DOI: 10.22055/IVJ.2019.154392.2084
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.5.8

بررسی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ویتامین E، عصاره‌ی گیاه خرفه و پسته‌ی وحشی تحت استرس گرمایی

مولود ربیعه[۱]، هدایت‌الله روشنفکر[۲]، محمود نظری[۳]* و محمدرضا قربانی[۴]

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[۴] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۴

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی اثر عصاره‌ی گیاهان خرفه، پسته‌ی وحشی و ویتامین E بر بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز) در جوجه‌های گوشتی تحت استرس گرمایی اجرا گردید. بدین منظور از ۲۰۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی سویه‌ی تجاری راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصافی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد. پنج تیمار آزمایشی عبارت بودند از: ۱- جیره‌ی شاهد (جیره‌ی پایه بدون هیچ‌گونه افزودنی)، ۲- جیره‌ی پایه به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E، ۳- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی پسته‌ی وحشی، ۴- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی خرفه، ۵- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی خرفه بود. در انتهای آزمایش دو مرغ از هر تکرار کشتار شده و کبد آن‌ها سریعاً جدا گردید و به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید. بیان ژن‌های آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به روش Real-time qPCR ارزیابی شد. در این روش ژن بتااکتین به عنوان ژن خانگی (منبع) جهت نرمال نمودن داده‌ها استفاده شده است. نتایج نشان دهنده‌ی این است که بیان ژن‌های آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز بین تیمارها اختلاف معنی‌داری دارند. همچنین در بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، بیش‌ترین میزان را تیمار ۵ داشت. البته بیان این ژن‌ها در سایر تیمارها (تیمار ۲ و ۳ و ۴) نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد. بنابراین نتایج نشان داد که ترکیب عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و گیاه خرفه در کنار هم می‌تواند تأثیر به سزایی بر بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در شرایط استرس گرمایی داشته باشد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش گرمایی، جوجه‌های گوشتی

مقدمه

استرس گرمایی به عنوان یک مشکل جدی در پرورش صنعتی طیور تلقی می‌شود نیازهای اسیدهای آمینه و همچنین تغییر ترکیب لاشه و در نهایت کاهش عملکرد شده که از این طریق منجر به زیان‌های اقتصادی قابل توجهی در صنعت

*نویسنده مسئول : محمود نظری، استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
E-mail: m.nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

طیور می‌شود (Salabi et al, 2011). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که در نتیجه‌ی دمای بالای محیط تنش اکسیداتیو اتفاق می‌افتد که بایستی مد نظر قرار گیرد (Prieto and Campo, 2010). مشخص شده است که تنش گرمایی باعث تولید انواع اکسیژن فعال می‌گردد که باعث آسیب‌های اکسیداتیو نظیر پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئوئیک می‌گردد (Mujahid et al. 2007). در جوجه‌های گوشتی نیز آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از دمای بالای محیط توسط محققین مختلف گزارش شده است (Mujahid et al. 2007; Lin et al. 2008).

موجودات زنده برای مقاومت در برابر تنش‌های اکسیداتیو نظیر تنش‌های سرمایی، گرمایی و تزریق مواد شیمیایی مثل دگزامتازون، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ترکیبی دارند. این سیستم شامل بخش آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی (گلوتاتیون، پلی‌فنل‌ها، کاروتنوئیدها، پلی‌آمین‌ها، فلاونوئیدها، ویتامین E، ویتامین C و کوانزیم Q) و بخش آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز) است. آنتی‌اکسیدان ماده‌ای است که اکسیداسیون مواد قابل اکسید شدن را مهار کرده یا به تأخیر می‌اندازد. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی شامل برداشت اکسیژن یا کاهش غلظت موضعی اکسیژن، برداشت یون‌های فلزی کاتالیتیک مانند Cu2+ و Fe2+، برداشت گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید (O2) و پراکسید هیدروژن (H2O2)، قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌ای عمل نمایند (Halliwell, 2011).

بعضی از این آنتی‌اکسیدان‌ها را موجودات زنده سنتز می‌کنند، در حالی که بعضی دیگر باید از طریق جیره تأمین شوند. از جمله عوامل تغذیه‌ای مؤثر می‌توان به افزودن ویتامین‌ها، مواد معدنی، افزودنی‌های شیمیایی و افزودنی‌های فیتوژنیکی اشاره کرد، در واقع به این عوامل تغذیه‌ای افزودنی‌های خوراک گفته می‌شود. این محصولات جهت افزایش عملکرد از طریق بهبود بهره‌گیری از غذا، حفظ سلامت بدن و تخفیف اثر استرس‌های محیطی و نیز پیش‌گیری از عفونت دستگاه تنفس به کار گرفته می‌شوند (Khosravi Nia and Razani, 2009).

