بررسی تاثیر سطوح تغذیه‌ای اسانس سنبل کوهی (Valerian) و مرزن جوش (Oregano) بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی

- **حمیدرضا سیدآبادی:** موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **سیما ساورسفلی*:** موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
- **علی نوری‌امامزاده:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران
- **حسین صفری:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٧ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٧

چکیده

گیاهان دارویی به‌دلیل خواص چندگانه در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های دام و طیور به‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده زیادی دارد. در این مطالعه تغییرات بیان ژن اینترفرون گاما (IFNγ) با افزودن اسانس گیاهان دارویی سنبل کوهی و مرزن جوش در جیره جوجه‌های گوشتی آرین مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٧ تیمار و ٤ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد، آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک و اسانس گیاهان دارویی سنبل کوهی و مرزن جوش در سطوح ٢٠٠ و ٤٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. صفات میانگین وزن بدن در ٦ هفتگی، میزان خوراک مصرفی، ضریب تبدیل غذایی و میزان بیان ژن IFNγ اندازه‌گیری شد. برای بررسی بیان ژن، پس از استخراج RNA از بافت کبد جوجه‌ها، cDNA ساخته شد و روش Semi-Quantitative RT-PCR به‌کار رفت. برای بررسی تاثیر تیمارهای آزمایشی بر صفات و مقایسه میانگین تیمارها از رویه GLM و آزمون دانکن (p<٠/٠٥) در نرم‌افزار SAS ٩ استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن IFNγ در سطوح مختلف تیمارها تفاوت معنی‌داری دارد به‌طوری‌که در تیمار مرزن‌جوش(٤٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم)بیش‌ترین و در تیمارسنبل‌کوهی (٢٠٠ میلی‌گرم در کیلوگرم) کم‌ترین میزان بیان مشاهده شد. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مرزن جوش در جیره جوجه‌های گوشتی باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی و کاهش میزان تلفات می‌شود.

کلمات کلیدی: بیان ژن، جوجه گوشتی، عملکرد، گیاهان دارویی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:simasavar@gmail.com

