



"مقاله پژوهشی"

اثر پودر میوه گیاه پنج انگشت بر بیان ژن GnRH هیپوتalamوس مرغان تخمگذار

راضیه صباحی^۱، محمود نظری^۲، محمد تقی بیگی نصیری^۳ و محمدرضا قربانی^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران
(نویسنده مسؤول: M.nazari@asnrukh.ac.ir)

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۱

صفحه: ۹۲ تا ۱۰۰

چکیده

هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها (GnRH) یک مولکول تنظیم‌کننده کلیدی در محور هیپوفیز-هیپوتalamوس است که رونویسی هورمون لوتنین کننده (LH) در هیپوفیز را القاء می‌کند. تحقیقات نشان داده که استروژن نقش مهمی در تنظیم GnRH ایفا می‌کند. همچنین آزمایشات اخیر نشان داده که گیاه پنج انگشت حاوی مقدار زیادی فیتواستروژن است. از این‌رو، در مطالعه حاضر به بررسی اثر پودر میوه گیاه پنج انگشت بر بیان ژن GnRH و LH در مرغان تخمگذار با استفاده از تکنیک Real time qPCR پرداخته شد. برای انجام این آزمایش از قطعه مرغ تخمگذار سویه تجاری‌های لاین (W-36) از سن ۷۲ تا ۸۰ روز استفاده شد. سه تیمار آزمایشی عبارت بودند از: ۱- جیره شاهد (جیره پایه بدون هیچ افزودنی)، ۲- جیره پایه به همراه ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت، ۳- جیره پایه به همراه ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت. در انتهای آزمایش یک مرغ از هر تکرار کشتار شد، هیپوتalamوس آن‌ها جدا و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس RNA استخراج شده و برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد بیان ژن GnRH در تیمار ۳ (جیره حاوی ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت) نسبت به شاهد و تیمار ۱ درصد افزایش معنی داری داشت ($p < 0.01$)، در حالی که افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت به میزان ۱ درصد تأثیر معنی داری بر بیان ژن GnRH نداشت ($p > 0.05$). علاوه بر این افزودن ۱ و ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت تأثیر معنی داری بر بیان ژن LH نداشت ($p > 0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت به میزان ۲ درصد نمی‌تواند بر محور هیپوفیز-هیپوتalamوس مرغ تخمگذار در سینین ۷۲ تا ۸۰ هفتگی تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، فیتواستروژن، گیاه پنج انگشت، GnRH

گلیکوبروتئینی اند که هر یک از دو زنجیره‌ی پیتیدی تشکیل شده‌اند. یک زنجیره‌ی مشترک آلفا با ۹۰ اسید‌آمینه و زنجیره‌ی بتا که ویژه‌ی هر هورمون می‌باشد. گنادوتروپین‌ها، آثاری چندگانه دارند که تنظیم رشد فولیکول‌های تخدمان، تخمکریزی و تنظیم تولید و ترشح هورمون‌های غدد جنسی از آن جمله هستند. بلوغ فولیکولی تخدمان به وسیله‌ی هورمون LH و FSH صورت می‌کیرد (۳۲). با افزایش سن از تولید و کیفیت تخم مرغ کاسته می‌شود. با شروع بلوغ جنسی در مرغ‌ها غلظت استروژن پلاسمای تدریج افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه هنسن و همکاران (۱۳) نشان داده که میزان استروژن در مرغ تخمگذار در سن ۷۰ هفتگی به سرعت نسبت به سن ۲۹ هفتگی (پیک تولید تخم مرغ) کاهش می‌یابد و باعث کاهش تولید و کیفیت تخم مرغ می‌شود. این موضوع ضرر اقتصادی زیادی به مرغداران وارد می‌کند. افزودن عصاره گیاهان دارای خاصیت فیتواستروژنی مثل رازیانه (۱۷) و عناصر معنی مثلاً روی (۳۵) می‌تواند جهت جلوگیری از این کاهش در انتهای دوره تولید مفید باشد. برای جلوگیری از این خسارت باید راه حلی یافته تا میزان استروژن را افزایش داد. با توجه به معاویت هورمون‌ها و مشکلات و اثرات منفی آن‌ها و این‌که گیاهان حاوی فیتواستروژن قادر اثرات منفی استروژن‌های صنعتی