یکی از آنزیم‌های دفاعی که تحت تنش تولید می‌شود، سوپراکسیددیسموتاز است. این آنتی‌اکسیدان یک آنزیم فلزی (متالوآنزیم) است که یون سوپراکسید را تجزیه می‌کند. سوپراکسید به عنوان یکی از گونه‌های اصلی اکسیژن واکنش‌گر در سلول شناخته شده است که سبب تغییر ماهیت آنزیم‌ها، اکسیداسیون چربی‌ها و تخریب DNA می‌شود. سوپر اکسید دیسموتاز باعث تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی می‌شود. سوپراکسید دیسموتاز اولین ماده‌ی تولید شده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین می‌برد. بنابراین سوپراکسید دیسموتاز خط اول دفاع در مقابل رادیکال‌های آزاد به حساب می‌آید (Alcher et al. 2002). آنزیم کاتالاز از دسته‌ی پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود و یکی از آنزیم‌های دفاعی مؤثر است در موجودات زنده تحت تنش تولید می‌شود. کاتالاز هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده‌ی پراکسید هیدروژن در محیط زیاد باشد و سلول را از اثرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. این آنزیم با اثر مستقیم بر پراکسید هیدروژن، سبب کاهش اثرهای سمی آن می‌شود (Garratt et al. 2002).

ویتامین E در بدن به عنوان مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان فعال موجود در بخش چربی غشاهای سلولی می‌باشد. به همین دلیل نتایج برخی از تحقیقات اخیر نشان داده که تغذیه‌ی جوجه‌ها با سطوح بالای ویتامین E می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی و همچنین حفاظت بسیاری از بافت‌های بدن در برابر فشارهای اکسیداتیو به ویژه در شرایط تنش گرمایی شود (Gheysari et al. 2003). بعضی مواد غذایی سرشار از آنتی‌کسیدان هستند که از آن جمله پسته‌ی وحشی (*Pistacia atlantica*) و خرفه (*Portulaca oleracea.*) است. پسته‌ی وحشی درختی از خانواده‌ی Anacardiaceae، می‌باشد و خاستگاه آن را حوزه‌ی مدیترانه و خاورمیانه می‌دانند (Mozaffarian, 2005) مشخص شده است که بنه می‌تواند

به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی قوی در صنایع غذایی و دارویی استفاده شود (Hatamnia, 2013).

از دیگر گیاهان استفاده شده در مناطق گرمسیری خرفه می‌باشد. خرفه یا پرپین گیاهی یک ساله که نام انگلیسی آن Purslane است (Hosseini et al. 2013). به علت دارا بودن ارزش غذایی بالا و خواص آنتی‌اکسیدانی به عنوان قدرت غذایی آینده معرفی شده است (Dkhil et al. 2011). خرفه منبع غنی از ملاتونین به شمار می‌رود. ملاتونین ویژگی‌های منحصر به فرد بی‌شماری از جمله پاکسازی مستقیم رادیکال‌های آزاد و نیز تحریک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را دارد (Rodriguez et al. 2004).

با توجه به مطالب گفته شده مشخص می‌گردد که پرندگان در کشورهای واقع در مناطق گرمسیری با تنش‌های حرارتی مواجه هستند که باعث ایجاد ضررهای اقتصادی به مرغداران می‌گردد. مطالعات متعددی در رابطه با نقش مفید ویتامین E در تنش‌های گرمایی به انجام رسیده ولی مطالعات محدودی در رابطه با اثرات استفاده از گیاهان دارویی در تنش گرمایی وجود دارد. در این مطالعه سعی شده تا اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد تنشی گیاهان پسته‌ی وحشی و خرفه بر روی بیان ژن‌های مفیدی همچون آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در جوجه‌های گوشتی در معرض تنش گرمایی به کمک روش ریل تایم qPCR مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

این پژوهش در فصل بهار (ماه‌های فروردین و اردیبهشت) در ایستگاه دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان با استفاده از ۲۰۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی سویه‌ی راس ۳۰۸ (مخلوطی از هر دو جنس) صورت گرفت. جوجه‌ها به مدت ۴۲ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی به ۲۰ گروه آزمایشی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تقسیم‌بندی شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- جیره‌ی شاهد (جیره‌ی پایه بدون هیچ گونه افزودنی)، ۲- جیره‌ی پایه به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E ، ۳- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی برگ پسته‌ی وحشی، ۴- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی خرفه، ۵- جیره‌ی پایه به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی خرفه بودند. جدول ترکیب مواد خوراکی جیره‌ها در Table 1 نشان داده شده است.