مقدمه

بسیاری از ویژگی‌های سودمند گیاهان دارویی از مواد موثره موجود در آن‌ها منشا می‌گیرد (مانند: کارواکرول، تیمول ، میرسن) و بیش‌تر فعالیت‌های بیولوژیکی اثبات شده این مواد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی می‌باشد (Windisch و همکاران، ۲۰۰۸). این گیاهان سبب خوش‌طعمی و کنش‌های روده، اثرات ضدمیکروبی و هم‌چنین فعالیت‌های گسترده آنتی‌اکسیدانی می‌شوند و افزودن این مواد به جیره، باعث بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی می‌شود (صمدیان و همکاران، ۱۳۹۴). میزان تأثیر مواد گیاهی مورد استفاده در تغذیه جوجه‌های گوشتی به عوامل بسیاری مثل ترکیب و سطح افزودن مواد گیاهی به جیره، ژنتیک پرنده، ترکیب کلی جیره و مدیریت کلی مزرعه بستگی دارد. بسیاری از تحقیقات، نقش ترکیبات گیاهی را به‌عنوان محرک رشد طبیعی غیرآنتی‌بیوتیکی در تغذیه جوجه‌های گوشتی تایید می‌کنند (محیطی و همکاران، ۱۳۸۹). به‌طور کلی ترکیبات گیاهی شامل قطعات قابل استفاده (دانه‌ها، میوه‌ها، ریشه‌ها، برگ‌ها و پوست درخت‌ها)، گیاهان معطر و ادویه‌جات مختلف (مرزن‌جوش، آویشن، رزماری، گشنیز، دارچین، رازیانه، سیر، خردل و فلفل) و نیز عصاره‌های حاصل از این گیاهان به‌صورت اسانس‌های گیاهی می‌باشند (محیطی و همکاران، ۱۳۸۹). اینترفرون‌ها پروتئین‌های طبیعی هستند که به‌وسیله سلول‌های سیستم ایمنی مهره‌داران تولید می‌شوند و مسئولیت آن‌ها مبارزه با عوامل خارجی از قبیل ویروس‌ها، انگل‌ها و تومورها است. اینترفرون‌ها متعلق به گروه بزرگی از گلیکوپروتئین‌ها به‌نام سایتوکین هستند. یکی از انواع اینترفرون‌ها، اینترفرون گاما است که دارای ۱۶۹ اسیدآمینه است و تقویت‌کننده سیستم ایمنی بوده و با اثر فعال‌کنندگی فاگوسیت‌ها باعث از بین بردن میکروارگانیسم‌هایی مانند استافیلوکوک اورئوس، توکسوپلاسماگوندی، لیشمانیا دونووانی، لیستریامونوسیتوژنز و مایکو باکتریوم‌اویوم در داخل سلول‌ها می‌شود (Schroder، ۲۰۰۴). سیدآبادی و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثر سطح ترئونین جیره آغازین بر بیان ژن اینترفرون گامای موثر بر سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی سویه آرین نشان دادند که بیان ژن IFNγ در بافت کبد در سطح ۰/۸۶ درصد بالاترین میزان بیان ژن را دارد. این نتایج بیانگر تاثیر مثبت مکمل ترئونین در بهبود عملکرد سیستم ایمنی پرندگان می‌باشد. Singh و همکاران (۲۰۱۲) برای بررسی بیان ژن‌های سایتوکین و تولید اسیدنیتریک در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده با واکسن سالمونلا تیفی موریوم آزمایشی انجام دادند. نتاج تحقیق آن‌ها نشان داد که جوجه‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه شاهد هم‌زمان با افزایش تولید اسیدنیتریک، میزان بیان ژن IFNγ افزایش یافته اما میزان بیان ژن IL-2 کاهش یافته است. Sean و همکاران (۲۰۰۹) برای بررسی بیان ژن‌های سایتوکین در جوجه‌های گوشتی و اردک‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای مرغی، مطالعه‌ای انجام دادند و گزارش کردند که بیان ژن IFNγ در کبد جوجه‌های گوشتی بیش از اردک است و در حالی که بیان ژن IFNα در هر دو گونه یکسان است. Haghighi و همکاران (۲۰۰۸) به‌منظور بررسی بیان ژن‌های سایتوکین در جوجه‌های گوشتی تیمارشده با پروبیوتیک گزارش کردند که با توجه به این‌که پروبیوتیک‌ها برای کنترل پاتوژن‌ها و افزایش پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی به‌کار برده می‌شوند، بیان ژن‌های IL-12 (اینترلوکین ۱۲) و IFNγ (اینترفرون گاما) در پرندگان آلوده به سالمونلا تیفی موریوم تیمار شده با پروبیوتیک نسبت به پرندگانی که تیمار نشده کاهش می‌یابد. Janet و همکاران (۲۰۰۸) اثرات استفاده از سطوح تغذیه‌ای مکمل کرومیوم بر بیان ژن IFNγ در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده با واکسن ویروس بیماری نیوکاسل را بررسی کردند، در آزمایش آن‌ها از ۷ گروه تیمار (شاهد و سطوح مختلف مکمل کرومیوم) استفاده و آزمایش Real Time PCR انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از مکمل کروم در جیره طیور گوشتی بیان ژن IFNγ را افزایش می‌دهد. Kogut و همکاران (۲۰۰۵) بیان mRNA ژن IFNγ در جوجه‌های مبتلا به عفونت سالمونلا با استفاده از روش Real Time PCR را بررسی کردند و نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که علی‌رغم این‌که ژن‌های سایتوکین نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی طیور دارند اما بیان ژن IFNγ تغییری نکرد. Sijben و همکاران (۲۰۰۳) اثرات استفاده از اسیدهای چرب غیراشباع بر بیان ژن‌های سایتوکین در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده با سالمونلاتیفی موریوم را بررسی کردند و آن‌ها در جیره غذایی طیور از روغن‌های ذرت، کتان، سورگوم و چربی (پیه) گاو استفاده کردند و دو ساعت پس از تزریق سالمونلاتیفی موریوم پلی‌ساکارید، از بافت کبد آن‌ها RNA استخراج کردند. نتایج حاصل از Real Time PCR نشان داد که بیان ژن‌های IL-6، IL-8 و IFNγ در جوجه‌های تیمارشده با اسیدهای چرب غیراشباع افزایش یافت. موسوی و همکاران (۱۳۸۷)، اثرات اسانس آویشن شیرازی و نایسین در درجه‌حرارت (۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان نگه‌داری (تا ۲۱ روز) را روی رشد سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار دادند. عمل ممانعت‌کنندگی مواد یاد شده در ۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۰۵ درصد اسانس قوی بود به‌طوری‌که تعداد باکتری در روز دوم مطالعه در