مقدمه

مغز، عملکرد تولیدمثلی را از راه محور هیپوتalamوس-هیپوفیز- غدد جنسی (Hypothalamic-Pituitary-Gonadal=HPG) تنظیم می‌کند (۳۱). در بر جستگی میانی، هورمون GnRH به عروق خونی باب هیپوفیز تراوش شده و در آن جا از راه جریان خون به هیپوفیز قدامی منتقل می‌شود. در هیپوفیز قدامی، نوروهورمون GnRH بر سلول‌های گنادوتrop و اثر گذاشته و با کمک سایر هورمون‌ها از جمله استروئیدهای جنسی، ترشح گنادوتروپین‌ها یعنی هورمون لوتئینی (LH) و هورمون محرك فولیکولی (FSH) را تنظیم می‌کند (۹). گنادوتروپین‌ها از راه خون به غدد جنسی (تخدمان‌ها و بیضه‌ها) رسیده و در آن جا موجب تنظیم رشد فولیکول‌ها و تخمک‌گذاری در ماده‌ها و اسپرماتوژنر و بلوغ اسپرم در نرها می‌شوند (۱۶). تاکنون ۳ نوع GnRH در مغز مرغ مشاهده شده‌است. GnRH1 عامل اصلی هیپوفیزیوتروپیک در کنترل و ترشح گنادوتروپین‌ها می‌باشد. در حالی که GnRH2 به عنوان انتقال دهنده‌ی عصبی و GnRH3 به عنوان یک واسطه برای تنظیم و ترشح گنادوتروپین‌ها عمل می‌کند (۲۶). غده‌ی هیپوفیز قدامی، ۳ هورمون گنادوتروپین به نام‌های LH و FSH و پرولاکتین را ترشح می‌کند (۱۲). هورمون‌های LH و FSH

است (۲۹). این ترکیبات ساختار و عملکرد شبیه به استرادیول دارند اما اثر آن‌ها نسبت به استروژن ضعیفتر است (۲۳). شیاهت ساختمان این مواد با استروژن‌ها سبب گردیده که آن‌ها قادر باشند به گیرنده‌های استروژن متصل شوند و انواع اثرات استروژنی را اعمال کنند (۴). گیاه پنج‌انگشت به عنوان یک گیاه فیتواستروژن دارای خواص دارویی است و ترکیبات موجود در آن به عنوان جایگزین استروژن‌های مصنوعی در کنترل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد در موش به کار رفته است (۲۰). تاکنون تحقیقات زیادی در مورد کاربردهای دارویی گیاه پنج‌انگشت برای انسان (۳۴) موش (۲۱,۳) و ماهی (۳۳,۷) انجام گرفته است. اما تاکنون مطالعه‌ی مکتبی در زمینه اثرات استفاده از پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر مرغ تخم‌گذار گزارش نگردیده است. لذا در این مطالعه به اثرات تقدیمی ای پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن GnRH هیپوتالاموس و LH هیپوفیز در مرغ تخم‌گذار با استفاده از تکنیک Real time-qPCR پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۹۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه تجاری های لاین (W-36) از سن ۷۲ تا ۸۰ هفتگی (در فاز دوم تولید) با میانگین وزن ۱۶۹۰/۸ گرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار، ۵ تکرار و ۶ قطعه مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه تیمار: جیره شاهد (جیره پایه بدون هیچ افزودنی)، جیره پایه به همراه ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت، جیره پایه به همراه ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بودند (جدول ۱).

می‌باشد، استفاده از استروژن‌های اگزوژن طبیعی مثل فیتواستروژن‌ها در صنعت دام و طیور رایج گردیده است. آزمایشات زیادی نشان داده است که گیاهان دارای فیتواستروژن می‌توانند بیان GnRH را تحت تأثیر قرار دهند. از مهم‌ترین فیتواستروژن‌ها می‌توان جنتئین (۱۹) و دایدزئین (۲۲) را نام برد که در جیره مرغ تخم‌گذار مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

گیاه پنج‌انگشت با نام علمی *Vitex Agnus Castus* متعلق به تیره نعنایان یا لامیاسه است که به مقدار زیاد حاوی فیتواستروژن است. گیاه پنج‌انگشت را گیاه زنان می‌نامند. پنج‌انگشت در پیشگیری از اختلالات قاعدگی، پریود دردناک، قطع غیر طبیعی پریود، اختلال در زمان و مقدار خونریزی، نارسایی زودرس تخدمان و عوارض حین یائسگی مؤثر می‌باشد (۱۴,۳۴). گیاه پنج‌انگشت نام‌های زیادی از جمله، پنج‌بنجه، بنگر و دل‌آشوب، درخت پاکدامنی و فلفل بیابانی دارد (۳۰). این گیاه به طور عمده در آسیای مرکزی و نقاط استوایی، اروپا و شمال آمریکا می‌روید (۱). در ایران این گیاه در نواحی مختلف مانند رشته‌کوه البرز، تهران، کرج، قم، خراسان، جنوب، غرب، بندرعباس و نواحی مختلف خلیج فارس یافت می‌شود (۱۰). گیاه پنج‌انگشت دارای استروئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب غیراشبع، ویتامین‌ها، رزین‌ها، نیترات‌پتانسیم، اسید‌اسپارتیک و اسید‌گلوتامیک است (۱۱). از میوه این گیاه نیز اسید لیتوئیک، ترکیبی با خاصیت استروژنی با توانایی اتصال به گیرنده‌های آلفا و بتای استروژنی را استخراج کرده‌اند که موجب بیان ژن‌های گیرنده از نوع بتا می‌گردد (۲۵). گیاه پنج‌انگشت به عنوان یکی از منابع غنی از فیتواستروژن‌ها شناخته شده