برگ پسته‌ی وحشی از ارتفاعات شهرستان باغملک واقع در استان خوزستان جمع‌آوری و در سایه خشک و سپس پودر گردید. گیاه خرفه مورد استفاده نیز که در مرحله‌ی گلدهی قرار داشت از کشاورزان محلی تهیه و بخش‌های قابل استفاده آن (برگ و ساقه‌های نرم آن) در سایه خشک و سپس آسیاب گردید. برای تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی پودرهای مورد نظر، مقدار ۲ کیلوگرم از هر کدام از پودرها را در ۱۰ لیتر اتانول ۸۰ درصد، به مدت ۷۲ ساعت خیسانده و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس عصاره‌ها توسط کاغذ صافی فیلتر شده و جهت حذف حلال از دستگاه روتاری استفاده گردید (Ghorbani et al. 2014).

تنش حرارتی بر اساس روش Hashemi و همکاران سال ۲۰۰۶ اعمال شد. برای اعمال تنش گرمایی از روز ۲۲ تا روز ۴۲ جوجه‌ها روزانه به مدت ۸ الی ۱۰ ساعت (از ساعت ۱۰ صبح تا ۶ بعد از ظهر) در دمای ۳۲ الی ۳۸ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. در انتهای آزمایش مرغ‌ها کشتار شده و کبد آن‌ها در ازت مایع نگهداری و به سردخانه منتقل شد و در دمای ۸۰- نگهداری گردید.

در این پژوهش، استخراج RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کبد با استفاده از کیت استخراج GeneAll Hybrid-r mini محصول شرکت (GeneAll-کره جنوبی) انجام شد. نمونه‌ها تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، نگهداری شدند. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ترمو، آمریکا) محاسبه گردید و

چنانچه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بالای ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند. برای ساخت cDNA، از کیت HyperScript محصول شرکت (GeneAll–کره جنوبی) استفاده گردید. سنتز آغازگر برای کمیت سنجی با واکنش زنجیرهای پلی‌مراز برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از شماره‌ی دسترسی با ارسال به شرکت تکاپوزیست انجام شد. توالی، شماره دسترسی به ژن‌های مورد نظر و خصوصیات آغازگر ژن اختصاصی در Table 2 ارائه شده است.

Table 1. Ingredient composition of the experimental diets (%)

Ingredients (%)	Stater Diet (1-21 days)	Grower Diet (22-42 days)
Corn	55.20	60.81
Soybean meal (44% crude protein)	37.47	31.60
Soybean oil	3.00	3.60
Di-calcium phosphate	1.60	1.50
Oyster shell	1.42	1.13
Coccidio Acetate	0.05	0.05
Sodium bicarbonate	0.23	0.23
Salt	0.30	0.23
L-lysine hydrochloride	0.00	0.11
DL-Methionine	0.23	0.24
Vitamin premix1	0.25	0.25
Mineral premix2	0.25	0.25
Calculated analysis		
Metabolizable energy (kcal kg^{-1})	2969.20	3086.91
Crude protein (%)	21.30	19.35
Calcium (%)	1.00	0.85
Available phosphorus (%)	0.45	0.43

[1]Vitamin premix provided the following per kilogram of diet: vitamin A: 22,500 IU; vitmin D3: 5000 IU; vitamin E: 72.00 mg; vitamin K3: 5.00 mg; vitamin B1: 4.30 mg; vitamin B2: 16.50 mg; vitamin B12: 0.04 mg.

[2] Mineral premix provided the following per kilogram of diet: Mn: 56.00 mg; Fe: 20.00 mg; Zn: 50.00; Cu: 10.00 mg; I: 0.80 mg; Co: 0.35 mg.