غلظت‌های توام ۰/۰۱۵ اسانس و ۰/۵ نایسین، ۰/۰۳ اسانس و ۰/ ۲۵ نایسین، ۰/۰۳ اسانس و ۰/۵ نایسین به کم‌تر از لگاریتم ۲ رسید. غلظت‌های مختلف توام اسانس که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی رشد باکتری مورد بررسی تاثیری نداشت و تعداد باکتری در روز اول مطالعه به بیش‌تر از لگاریتم ۶ رسید. کمالی‌سنگانی و همکاران (۱۳۹۱)، تاثیر گیاه دارویی زردچوبه بر بیان ژن MUC۲ را در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها کاهش معنی‌داری در بیان ژن MUC۲ در جوجه‌های تغذیه شده با جیره پایه و بدون مکمل گیاه داروئی را نشان داد. با توجه به نقش گیاه داروئی در افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌های مرتبط با موسین و یا با تاثیر مستقیم بر تولید موسین، این گیاه می‌تواند برای بهبود ژنتیکی عملکرد دستگاه گوارش طیور به‌کار رود. در تحقیقات مختلف، استفاده از اسانس سنبل کوهی و مرزن جوش و اثرات آن بر عملکرد و ایمنی بررسی شده است ولی اثرات آن روی بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی مورد بررسی قرار نگرفته است، به‌همین منظور تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر سطوح تغذیه‌ای اسانس سنبل کوهی و مرزن جوش بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر با هدف‌بررسی تاثیر سطوح تغذیه‌ای اسانس سنبل کوهی و مرزن جوش بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی در قالب ۷ تیمار و ۴ تکرار و در هر تکرار ۲۰ قطعه جوجه گوشتی آرین در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شد. پارامترهای مدیریتی از قبیل درجه حرارت، رطوبت، نور، تهویه، تغذیه و واکسیناسیون در پرورش و نگه‌داری جوجه گوشتی مورد آزمایش براساس اصول استاندارد پرورش جوجه گوشتی رعایت شد و برای تمامی طیور یکسان بود. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف آزمایش، آغازین (۲-۰ هفتگی)، رشد (۴-۲ هفتگی) و پایانی (۶-۴ هفتگی) از جداول راهنمای پرورش جوجه‌های گوشتی آرین استخراج شد. با استفاده از مواد خوراکی موجود و با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری جیره‌نویسی UFFDA جیره‌های آزمایشی تنظیم و ترکیب شیمیایی اقلام خوراکی مورد استفاده در جیره آزمایشی از جداول استاندارد غذایی NRC(۱۹۹۴) استخراج شد. تیمارهای تحقیق عبارت از ۷ گروه آزمایشی شامل: جیره پایه (گروه شاهد)، جیره پایه+۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پروبیوتیک (شاهد مثبت)، جیره پایه+۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک آویلامایسین (شاهد مثبت)، جیره پایه +۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس سنبل کوهی، جیره پایه +۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس سنبل کوهی، جیره پایه+۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس مرزن جوش و جیره پایه+ ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس مرزن جوش بود.

میانگین وزن بدن: در پایان هر دوره هفت روزه، وزن‌کشی جوجه‌های هر تکرار به‌صورت گروهی و دو ساعت بعد از قطع دان، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۱۰± گرم انجام شد (Lesson، ۱۹۸۴). متوسط وزن بدن هر جوجه در هر سن از تقسیم وزن جوجه‌های هر تکرار در آن سن بر تعداد پرنده‌های زنده در همان سن محاسبه شد.

خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی (گرم): مقدار خوراک مصرفی هر تکرار به‌طور هفتگی اندازه‌گیری شد و ضریب تبدیل غذایی در هر مقطع پرورش، از تقسیم گرم خوراک مصرفی بر وزن پرنده در همان سن به‌دست آمد (Lesson، ۱۹۸۴). در پایان دوره رشد (سن ۴۲ روزگی) از هر باکس یک قطعه جوجه کشتار و نمونه‌هایی از بافت کبد برای بررسی بیان ژن IFNγ جدا شد، نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Kashofer و همکاران، ۲۰۱۳). به این منظور ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA (Gene JET RNA Purification Kit) شرکت فرمنتاز مجموع RNA از کبد استخراج گردید و ارزیابی کیفیت و کمیت RNA با استفاده از نانودراپ و سنتز cDNA از طریق کیت تجاری ساخت شرکت فرمنتاز و با توجه به دستورالعمل شرکت فرمنتاز انجام شد. در ادامه میزان mRNA موجود با استفاده از Real Time PCR و کیت سایبرگرین ساخت شرکت فرمنتاز اندازه‌گیری شد (Maxima SYBR Green qPCR master mix, Fermentas, France). در این آزمایش برای ژن IFNγ از آغازگرها براساس جدول ۱ استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار انجام شد که تیمار یک به‌عنوان تیمار شاهد درنظر گرفته شد. در طول دوره آزمایش صفات تولیدی مانند وزن زنده (گرم)، افزایش وزن روزانه (گرم)، مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری‌شده با استفاده از نرم‌افزار SAS ۲۱ با مدل طرح کاملاً تصادفی رویه عمومی خطی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه دانکن استفاده شد، مدل آماری طرح به‌شرح زیر بود: $yij=\mu+Ti+eij$ که yij : میزان بیان ژن IFNγ در بافت کبد؛ μ : میانگین کل؛ Ti : اثر iامین تیمار؛ eijk: اثر عوامل باقی‌مانده است.

جدول۱: آغازگرهای مورد استفاده در فرآیند Real –Time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر(°C)	طول محصول(bp)
IFNγ	F ۵´-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3´ R ۵´- GGCTTTGCGCTGGATTC-3´	۶۰	۲۵۹
GAPDH	F ۵´-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3´ R ۵´-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3´	۶۰	۲۶۴

نتایج

میانگین وزن بدن: نتایج مربوط به وزن بدن در جدول ۲ ارائه شده است. طبق نتایج جدول وزن بدن در سن ۴۲ روزگی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار دارد (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بالاترین وزن بدن در تیمار مرزن جوش(۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و کم‌ترین در سنبل کوهی (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود.