جدول ۱- ترکیب مواد خوارکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد)

Table 1. Food component and nutritional composition of experimental diets (in percent)

ماده خوارکی (درصد)	ذرت	شاهد	۱ درصد پنج‌انگشت	۲ درصد پنج‌انگشت
کتاجاله سوبا	۵۷/۶۰	۶۰/۱۹	۵۹/۰۰	۵۷/۰
پنج‌انگشت	۲۲/۳	۲۲/۴	۲۲/۳	۲۲/۳
روغن گیاهی	۲	.	۱/۰۰	۱/۰۰
دی کلسیم فسفات	۳/۷۴	۳/۰۵	۲/۳۴	۱/۶
پودر صدف	۱/۶	۱/۶	۶/۵	۶/۵
کربنات کلسیم	۶/۵	۵/۱۵	۵/۱۵	۵/۱۵
جوش شیرین	۵/۱۵	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
نمک طعام	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
آل-لیزین هیدروکلراید	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
دی-آل متبیونین	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینه	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مقاییر تامین شده				
انرژی قابل سوخت و ساز (kcal/kg)				
پروتئین خام (درصد)	۲۷۹۸	۲۸۰۲	۱۵/۰۱	۱۵/۰۳
کلسیم (درصد)			۴/۸۴	۴/۸۴
فسفر قابل دسترس (درصد)			۰/۴۱	۰/۴۱
آل-لیزین هیدروکلراید (درصد)			۰/۷۷	۰/۷۷
متیونین+سیستئن			۰/۶۳	۰/۶۴

* بهمازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۸۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین K3، ۱۴۷۷ میلی‌گرم ویتامین B1، ۴۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B2، ۷۸۴۰ میلی‌گرم ویتامین B3، ۳۴۶۵ میلی‌گرم ویتامین B5، ۱۱۰ میلی‌گرم ویتامین B6، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B9، ۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین B12، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B1، ۴۰۰ میلی‌گرم کولین کلرايد می‌باشد.

** بهمازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۷۴۴۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۷۵۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۶۷۵۶۴ میلی‌گرم روی، ۸۶۷ میلی‌گرم مس، ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم می‌باشد.

و ۴ میکرولیتر آب استریل و در مرحله دوم شامل، ۴ میکرولیتر ۵X Buffer، ۱ میکرولیتر DTT، ۰/۵ میکرولیتر M-Mlv RNase inhibitor، ۰/۵ میکرولیتر ۲ میکرولیتر dNTP و ۲ میکرولیتر آب استریل استفاده شد. پس از اتمام مرحله اول ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله دوم به محصول مرحله اول اضافه شد. برنامه حرارتی عبارتند از: مرحله اول ۵ دقیقه با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و مرحله دوم شامل ۶۰ دقیقه با دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد می باشد. به منظور بررسی تغییر در رونوشت ژن GnRH و LH از روش PCR در زمان واقعی (RT-qPCR) استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از مطالعه ردی و همکاران (۲۸) بدست آمده بود. توالی و خصوصیات پرایمرها در جدول ۲ ارائه شده است.

در پایان دوره آزمایش ۱ قطعه مرغ از هر تکرار کشتار شد و نمونه سر آنها سریعاً جدا گردید. سپس جمجمه را شکافته و هیپوتالاموس و هیپوفیز از سایر قسمت‌های مغز جدا شد و با تانک ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج RNA در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۸). استخراج RNA نمونه‌ها توسط روش کربیستو و همکاران (۶) انجام گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودرایپ (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000. USA) تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ۶۱ آگارز ۲ درصد در بافر ۰/۵x TBE استفاده شد. سنتر cDNA با استفاده از کیت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (تکاپوزیست) ساخته شد. اجزای سنتر cDNA، مرحله اول در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل، ۵ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر Oligo dt

جدول ۲- توالی و خصوصیات آغازگرهای رفت و برگشت استفاده شده در واکنش PCR

Table 2. The sequence and characteristics of the primers used in PCR reaction.

