین Sharma و Raj kumar (2007) نیز گزارش کردند که در این گیاه یکسری ترکیباتی وجود دارد که ممکن است باعث فعال شدن غده تیروئید و هورمون‌های محرک رشد شده که در نتیجه‌ی آن رشد ماهی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی، اثر افزایش‌دهندگی رشد با عصاره‌های گیاهی مورد استفاده به‌عنوان مواد افزودنی خوراک بستگی به غلظت مناسب، ترکیب رژیم غذایی، مدیریت پرورش و مدت زمان پرورش با جیره حاوی عصاره دارد. Banerji و Johnson (2007) گزارش کردند که رشد در ماهی *Labeo rohito* تغذیه شده با مکمل گیاهی به دلیل بهبود مصرف غذا و سنتز پروتئین افزایش می‌یابد. IGF و GH نقش مهمی در تنظیم تعادل رشد در همه مهره داران دارند. بر اساس گزارش Plisetskaya و Duan (1993) سطوح mRNA IGF-I کبدی در بسیاری از گونه‌های استخوانی به وضعیت تغذیه‌ای بستگی دارد. اساساً تولید هورمون رشد در هیپوفیز و ترشح درون ریز آن، طیف وسیعی از فرایندهای مربوط به تقسیمات سلولی را تحریک می‌نماید که این عملکرد آن‌ها به واسطه فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF) صورت می‌گیرد (Nelson and Kraak, 2010) بنابراین، تولید IGF-I وابسته به تولید GH و رهاسازی آن است که در نهایت، از طریق محور مغزی-هیپوتالاموسی و وضعیت تغذیه‌ای (مصرف غذا و جذب مواد مغذی) تحت کنترل قرار می‌گیرد. سیستم دفاعی دارای اهمیت بسزایی در حفظ سلامت گونه آبی و جلوگیری از شیوع بیماری در بین جمعیت ماهیان پرورشی دارد که این مسئله از زیان‌های اقتصادی ناشی از بروز بیماری و تلفات جلوگیری می‌کند. فاکتور نکروز کننده تومور یک پروتئین سلولی سیگنالینگ (سیتوکین) درگیر در التهاب سیستمیک است و یکی از سایتوکین‌هایی است که واکنش فاز حاد را تشکیل می‌دهند. مطالعات فراوانی بر روی این پروتئین و ژن کد کننده آن در انسان انجام شده است که نتایج حاصل نشان می‌دهد به‌طور عمده توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید می‌شود،