جدول ۲: اثر تیمارهای مختلف بر وزن بدن (گرم)

تیمار	SE ± میانگین
شاهد	۱۸۲۱/۰۰ ab
آنتی‌بیوتیک	۱۸۸۴/۲۳a
پروبیوتیک	۱۸۸۹/۳۰ a
سنبل کوهی (۲۰۰)	۱۷۱۸/۹۰b
سنبل کوهی (۴۰۰)	۱۸۶۶/۴۰ a
مرزن جوش (۲۰۰)	۱۸۴۰/۴۰ a
مرزن جوش (۴۰۰)	۱۸۹۶/۶۰ a
SEM	۳۹/۲۰
معنی‌داری	۰/۰۴

حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵)

مقدار خوراک مصرفی: نتایج مربوط به خوراک مصرفی در جدول ۳ ارائه شده است. خوراک مصرفی در سن ۴۲ روزگی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵)، اما بالاترین خوراک مصرفی در تیمار شاهد و کم‌ترین در تیمار مرزن جوش (۲۰۰) بود.

ضریب تبدیل غذایی: نتایج مربوط به ضریب تبدیل در جدول ۴ ارائه شده است. طبق نتایج جدول ضریب تبدیل در سن هفت روزگی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار ندارد (P>۰/۰۵)، به‌طوری‌که بالاترین ضریب تبدیل در تیمار شاهد و کم‌ترین در تیمار آنتی‌بیوتیک و مرزن جوش(۴۰۰) بود.

جدول۳: اثر تیمارهای مختلف بر خوراک مصرفی(گرم)

تیمار	SE ± میانگین
شاهد	۳۶۹۴/۳۰ a
آنتی‌بیوتیک	۳۶۰۹/۷۰a
پروبیوتیک	۳۵۶۷/۴۰a
سنبل کوهی (۲۰۰)	۳۴۷۴/۹۰ a
سنبل کوهی (۴۰۰)	۳۶۵۱/۰۰ a
مرزن جوش(۲۰۰)	۳۴۱۱/۰۰ a
مرزن جوش(۴۰۰)	۳۶۱۵/۴۰ a
SEM	۱۴۳/۹۰
معنی‌داری	۰/۸۲

حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵)

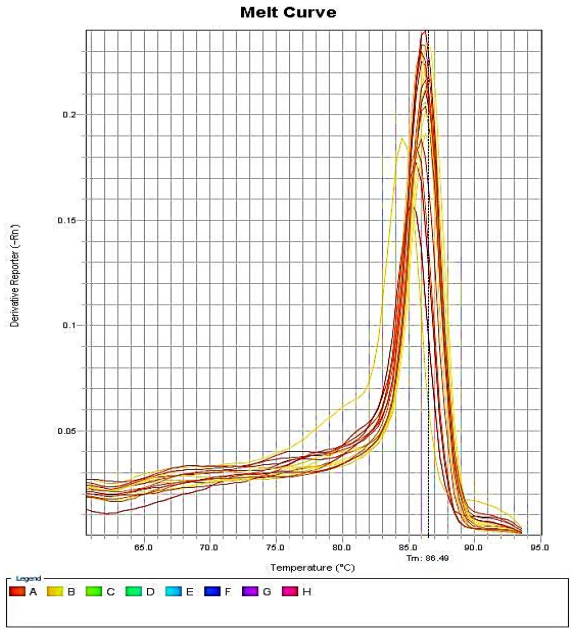
جدول۴: اثر تیمارهای مختلف بر ضریب تبدیل غذایی(گرم/گرم)

تیمار	SE ± میانگین
شاهد	۲/۰ a
آنتی‌بیوتیک	۱/۹a
پروبیوتیک	۱/۹a
سنبل کوهی (۲۰۰)	۲/۰a
سنبل کوهی (۴۰۰)	۲/۰a
مرزن جوش(۲۰۰)	۱/۹a
مرزن جوش(۴۰۰)	۱/۹a
SEM	۰/۰۹۸
معنی‌داری	۰/۸۲

حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار آماری است (P<۰/۰۵)

بیان ژن: نتایج نورسنجی با دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ نشان داد که RNA استخراج شده از بافت روده طیور دارای کیفیت و کمیت مناسبی است. پروتئین‌ها متداول‌ترین آلوده‌کننده‌های اضافی در نمونه‌های DNA و RNA می‌باشند که نور فرابنفش را در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند. هم‌چنین بقایای فنلی و الکلی که از منابع آلوده‌کننده بیولوژی برای نمونه‌های DNA و RNA