Table 2- The sequence and characteristics of the primer used in this study

Gene name	Primer sequence	Gene Bank-ID	Anealing Temperature (ºC)	Amplicon Size (bp)
Superoxide dismutase (SOD)	F: 5'-CTTCGAGGCGGGCTACTG-3'	NM_205064.1	58	122
	R: 5'-AGAGAGGCGGGCTACTG-3'			
Catalase (CAT)	F: 5'-CCAACAACCCAGAGACCTGT-3'	NM_001031215.1	61	245
	R: 5'-GGAGCTTCACACGAACATGA-3'			
β-actin	F:5 TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3	NM_205518	59	150
	R: 5 TTGGGACAATACCGTGTTCAT-3			

برای انجام تکنیک ریل تایم qPCR از دستگاه Step one plus ساخت شرکت Applied Biosystem آمریکا استفاده شد. واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از RealQ Plus 2x Master Mix ساخت شرکت آمپلیکون کانادا صورت گرفت. تکنیک PCR طبق پروتکل Table 3 در ۴۰ سیکل انجام شد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در

این پژوهش روش ΔΔCT (آستانه‌ی مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن بتا اکتین بود. در روش مقایسه‌ی نسبی تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقابل نمونه‌ی کنترل با فرمول: $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام گردید (Pfaffl et al. 2002). بررسی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS ۹/۱ و آزمون دانکن انجام شد.

Table 3. Real- time qPCR protocol

Cycles	Temperature (ºC)	Time	Number of cycle	Description
First cycle	95	10 min	1 X	Activation
	95	15 s	40 X	denaturation
Second cycle	59-60-61 (depend on related gene)	30 s		annealing
	72	30 s		extension
Third cycle	65-95	10 s	51 X	Melting curve preparation

نتایج

پس از استخراج RNA به منظور اندازه‌گیری میزان غلظت RNA استخراج شده و میزان خلوص آن، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از نانودراپ نشان داد که کیفیت RNA های استخراج شده جهت آزمایشات ریل تایم qPCR بسیار مناسب است. واکنش PCR جهت بررسی خصوصیات دمایی و اختصاصی بودن پرایمرها اجرا گردید.

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR برای ژن‌های بتااکتین، آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در Fig 1 نشان داده شده است. پس از تأیید تکثیر قطعات مورد نظر، تکنیک ریل تایم qPCR جهت بررسی بیان ژن‌های موردنظر اجرا گردید.

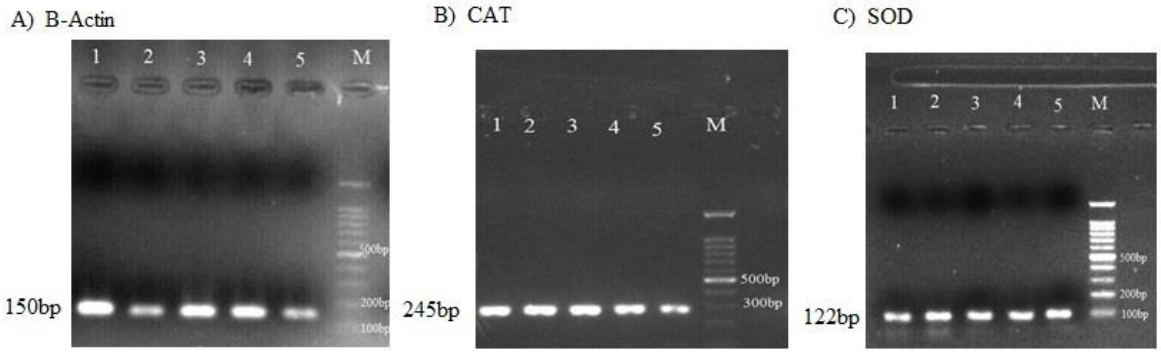

Fig. 1: A sample of electrophoresis of PCR products for (A) B-actin (B) CAT (C) SOD on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp, Line 1: Control, Line 2: Vitamin E, line 3: Wild pistachio, Line 4: Purslane, Line 5: Wild pistachio + purslane

اثر تیمارها بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی کبد در Table 4 آورده شده است. اعداد داخل جدول براساس روش واحد اختیاری (Arbitrary unit) ارائه شده است (Olesen, 1995). در این روش میزان بیان گروه کنترل ۱ در نظر گرفته می‌شود و بقیه‌ی تیمارها نسبت به آن سنجیده می‌شود. بیان ژن آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در گروه تغذیه شده با ویتامین E ، گروه تغذیه شده با عصاره‌ی پسته‌ی وحشی، گروه تغذیه شده با گیاه خرفه و

گروه تغذیه شده با ترکیبی از عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه نسبت به کنترل افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (P< ۰/۰۱). در همه‌ی گروه‌ها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بیش-ترین تفاوت معنی‌دار مربوط به ترکیب عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه می‌باشد که با سایر گروه‌ها (T4 و T1, T2, T3) نیز تفاوت معنی‌دار دارد. طبق Table 4 میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه تغذیه شده با ویتامین E برابر با ۱/۲۱، در گروه تغذیه شده عصاره‌ی پسته‌ی وحشی ۱/۵۷، در گروه تغذیه شده با گیاه خرفه ۱/۴ و در گروه تغذیه شده با ترکیبی از عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه ۳ واحد نسبت به میانگین تغییرات کنترل که برای همه‌ی تیمارها ۱ در نظر گرفته شد، افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱). در همه‌ی گروه‌ها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار مربوط به ترکیب عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه می‌باشد که با سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌دار داشت.

Table 4- Effects of different treatments on Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) gene expression in broiler chickens under heat stress condition

	Treatments				
Gene name	Control (T1)	vitamin E (T2)	Wild pistachio (T3)	Purslane (T4)	Wild pistachio + purslane (T5)
Superoxide dismutase (SOD)	1.00 [c]	2.2133 [b]	2.5733 [b]	2.4033 [b]	4.0033 [a]
Catalase (CAT)	1.00 [c]	1.8133 [b]	2.4933 [b]	2.2000 [b]	3.9100 [a]

The amount of mRNAs was normalized to the amount Beta actin mRNA. Different letters superscripts (a, b and c) in each row indicates a significant difference between the treatments (P< 0.01)

میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم کاتالاز در گروه تغذیه شده با ویتامین E برابر با ۰/۸۱ ، در گروه تغذیه شده عصاره‌ی پسته‌ی وحشی ۱/۴۹، در گروه تغذیه شده با گیاه خرفه ۱/۲ و در گروه تغذیه شده با ترکیبی از عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه ۲/۹۱ واحد نسبت به میانگین تغییرات کنترل که برای همه‌ی تیمارها ۱ در نظر گرفته شد، افزایش یافته است و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۱). در همه‌ی گروه‌ها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بیش‌ترین تفاوت معنی‌دار مربوط به ترکیب عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه می‌باشد که با سایر گروه‌ها (T4 و T1, T2, T3) نیز تفاوت معنی‌دار دارد.

بحث

تنش گرمایی در جوجه‌های گوشتی تولید رادیکال سوپراکسید و اکسیژن واکنشگر (ROS) را در بدن افزایش می‌دهد (Mujahid et al. 2006). در محیط‌های اکسیداتیو، تولید رادیکال آزاد یک فرایند طبیعی محسوب می‌شود. اغلب افزودنی‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قادرند با بهبود پایداری اکسیداتیو، عمر نگهداری آن‌ها را افزایش دهند. این ترکیبات ممکن است از طریق تحریک مستقیم سیستم ایمنی، مقاومت پرنده را در برابر بیماری‌ها بهبود بخشند (Durape, 2007).

در شرایط تنش گرمایی، سوپراکسیددیسموتاز یکی از آنزیم‌های مهم برای مقابله با پراکسیداسیون چربی‌های غشاء است و تولید رایکال‌های آزاد مانند O2 و HO را در خون و بافت‌ها کاهش می‌دهد. آنتی‌اکسیدان‌ها، غلظت این آنزیم را در خون جوجه‌های تحت تنش افزایش می‌دهند (Kucuk et al. 2003). سوپراکسیددیسموتاز به همراه گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در دفاع آنتی‌اکسیدانی جوجه‌های تحت تنش اهمیت زیادی دارد (Altan et al. 2003). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند

سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) در جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی در کوتاه مدت جهت محافظت سلول از پیامدهای منفی بیش از حد رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است (Lin et al. 2006).

تحقیقات زیادی در مورد به کارگیری گیاهان دارویی در جیره طیور جهت غلبه بر اثرات مضر تنش حرارتی گزارش شده است (Raeisi et al. 2015; Bayati et al. 2018; Zamzami et al. 2015; Ghorbani et al. 2014; Shirali et al. 2015). نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد. تحقیقات نشان داد به هنگام استفاده از روغن‌های ضروری مرزنجوش و زردچوبه در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی (۳۱ روزگی)، میزان بیان ژن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم کاتالاز در قلب و کلیه افزایش و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کبد، کلیه و قلب افزایش یافته است (Akbararian et al. 2014). همچنین نشان داده شده است که افزودنی‌های گیاهی همچون بتایین می‌تواند بیان ژن‌های اسیدچرب سنتاز و مالیک آنزیم را تحت تأثیر قرار دهد (Radpoor et al. 2017). نتایج حاصل از آزمایش Vakili و Zakizadeh در سال ۲۰۱۴ نشان داد که استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره‌ی خرفه در جوجه خروس‌های گوشتی سویه‌ی راس سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن PNOC و افزایش غیر معنی‌دار بیان ژن NPY گردید، لذا می‌توان عصاره‌ی خرفه را در افزایش بیان ژن‌های نوروپپتیدهای افزاینده اشتها مؤثر دانست.