هرچند که می‌تواند توسط بسیاری از انواع سلول‌های دیگر مانند لنفوسیت‌ها، سلول‌های NK، نوتروفیل، ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و سلول‌های عصبی تولید شود (Song *et al.*, 2014) مولکول‌های سیستم سیتوکین توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی را دارا می‌باشند، به‌طور مثال TNF-a بیشتر نقش پروتئین‌های واسطه را در سلول‌های ایمنی بازی می‌کند و سلول‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gruss, 1996). در این مطالعه مشخص گردید که با افزایش سطح مصرف عصاره شیرین بیان در جیره میزان بیان نسبی ژن TNF از الگوی ثابتی پیروی نکرد و بالاترین میزان بیان در تیمار تغذیه شده با ۰/۵ درصد عصاره مشاهده شد. Chantao و همکاران (2008) با استفاده از سه سطح ۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پلی‌ساکاریدهای استراگالوس در جیره کپور معمولی گزارش کردند که بیان نسبی ژن TNF در بافت کلیه در تیمار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت معناداری کاهش یافت در صورتی که سایر تیمارها اختلاف معناداری با گروه شاهد نداشتند همچنین در بافت آبشش و طحال بیان این ژن در تیمار ۵۰ میلی‌گرم اختلاف معناداری با سایر گروه‌ها داشت همچنین اظهار داشتند که بیان ژن TNF وابسته به دوز می‌باشد که سطوح بالای APS باعث تحریک بیان TNF می‌شود درحالی‌که سطوح پایین نتایج عکس را نشان داد اگرچه مطالعات بیشتری باید انجام شود تا مشخص شود که آیا بیان ژن TNF وابسته به دوز هست یا نه. در این تحقیق مشخص شد سطوح پایین این عصاره برای افزایش این ژن مفید می‌باشد. لیزوزیم یکی از اجزای مهم ایمنی غیر اختصاصی ماهی است که باعث تخریب جداره باکتری‌ها، فعال سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه خواری، به عنوان اپسونین (تسهیل کننده بیگانه خواری)، در ماهی می‌گردد (Sakai, 1998). نتایج این تحقیق نشان داد که بیان نسبی ژن لیزوزیم تحت تأثیر شیرین بیان افزایش یافت. در ارتباط با اندازه‌گیری میزان فعالیت لیزوزیم در سرم و موکوس ماهی مطالعات متعددی انجام شده است که حاکی از تأثیر مثبت استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌باشند این افزایش را می‌توان به قدرت تحریک‌پذیری مواد موثره موجود در عصاره گیاه نسبت داد، که باعث افزایش سطح لیزوزیم شده است. Yin و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که استفاده از استراگالوس رادیکس باعث افزایش بیان ژن لیزوزیم ماهی تیلپیا شد. Anwei و همکاران (2008) با استخراج پلی‌ساکاریدهای گیاه شیرین بیان کردند که این پلی‌ساکاریدها دارای خاصیت‌های دارویی هستند و همچنین قادر به تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی هستند که منجر به افزایش عملکرد ماکروفاژها می‌شود. در برخی مطالعات انجام شده بیان ژن‌های لیزوزیم، TNF، IL1 و IL8 در ماهیان کپور تغذیه شده با عصاره خرما Hoseinifar و همکاران (2016) و گیاه آنگوزه Safari و همکاران (2016) افزایش یافت. در مطالعه Beltran و همکاران (2017) با استفاده از اضافه نمودن پودر پوست لیمو به جیره ماهی شانک (*Sparus aurata*) اثرات آن را بر عملکرد ایمنی بین تیمارهای آزمایشی در یک دوره ۳۰ روزه بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که در ماهیان تغذیه شده با پودر پوست لیمو در مدت ۱۵ روز اول بیان برخی ژن‌های مرتبط با ایمنی (*il1*, *igth*, *csf1* و *nkefa*) افزایش یافت. استفاده از محرک‌های ایمنی خصوصا انواع طبیعی و بیولوژیک آن‌ها جهت بالا بردن توان و مقاومت آبریان در برابر عوامل بیماری‌زا و افزایش رشد و بقا امری ضروری و لازم به‌نظر می‌رسد. از این مطالعه می‌توان چنین استنباط کرد که گیاه شیرین بیان به‌عنوان یک محرک طبیعی توانست سبب افزایش رشد و ارتقا سیستم ایمنی در ماهی کپور معمولی شود.



## منابع

- Abu-Elala, N., Marzouk, M. and Moustafa, M. 2013. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for (*Oreochromis niloticus*) challenged with some fish pathogens, International Journal of Veterinary Science and Medicine. 1: 21-29.
- Amani, M., Sotudeh-Gharebagh, R., Mostaoufi, N., Kashani, H. 2005. Optimal Extraction of Glycyrrhetic Acid From Licorice Root. Journal of Food Technology. 3: 376-580.
- Amani, M.D. El Mesallamy., Hany, I. El-Marakby., Ahmed, M.A. Souleman., Fatma S. Abd El-Naby. 2015. Evaluation of phenolic extract of licorice roots in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Egyptian Pharmaceutical Journal. 14: 117-122.
- Anwei, C.H., Fachun, W., Jiaqi, W., Zhengyu, J., Xueming, Xu. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. International Immunopharmacology. 8: 43-50.
- Asl, M.N. and Hosseinzadeh, H. 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytother Research. 22: 709-724.
- Bahi, A., Guardiola, F.A., Messina, C., Mahdhi, A. Cerezuola, R., Santulli, A., Bakhrouf, A. and Esteban, M.A. 2017. Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish. 60: 50-58.
- Beltran, J.M.G., Espinosa, C., Guardiola, F.A. and Esteban, M.A. 2017. Dietary dehydrated lemon peel improves the immune but not the (*Sparus aurata* L). Fish and shellfish Immunology., 64: 429-436.
- Cerezuola, Meseguer, J. and Esteban, M.A, 2011. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. Aquaculture. pp: 1-7.
- Chuntao, Y., Xuping, P., Yi, G., Aijun, X., Guanghong, W., Jianqing, T., Xiaodong, H. 2008 Effects of Astragalus polysaccharides (APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp (*Cyprinus carpio*). International Immunopharmacology. 8: 51-58.
- Chobkar, N. 2015. Effect of using *Falcaria vulgaris* on skin wound healing and immune response of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Endocrinology and Veterinary Clinic. 9:1-9.
- Duan, C., and Plisetskaya, E. M. 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I mRNA expression in salmon tissues. Journal of Endocrinology. 139: 243-252.
- Elabd, H., Wang, H.P., Shaheen, A., Yao H.,Abbass, A. 2016. Feeding(*Glycyrrhiza glabra*) (liquorice) and(*Astragalus membranaceus*) (AM) alters innate immune andphysiological responses in yellow perch (*Perca flavescens*). Fish and Shellfish Immunology. 54: 374-384.
- Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuola, 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.
- Gruss, H. J. 1996. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. International Journal of Clinical and Laboratory Research. 26: 143-159
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, (*Epinephelus bruneus*) against vibriosis. Fish and Shellfish Immunology. 30: 128-134.
- Hoseinifar, S H, Khalili, M, Rufchaei, R, Raeisi, M. 2016. Investigating the effects of date palm extract on growth performance and mucus immune parameters in Common Carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 fingerlings. Journal of Academia and Industrial Research. 3: 89-100.
- Johnson, C. and Banerji, A. 2007. Influence of extract isolated from the plant *Sesuvium portulacastrum* on growth and metabolism fresh water teleost (*Labeo rohita*). Fishery Technology. 44: 229-234.
- Magnadottir, B. 2010. Immunological control of Fish Disease. Marine biotechnology. 12: 361- 379.
- Miandare, H.K., Farvardin, S.h., Shabani, A., Hoseinifar, S.H. 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish, *Carassius auratus gibelio*. Fish and Shellfish Immunol.55:479-483.
- Nelson, S.N., Van, Der., Kraak, G. 2010. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary. Gen Comp Endocrinol. 168: 111-20.