محسوب می‌شوند قادر به جذب طول موج ۲۳۰ نانومتر می‌باشند. لذا با محاسبه جذب نوری نمونه اسیدنوکلئیک در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و محاسبه نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ می‌توان خلوص اسیدهای نوکلئیک را مشخص نمود. به‌طور ایده‌آل نسبت OD_{260} به OD_{280} برآوردی از نسبت اسیدهای نوکلئیک به پروتئین‌ها در نمونه است و درجه خلوص RNA را مشخص می‌نماید. این نسبت برای RNA خالص تقریباً برابر با ۱/۸ تا ۲ می‌باشد. در صورتی‌که کم‌تر از این مقدار باشد، مقدار اسیدنوکلئیک بسیار کم‌تر از آن خواهد بود که بتوان با آن کار کرد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ Thermo تعیین شد. در مورد نمونه استخراج شده از بافت کبد نسبت به‌دست آمده برابر با ۱/۹۶ بود، که این نتایج حاکی از خلوص بالا و عدم وجود آلوده‌کننده‌های فنلی و الکلی می‌باشد. پس از ساخت cDNA برای اطمینان از نتایج کار، غلظت cDNA های سنتز شده با استفاده از نانودراپ تعیین شد. نتایج نورسنجی cDNAهای ساخته‌شده از RNA استخراجی بافت کبد نشان داد که cDNAها از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار هستند. پس از تعیین کمیت و کیفیت cDNA سنتز شده از نمونه‌های کبد با نانودراپ برای انجام Real Time PCR، تمام cDNAها رقیق شد و به غلظت حدود ۳۰۰ نانوگرم/میکرولیتر رسید و سپس غلظت cDNAها توسط نانودراپ تایید شد. به‌منظور تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرهای اختصاصی ژن، یک واکنش PCR با شیب دمایی مختلف انجام شد. با توجه به این که ژن IFNγ و GAPDH بهترین باند را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان دادند این دما برای اتصال پرایمرها انتخاب شد. ازجمله خصوصیات و مزایای Real time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود. دمای ذوب DNA یک پارامتر ویژه برای این مولکول می‌باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتیدها، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد. از آن‌جایی‌که SYBR Green I نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل شود، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد. لذا با استفاده از قابلیت دستگاه (Applied Biosystems ۷۳۰۰) در حضور مخلوط اصلی اقدام به رسم یک شیب دمایی Real time PCR شد. این آزمون برای ژن IFNγ و ژن کنترل GAPDH در طیف حرارتی ۶۰ درجه سانتی‌گراداندازه‌گیری شد. بالاترین $\triangle Rn$ و کم‌ترین CT ملاک انتخاب دمای بهینه اتصال آغازگرها می‌باشد. بر این اساس دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن‌ها انتخاب شدند. برای ژن‌های به‌کار برده شده دمای Tm برابر با ۶۰ درجه سانتی‌گراد شد. با توجه به منحنی ذوب برای آغازگرها می‌توان گفت که آغازگرها به‌صورت اختصاصی عمل کرده‌اند و یک نمونه منفرد را از cDNA تکثیر نموده‌اند، همان‌طورکه در شکل دیده می‌شود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر وجود پرایمر دایمر می‌باشد، وجود ندارد و این نشانگر این موضوع است که آغازگرها، تقابلی با هم ندارند. از آن‌جاکه پرایمر دایمرها قطعات کوچک‌تری نسبت به محصول اصلی تولید می‌کنند، بنابراین دمای ذوب پایین‌تری نسبت به محصول اصلی دارند. در نتیجه منحنی ذوب پرایمر دایمرها کوچک‌تر و قبل از منحنی ذوب محصول اصلی می‌باشد. درصورتی‌که محصولی به‌صورت غیراختصاصی تکثیر شود که دمای ذوب آن بالاتر از محصول اصلی باشد، منحنی ذوب بعد از منحنی ذوب محصول اصلی دیده می‌شود. منحنی ذوب مناسب دارای ویژگی‌هایی نظیر کشیده و نوک تیز بودن می‌باشد و هم‌چنین منحنی ذوب تکرارهای یک نمونه کاملاً روی‌هم قرار می‌گیرند.



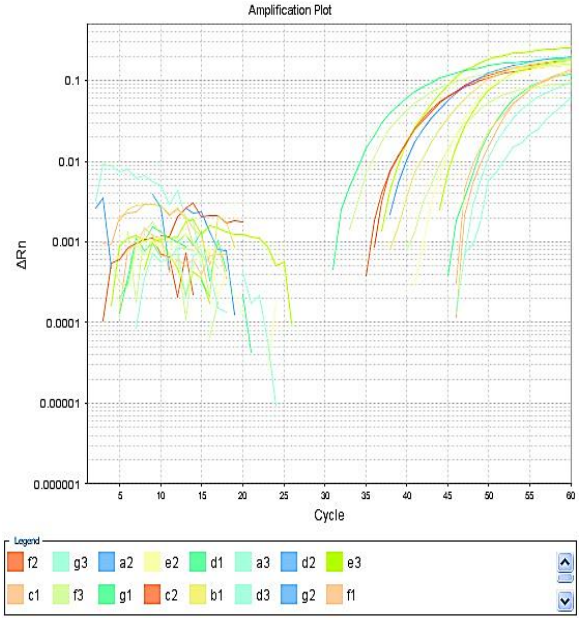
شکل ۱: منحنی ذوب محصول ژن IFNγ

بیان ژن IFNγ: نتایج بررسی بیان ژن‌های GAPDH و IFNγ نشان داد که مقدار بیان ژن IFNγ نسبت به GAPDH که به‌عنوان ژن شاهد درنظر گرفته شده بود، در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری دارد. با توجه به این‌که در این آزمایش سطوح مختلف پروبیوتیک، آنتی‌بیوتیک، سنبل کوهی و مرزن جوش مورد بررسی قرار

گرفت و برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه شاهد بود، لذا جیره پایه (شاهد) به‌عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همان‌طورکه در جدول ۵ دیده‌می‌شود بیان‌ژن IFNγ در سطوح‌مختلف تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که میزان بیان ژن IFNγ در تیمار سنبل کوهی (۲۰۰) کم‌ترین بیان و در تیمار مرزن جوش (۴۰۰) بیش‌ترین میزان بیان ژن را دارد. شکل ۲ منحنی تکثیر واکنش Real-Time PCR برای ژن IFNγ را نشان می‌دهد.