استفاده از سطوح ۱ و ۲ درصد پودر خرفه در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی نشان داد که فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز خون در جوجه‌های تغذیه شده با ۲ درصد پودر خرفه ۲۷/۷ درصد بیش‌تر از گروه شاهد بود. در مطالعه‌ی این محققین غلظت مالون دی‌آلدهید به هنگام استفاده از سطوح مختلف پودر خرفه کاهش یافته بود. مالون‌دی‌آلدهید فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است و وسعت پراکسیداسیون لیپیدها توسط انواع اکسیژن فعال را از روی سطوح مالون‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری می‌کنند (Ghorbani et al. 2013). محققین معتقدند خرفه حاوی ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانی نظیر ملاتونین و گلوتاتیون است که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Dkhil et al. 2011; Simopoulos et al. 2005).

همچنین گزارش شده که به هنگام استفاده از سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد عصاره‌ی برگ پسته‌ی وحشی در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، غلظت مواد واکنش‌پذیر با تیوباربیتوریک اسید گوشت نگهداری شده در فریزر کاهش و ظرفیت نگهداری آب آن افزایش یافت. این محققین معتقد بودند که به علت حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (فنلی) در عصاره‌ی برگ پسته‌ی وحشی، از اکسیداسیون غشای سلولی ممانعت به عمل آمده است. پس ساختار غشای حفظ شده و ظرفیت نگهداری آب در بافت گوشت بالا رفته است. همچنین غلظت مواد واکنش‌پذیر با تیوباربیتوریک اسید که بیان‌گر غلظت مالون‌دی‌آلدهید است کاهش یافته که دلالت بر خواص آنتی‌اکسیدانی بالای برگ بنه دارد (Kordzangeneh et al. 2018).

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق Ordouny و همکاران (۲۰۱۷)، برگ پسته‌ی وحشی می‌تواند به عنوان یک افزودنی گیاهی با خاصیت کاهندگی میزان آنزیم‌های کبدی و همچنین کاهش تری‌گلیسرید و LDL کلسترول در جیره‌ی طیور مورد استفاده قرار گیرد.

به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، افزودن عصاره‌ی پسته‌ی وحشی، عصاره‌ی خرفه و به خصوص مخلوطی از این دو به جیره‌ی جوجه‌های گوشتی بر بیان ژن‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تأثیر معنی‌داری داشت. مخلوط عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و عصاره‌ی خرفه بیش‌ترین میزان بیان ژن را شامل شد.

بنابراین با استفاده همزمان عصاره‌ی پسته‌ی وحشی و خرفه که سبب افزایش بیان ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در جگر مرغ می‌گردد می‌توان اثرات استرس اکسیداتیو را کاهش داد. این گیاهان دارویی با تأثیر آنتی‌اکسیدانی خود توانستند بر شرایط بد تنش گرمایی غلبه

کرده و تأثیرات منفی تنش گرمایی را که باعث القای بیان بیان ژن‌های آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود را کاهش دهند. در نتیجه با استفاده از این گیاهان شاید بتوانیم از آسیب سلولی در این شرایط پیش‌گیری و هم از عوامل منفی بعد از آن جلوگیری کنیم و بر این اساس استفاده از گیاهان دارویی برای بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی در برابر تغییرات ناشی از استرس حرارتی در جوجه‌های گوشتی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه‌ی این تحقیق را تأمین نمودند تشکر به عمل می‌آید. همچنین از آقای مهندس حسینی کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه که در انجام آزمایشات ریل تایم همکاری نمودند کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع

بدینوسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد توسط دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تأمین گردیده است.

منابع

Akbarian, A.; Michiels, J. A.; Golian, J.; Buyse, Y.; Wang, Y. and Smet. D. (2014). Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed Origanum compactum and Curcuma xanthorrhiza essential oils. *Poultry Science* 93:1930–1941

Alcher, R. G.; Erturk, N. and L. S. Heath (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53, 1331-1341.

Altan, O.; Pabuccuoglu, A.; Altan, A.; Konyalioglu S. and Bayraktar. H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broiler. J. Brit. *Poultry Science*. 44:545-550.

Bayati, S.; Salari, S.; Tatar, A.; Sari, M. and Mirzadeh, Kh. (2015). Effect of different levels of Salvia mirzayanii essential oil on performance, some blood and immunity parameters of broiler chickens under heat stress conditions. Animal Production Research, 6(4), 69-80 (In Persian).