- Pourgholam, R., Sharif Rohani, M., Safari, R., Saeedi, A., Binaeei M., Najafeyan R. 2013. Effect of *Echinacea purpurea* extract on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its resistance to *Streptococcus*. *Journals & Diaries - Personality Café*. 22 : 1-12.
- Raj kumar, B.K. and Sharma, L.L. 2007. Impact of *Glycyrrhiza glabra* linn. as growth promotor in th supplementary feed of an indian major carp *cirrhinus mrigala* (HAM.). *Indian Journal Animal Research*. 41: 35-38.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B. and Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future Perspectives. *Aquaculture*. 433: 50–61.
- Safari R., Hoseinifar S.H., Nezhadmoghadam, SH. and Jafar Node, A. 2016. Transcriptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and nonspecific immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary *Ferula* (*Ferula assafoetida*). *Fish and Shellfish Immunology*. pp: 1-16.
- Sakai, M. 1998. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172: 63-92. Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., and Ringo, E. 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*. 40:40-48.
- Taplur, A.D., Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic(*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*. 27: 364-356.
- Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X. and Jeney, Z., 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 253:39-47.



## The effect of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract on IGF, TNF and lysozyme genes expression in *Cyprinus carpio* fingerlings

Valiollah Jafari\*, Hamed Paknejada, Marjan Hosseinia

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### Abstract

The study aimed to assess the impact of *Glycyrrhiza glabra* extract on IGF, TNF, and lysozyme gene expression in *Cyprinus carpio*. Fish, averaging  $9.08 \pm 0.05$  grams, were distributed across 12 tanks and subjected to three levels of *G. glabra* extract (0, 0.5, 1, and 2 %) over a 56-day feeding period. Results at the study's conclusion revealed that *G. glabra* extract notably enhanced growth factors, including final weight (FW), weight gain (WG), and specific growth rate (SGR). The most significant growth was evident in fish fed 2% of the extract, displaying substantial differences compared to both the control and other treatments ( $P < 0.05$ ). Treatment with 2% also demonstrated the lowest Feed Conversion Ratio (FCR), indicating efficient feed utilization. Regarding gene expression, the study found an upregulation of the IGF gene in fish treated with 2% of *G. glabra* extract compared to the control group. TNF gene expression showed its highest levels in fish fed 0.55 of the extract, while lysozyme gene expression exhibited notable differences specifically in the 2% treatment. Overall, the findings suggest that *G. glabra* extract positively influences growth by enhancing IGF gene expression and supporting the immune system in *C. carpio*.

### ARTICLE TYPE Research

Received: 10 July 2019  
Accepted: 19 October 2023  
ePublished: 17 December 2023

\* Corresponding Author:  
[V.jafari.sh110@gmail.com](mailto:V.jafari.sh110@gmail.com)

**Keywords:** *Glycyrrhiza glabra*, gene expression, IGF, TNF and lysozyme