جدول۵: میزان بیان ژن IFNγ در سطوح مختلف تیمارها

	گروه‌های آزمایشی								
تیمار	شاهد	آنتی‌بیوتیک	پروبیوتیک	سنبل کوهی (۲۰۰)	سنبل کوهی (۴۰۰)	مرزن جوش (۲۰۰)	مرزن جوش (۴۰۰)	SEM	P value
میانگین	۶/۱۱^{bc}	۱۰/۵^{ab}	۸/۵^{bc}	۲/۴۶^{c}	۴/۷^{bc}	۸/۵^{bc}	۱۶/۶^{a}	۲/۰۳	۰/۰۰۶



شکل ۲: منحنی تکثیر واکنش Real-Time PCR برای ژن IFNγ

بحث

در این تحقیق میانگین وزن بدن با نتایج تحقیق روفچانی و همکاران (۱۳۸۹) که تأثیر استفاده از سطوح مختلف مرزن جوش بر عملکرد و خصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ را بررسی کردند، مطابقت دارد. آن‌ها در تحقیق خود گزارش کردند که استفاده از ۶۰۰ میلی‌گرم مرزن جوش در هر کیلوگرم خوراک در دوره رشد، به‌طور معنی‌داری افزایش وزن بیش‌تری در مقایسه با گروه شاهد دارد (P<۰/۰۵). نتایج تحقیق حاضر در تقابل با یافته‌های Botsoglou و همکاران (۲۰۰۲) و نیز Cross و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر عدم تأثیر استفاده از اسانس مرزن جوش بر عملکرد جوجه‌های گوشتی می‌باشد. نتایج حاصل از مقدار خوراک مصرفی در این تحقیق با نتایج تحقیق روفچانی و همکاران(۱۳۸۹)که به‌منظور بررسی تأثیر استفاده از سطوح مختلف مرزن جوش بر عملکرد و خصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی راس ۳۰۸ انجام گرفت،مطابقت دارد.آن‌ها مشابه تحقیق حاضر گزارش کردند که استفاده از اسانس مرزن‌جوش در هر یک از دوره‌های پرورش، تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک ندارد (P>۰/۰۵).

نتایج حاصل از این تحقیق برای ضریب تبدیل غذایی با نتایج تحقیق روفچانی و همکاران(۱۳۸۹)مغایرت دارد. آن‌ها در تحقیق خود گزارش کردند که به‌کارگیری ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم اسانس مرزن جوش در هر کیلوگرم ماده خوراکی در دوره رشد، راندمان مصرف خوراک را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌دهد. هم‌چنین Lee و همکاران (۲۰۰۲)، گزارش کردند که ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی قادرند به گونه‌ای مثبت راندمان مصرف خوراک را تحت تأثیر قرار دهند. به گونه‌ای مشابه Windisch و همکاران (۲۰۰۸) پیشنهاد کردند که افزودنی‌های خوراکی گیاهی و به‌طور مشخص اسانس‌ها قادرند با افزایش غلظت آنزیم‌های گوارشی، راندمان مصرف خوراک را در جوجه‌های گوشتی ارتقاء دهند که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد.

در مورد تاثیر استفاده از گیاهان دارویی روی عملکرد جوجه‌های گوشتی، نتایج متفاوتی گزارش شده است. برخی، اثرات آن‌ها را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی، مثبت بیان می‌کنند (Cross و همکاران، ۲۰۰۷) ، درحالی‌که گروه دیگر از محققان ذکر کردند که این مواد اثری بر افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک

ندارند (Ocak و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که استفاده از سطوح مختلف مرزن‌جوش و سنبل کوهی روی میانگین مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی تأثیر معنی‌داری ندارد که این نتایج با نتایج تحقیق روفچانی و همکاران (۱۳۸۹)، Lee و همکاران (۲۰۰۲) و Hernandez و همکاران (۲۰۰۴)، که نشان دادند گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها بر خوراک مصرفی تأثیر ندارد، مطابقت داشت. از طرف دیگر در تحقیقی که توسط مصدق و همکاران (۱۳۹۲)، به‌منظور بررسی تأثیر استفاده از اسانس گیاه دارویی مرو تلخ روی مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی سویه راس انجام گرفت، نتایج نشان داد که استفاده از اسانس این گیاه تأثیر معنی‌داری روی میزان مصرف خوراک در سن ۲۲ تا ۴۲ روزگی دارد که این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مغایرت دارد.

هم‌چنین در این تحقیق مشخص شد که استفاده از سطوح مختلف مرزن جوش و سنبل کوهی روی میانگین وزن بدن در ۴۲ روزگی تأثیر معنی‌داری دارد که این نتایج با نتایج تحقیق روفچانی و همکاران (۱۳۸۹)، مصدق و همکاران (۱۳۹۲)، روستایی و همکاران (۱۳۹۱) و Nasir (۲۰۰۸) مطابقت دارد.