Dkhil, M. A.; Moniem, A. E. A.; Al-Quraishy, S. and Saleh, R. A. (2011). Antioxidant effect of purslane (Portulaca oleracea) and its mechanism of action. Journal of *Medicinal Plants Research*, 5(9), 1589-1593.

Durape, N. M. (2007). Phytochemicals improve semen quality and fertility. Mortality, 3, 2-4b.

Garratt L.C.; Janagoudar B.S.; Lowe K.C.; Anthony P.; Bower J.B. and Devey M.R. (2002). Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. Free Radical Biology and Medicine, 33:502-511.

Gheysari, A.; Samee, A. and Pourreza, J. (2003). The Effects of Different Levels of Vitamins C, E and Fat on the Performance and Mortality Rate of Heat-Stressed Broiler Chickens. *Journal of Veterinary Research*, 58(2), 125-128. (In Persian)

Ghorbani, M. R.; Bojarpur, M.; Mayahi, V.; Fayazi, J.; Fatemi Tabatabaei, S. R. and Tabatabaei, S. (2014). Effect of purslane (Portulaca oleracea L.) on performance and carcass characteristic of broiler chickens. *Iranian Veterinary Journal*, *41*, 88-98. (In Persian).

Ghorbani, M. R.; Bojarpur, M.; Mayahi, V.; Fayazi, J.; Fatemi Tabatabaei, S. R. and Tabatabaei, S.et al. (2014). Effects of purslane extract on performance, immunity responses and cecal microbial population of broiler chickens. Spanish Journal of Agricultural Research. 12(4): 1094-1098 (In Persian).

Ghorbani, M. R.; Bojarpur, M,; Mayahi, M.; Fayazi, J.; Fatemi Tabatabaei, S. R. and Tabatabaei, S. (2013). Effect of Purslane (Portulaca oleracea L.) on blood lipid concentration and antioxidant status of broiler chickens. *Online Journal of Veterinary Research*, 17 (2): 54-63. (In Persian).

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants–quo vadis. Trends in pharmacological sciences, 32(3), 125-130.

Hashemi, R.; Dastar, B.; Jafari, A. Y. and Hassani, S. (2006). Effect of supplementing betaine on the performance of broilers fed different quantities of protein. *Journal of Agricultural Sciences and Agricultural Resources. Special Issue Animal Science*. 13(1), 81-90. (In Persian)

Hatamnia, A. A.; Abbaspour, N. and Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits. Food Chemistry, 145, 306-311.

Hosseini, E.; Frozanfar, M. and Payehdar, A. (2013). The effect of hydroalcoholic extract of purslane on serum concentration of esterogen, progesterone, prolactin and gonadotropins in mature female rats. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 15(5). (In Persian)

Khosravi, H. and Razani, K, (2009). New Ideas on Growth Stimulants in Poultry Nutrition. Compilation: Panda Aaron Kumar. Printing time: first. Publisher: Parvawaghaha. Pp: 176. (In Persian)

Kucuk, O.; Sahin, N. and Sahin, K. (2003). Supplemental zinc and vitamin A can alleviate negative effects of heat stress in broiler chickens. Biological trace element research, 94(3), 225-235.

Kordzangeneh, S.; Ghorbani, M. R.; Tatar, A.; Barzegar, H. (2018). Effect of different levels of wild pistachio extract on quality properties of broiler chicken meat. First National Conference on Agricultural and Environmental Sciences. Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran. (In Persian)

Lin, H.; Decuypere, E. and Buyse, J. (2008). Effect of thyroid hormones on the redox balance of broiler chickens. *Asian Australian Journal of Animal Sciences*, 21(6), 794.

Lin, H.; Jiao, H. C.; Buyse, J. and Decuypere, E. (2006). Strategies for preventing heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 62(1), 71-86.

Mozaffarian, V. (2005). Trees and shrubs of Iran. Printing time: first. Tehran: Farhang Moaser. Pp 21-22. (In Persian)

Mujahid, A.; Pumford, N. R.; Bottje, W.; Nakagawa, K.; Miyazawa, T.; Akiba, Y. and Toyomizu, M. (2007). Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *The Journal of Poultry Science*, 44(4), 439-445.

Mujahid, A.; Sato, K.; Akiba, Y.; and Toyomizu, M. (2006). Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poultry science*, 85(7), 1259-1265.

Olesen, H. (1995). Properties and units in the clinical laboratory sciences-I. Syntax and semantic rules (IUPAC-IFCC Recommendations 1995). Pure and applied chemistry, 67(8-9), 1563-1574.

Ordouny, P.; Mirzadeh, K.; Mohammadabadi, T.and Bojarpoor, M. (2017). Effect of different levels of wild pistachio leaves (Pistacia atlantica), on liver enzymes, blood parameters and performance indicators of broiler chickens. *Animal Production*, 19(3), 601-612. (In Persian).

Pfaffl, M. W.; Horgan, GW. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, pp.1-10

Prieto, J. L. and Campo, M. T. (2010). Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil: Lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poultry Science*. 89:2071–2077.

Radpoor, S.; Beigi Nassiri, M.T. Roshanfekr, H.A. and Nazari, M. (2016). Evaluation of a part of the dietary methionine substitution by betaine on fatty acid synthase gene expression in laying hens under heat stress. *Iranian Veterinary Journal*. 13 (1): 33-40 (In Persian).

Raeisi, M.; Safamehr, A.; Khodaei Ashan, S. and Habibi, R. (2015). Thyme (Thymus vulgaris L.) and Oregano (Oreganum vulgare L.) essential oils for broilers: effect on performance, antioxidant indices and blood biochemical parameters. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 27(105), 103-120 (In Persian).

Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V. and Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research, 36(1), 1-9.

Salabi, F.; Boojarpoor, M. Fayazi, J. Salari, S. Nazari, M. (2011). Evaluation of the effect of betaine substituted with methionine on yield, carcase quality and some blood parameters of broiler chicks in normal and thermal stress conditions. *Iranian Veterinary Journal*. 8 (1): 15-23 (In Persian).

Simopoulos, A. P.; Tan, D. X.; Manchester, L. C., & Reiter, R. J. (2005). Purslane: a plant source of omega-3 fatty acids and melatonin. *Journal of Pineal Research*, *39*(3), 331-332.

Shirali, M. A.; Salari, S.; Tabatabai Vakili, S.; Sari, M. and Jahanian, R. (2015). Effect of vitamin E and L-carnitine on growth performance, blood parameters and immunity of broiler chickens under thermal stress. *Animal Science (Research and Development)*, 29 (110), 115-128. (In Persian).

Vakili, R. and Zakizadeh, S. (2014). Comparison the mRNA Expression Levels of PNOC and NPY Genes in Broilers fed Purslane Seed Extract. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(4), 151-164 (In Persian).

Zamzami1, Z.; Mohammadi, M. and Roostaei-Ali Mehr, M. (2015). Effect of nettle (Urtica dioica) leaf powder on performance, carcass traits and immune responses in broilers. *Journal of Animal Sciences Researches*, 24(4), 51-63 (In Persian).

Received:20.11.2018

Accepted:01.10.2019

Vol. 17, No. 2, Summer, 2021 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2019.154392.2084
DOR: 20.1001.1.17356873.1400.17.2.5.8

Gene expression of antioxidant enzymes fed wild pistachio (*Pistachio atlantica*), purslane (*portulaca oleracea*) extract and vitamin E under in broiler chickens under heat stress condition

Molood Rabieh[1], Hedaiat allah Rooshanfekr[2], Mahmood Nazari[3*] and Mohamad Reza Ghorbani [4]

[1] MSc Graduated of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[2] Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[4] Associate, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received:20.11.2018 Accepted:01.10.2019

Abstract

This study was conducted to assess the gene expression of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in broiler chickens under heat stress. For this purpose, 200 Ross 308 broiler chicks in a completely randomized design with 5 treatments, 4 replicates and 10 chicks were used in each replicate. The treatments included: 1- control diet (base diet without any additives), 2- basal diet plus 200 mg / kg vitamin E, 3- basal diet plus 100 mg / kg of wild pistachio extract, 4- basal diet with 100 mg / kg of Common Purslane extract, 5- basal diet plus 100 mg / kg of wild pistachio extract and 100 mg / kg of Common Purslane extract. After 42 days, at the end of testing two chickens each replicate were slaughtered and their livers were excised quickly and transported with liquid nitrogen to the laboratory. The expression of the enzymes catalase and superoxide dismutase were evaluated by Real-time qPCR. In this way as beta-actin gene as housekeeping gene is used to normalize the data. The results indicate that the expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase, included the highest level in the 5 treatments. Moreover, the expression of these genes showed a significant increase compared to the control in other treatments (treatments 2, 3 and 4). Therefore, the results indicated that the combination of extracts of wild pistachio and purslane can be together to be great impact on gene expression of antioxidant enzyme than the other groups under heat stress condition.

Key words: Gene expression, Antioxidant enzymes, Broiler, Heat stress

[*]**Corresponding Author**: Mahmood Nazari, Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran
E-mail: m.nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).