نحوه تأثیرگذاری عصاره گیاهان دارویی بر پارامترهای عملکرد در انواع حیوانات اهلی به‌روشنی مشخص‌نمی‌باشد. ولی به‌نظر می‌رسد که بهبود عملکرد پرندگان به‌دنبال مصرف فرآورده‌های گیاهی به‌دلیل تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی و بهبود هضم و جذب مواد مغذی حاصل می‌شود. اجزای فنولیک موجود در گیاهان می‌تواند با کاهش تعداد میکروب‌های پاتوژن روده، مانع از اتلاف مواد مغذی شده و بدین ترتیب سبب بهبود عملکرد و افزایش پروتئین در بافت‌های بدن شوند. بنابراین اجزای فنولیک موجود در عصاره مرزن جوش و سنبل کوهی، احتمالاً از طریق بهبود در جذب مواد غذایی منجر به بهبود میانگین افزایش رشد در جوجه‌های گوشتی شده است (روستایی و همکاران، ۱۳۹۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار بیان ژن IFNγ در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری دارد که این نتایج با یافته‌های تحقیقات کمالی و همکاران (۱۳۹۱)، مطابق است. آن‌ها در تحقیق خود گزارش کردند که گیاهان دارویی زردچوبه، آویشن و دارچین، بیان ژن Muc۲ را در جوجه‌های مبتلا به آسیت به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($P<0/05$). براساس نتایج حاصله، به‌نظر می‌رسد استفاده از ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس مرزن جوش در هر کیلوگرم جیره جوجه گوشتی، توانسته است بهره‌برداری از مواد غذایی را به گونه‌ای مثبت تحت تأثیر قرار دهد. با توجه به ارتباط مستقیم میانگین افزایش وزن در پایان ۴۲ روزگی و افزایش بیان ژن در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار ۷، به‌نظر می‌رسد افزایش ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس مرزن‌جوش در هر کیلوگرم جیره‌جوجه گوشتی باعث بهبود در عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌شود. به‌طورکلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این گروه از افزودنی‌ها، پتانسیل زیادی دارند اما ترکیب و غلظت صحیح مصرف آن‌ها باید به‌درستی انتخاب شود که این امر نیاز به تحقیقات بیش‌تر دارد.

منابع

۱. **روستائی‌علی‌مهر، م.؛ باهرقهرمانی‌زهرائی، ب. و حقیقیان رودسری، م.، ۱۳۹۲.** اثر عصاره گیاه سرخارگل بر عملکرد، پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال جوجه‌های گوشتی. مجله دامپزشکی ایران. دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۶۰ تا ۷۰.

۲. **روفچائی، ا.؛ ایرانی، م.؛ ابراهیم‌زاده، ع. و رئیسی، م.، ۱۳۸۹.** تاثیر سطوح مختلف اسانس گیاه مرزن‌جوش بر عملکرد و خصوصیات لاشه جوجه های گوشتی. پنجمین همایش ایده های نو در کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان.

۳. **سیدآبادی، ح.ر.؛ ساورسفلی، س. و ایسوندی، ش.، ۱۳۹۵.** اثر سطح ترئونین جیره آغازین بر بیان ژن اینترفرون گامای موثر بر سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی سویه آرین. ششمین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار.

۴. **صمدیان، ف.؛ کریمی‌ترشیزی، م.ا.؛ انصاری‌پیراسرایی، ز.؛ واثقی،ح.؛محمدنژاد، ف. و واحدی، ح.، ۱۳۹۴.** اثر سطوح مختلف اسانس نعناع،لیمو، آویشن و زنیان بر عملکرد، فراسنجه‌های خونی و بیان ژن‌های لیپوژنیک کبدی در جوجه‌های گوشتی.نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران. جلد ۷، شماره ۳، صفحات ۳۲۹ تا ۳۳۹.

۵. **کمالی‌سنگانی، ا .؛ مسعودی، ع.ا. و حسینی، ع.، ۱۳۹۱.** بررسی تاثیر گیاهان دارویی زردچوبه، آویشن و دارچین بر بیان ژن ROCK1 در بافت ریه جوجه‌های گوشتی. سومین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.

۶. **محیطی‌اصل، م.؛ حسینی، ع.؛ میمندی‌پور، ا. و مهدوی، ع.، ۱۳۸۹.** گیاهان دارویی در تغذیه دام وطیور. انتشارات الهادی قم ۳۱۷ صفحه، چاپ اول.

۷. **مصدق، ر.؛ سالاری، س.؛ ساری، م.؛ محمدآبادی، ط. و تقی زاده، م.، ۱۳۹۲.** مقایسه اثر افزودن اسانس گیاه دارویی بومی مرو

تلخ با آنتی بیوتیک ویرجینیامایسین بر عملکرد، متابولیت‌های خون و برخی از فراسنجه‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی. نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران. شماره ۵، صفحات ۲۰ تا ۲۷.

۸. **موسوی، م.؛ آخوندزاده‌بستی، ا.؛ میثاقی، ع . و جباری‌خامنه، ح.، ۱۳۸۹.** اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی‌موریوم در سوپ جو تجارتی. یازدهمین کنگره دامپزشکی ایران.

۹. **Botsoglou, N.A.; Florou-Paneri, P.; Christaki, E.; Fletouris, D.J. and Spais, A.B., 2002.** Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. British Poultry Science. Vol. 43, pp: 223-230.

۱۰. **Cross, D.E.; Mcdevitt, R.M.; Hillman, K. and Acamovic, T., 2007.** The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. Brit. Poult. Sci.Vol. 48, pp: 496-506.

۱۱. **Ertas, O.; Guler, T.; Ciftci, M.; Dalkilic, B. and Yılmaz, O., 2005.** The effect of a dietary supplement coriander seeds on the fatty acid composition of breast muscle in japanese quail. Revue Med Vet. Vol. 156, No. 10, pp: 514-518.

۱۲. **Haghighi, H.R.; Abdul-Careem, M.F.; Dara, R.A.; Chambers, J.R. and Sharif, S., 2008.** Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection.Vet Microbiol. Vol. 1, No. 126, pp: 225-233.

۱۳. **Hernandez, F.; Madrid, J.; Garcia, V.; Orengo, J. and Megias, M.D., 2004.** Influence of two plant extracts on broiler performance digestibility and digestive organ size. Journal of Poultry Science. Vol. 83, pp: 169-174.

۱۴. **Janet, B.; Ahmed, K.A.; Tyagi, P.; Saxena, M. and Saxena, V.K., 2008.** Effects of supplemental chromium on interferon-gamma (IFN-gamma) mRNA expression in response to Newcastle disease vaccine in broiler chicken. Research in Veterinary Science. Vol. 1, pp: 46-51.

۱۵. **Kashofer, K.1.; Viertler, C.; Pichler, M. and Zatloukal, K., 2013.** Quality control of RNA preservation and extraction from paraffin-embedded tissue: implications for RT-PCR and microarray analysis. PLoS One.Vol. 8, No. 7, pp: 70714.

۱۶. **Kogut, M.H.; Rothwell, L. and Kaiser, P., 2005.** IFN gamma priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of Salmonella enterica serovar enteritidis. J Interferon Cytokine Res. Vol. 25, No. 2, pp: 73-81.

۱۷. **Lee, K.W.; Everts, H.; Kappert, H.J.; Yeom, K.H. and Beynen, A.C., 2002.** Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. J. Appl. Poult. Res. Vol. 12, pp: 394-399.

۱۸. **Lesson, S., 1984.** Growth and carcass characteristic of broiler chickens fed virginiamycin. Nutr Res Vol. 29, pp: 1383-1389.

۱۹. **Lowenthal, J.W.; Digby, M.R. and York, J.J., 1995.** Production of interferon-gamma by chicken T cells. J Interferon Cytokine Res. Vol. 15, No. 11, pp: 933-938.

۲۰. **NRC. 1994.** Nutrient Requirements of Poultry. 9th Ed. Natl. Acad. Sci., Washington DC.

۲۱. **Nasir, Z., 2008.** Comparison effects of Echinacea purpurea juices and Nigella sativa seeds on performance, some blood parameters, carcass and meat quality of broilers. Ph. D. dissertation, Institute of Animal Breeding and Husbandry University of Hohenheim, Stuttgart. pp: 7-18.

۲۲. **Ocak, N.; Erener, F.; Burak, A.K.; Sungu, M.; Altop, A. and Ozmen, A., 2008.** Performance of broilers feed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. Czech Journal of Animal Science. Vol. 53, No. 4, pp: 169-175.

۲۳. **SAS Institute Inc. 2004.** SAS. STAT User's Guide: Version 9. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.

۲۴. **Schroder, K., 2004.** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. Journal of Librarianship. Vol. 75, No. 2, pp:163-169.

۲۵. **Sean, CA.; Xing, Z.; Lia, J. and Carol, J.C., 2009.** Immune-related gene expression in response to H11N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. Molecular Immunology. Vol. 46, pp: 1744-1749.

۲۶. **Sijben, J.W.; Klasing, K.C.; Schrama, J.W.; Parmentier, H.K.; Van der Poel, J.J.; Savelkoul, H.F. and Kaiser, P., 2003.** Early in vivo cytokine genes expression in chickens after challenge with Salmonella typhimurium lipopolysaccharide and modulation by dietary n-3 poly unsaturated fatty acids. Dev Comp Immunol. Vol. 27, No. 6-7, pp: 611-619.

۲۷. **Singh, R.; Jain, P.; Pandey, N.K.; Saxena, V.K.; Saxena, M.; Singh, K.B.; Ahmed, K.A. and singh, R.P., 2012.** Cytokines expression and nitric oxide production under Induced Infection to Salmonella Typhimurium in Chicken Lines Divergently Selected for Cutaneous Hypersensitivity. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 25, No. 7, pp: 1038-1044.

۲۸. **Windisch, W.; Shedle, K. and Kroismayr, A., 2008.** Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J Anim Sci. Vol. 86, pp: 140-148.