نُن‌ها	ژن	توالی پرایمر	دما اتصال	اندازه محصول
GnRH	ژن	F:5'-ATTTCCAGCGGGAAAGAGTTG-3' R:5'-TGGTTTGATGGTGTGTTG-3'	۶۲	۳۵۰
LH	ژن	F:5'-GTTGGTGCATGACCCCTT-3' R:5'-TGGTGGTCACAGCCATACAT-3'	۶۲	۱۹۴
Beta-Actin	ژن	F:5'-GAGGGAGGGTGGATCATAGA-3' R:5'-CCTCTGGGACCTCAACAAT-3'	۵۹	۱۵۰

به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ سیکل با دمای ۷۰-۹۵ درجه به مدت ۱۰ ثانیه برای تهیه نمودار ذوب می باشد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $\Delta\Delta CT$ (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن بتاکتین بود. (۲۴).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target (control-sample)}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref (control-sample)}}}}$$

در این رابطه E_{ref} و E_{target} به ترتیب بازدهی ژن مورد مطالعه و ژن مرجع می باشد. ΔCT حاصل تفرق CT (حد آستانه) ژن مورد مطالعه در نمونه از کنترل است. آنالیز سطح بیان ژن GnRH و LH با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و سپس آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد ($p < 0.05$) بررسی شد.

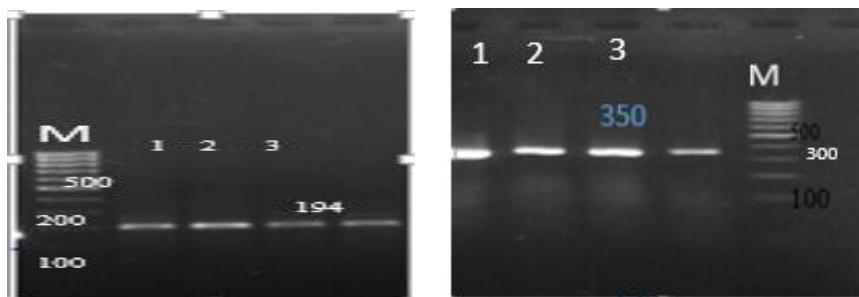
نتایج و بحث

استخراج RNA در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری میزان خلوص آن، توسط دستگاه نانودرایپ، میزان خلوص آن با نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج شده در این پژوهش بین ۱/۸-۲/۱ بود و همچنین غلظت RNA استخراج شده در حدود ۱۵۰۰ الی ۳۰۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. بررسی کیفیت RNA استخراج شده بر روی ۶۱ آگارز ۲ درصد منجر به ایجاد دو باند ۲۸S و ۱۸S شد که نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA بود. در تأیید صحت تکثیر ژن‌های LH و GnRH با استفاده از پرایمرهای طراحی شده پس از انجام PCR روی نمونه‌های cDNA بافت هیپوتالاموس و هیپوفیز، ژن GnRH منجر به ایجاد باند ۳۵۰ bp (شکل ۱)، ژن LH منجر به ایجاد باند ۱۹۴ bp

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad انجام شد. تکثیر قطعه ۳۵۰ برای ژن GnRH و ۱۹۴ برای ژن LH توسط واکنش PCR دستگاه ترمال سایکلر Rad بر اساس روش استاندارد انجام شد. تعداد سیکل‌های انجام واکنش PCR برای هر جفت پرایمر ۳۵ در نظر گرفته شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل، ۶/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از سنتر cDNA و ۱۲/۵ میکرولیتر Master 1.5 mix می باشند و برنامه حرارتی عبارت است از: یک مرحله واسرشتسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳ سیکل با دمای واسرشتسازی ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه و نگهداری در دمای ۴ درجه به مدت ۵ دقیقه می باشد. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ۶۱ آگارز ۱٪ و رنگ‌آمیزی آن با ماده سیف استین صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل بیان ژن با تکنیک RT-qPCR از دستگاه Step One Plus Real-Time PCR System شرکت ABI و کیت Real Q Plus 2xMasterMix Green (High ROX) ساخت شرکت سیناکلون استفاده شد. اجزای واکنش RT-qPCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل، ۲/۶ میکرولیتر cDNA، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر آب استریل، ۵ میکرولیتر کیت تجاری Real Q Plus 2x Master Mix Green (High ROX) برای تجزیه و تحلیل شامل: یک مرحله واسرشتسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۱۵ دقیقه، ۴ سیکل با دمای واسرشتسازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی گراد

یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان‌دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.

(شکل ۱) و باند ۱۵۰ bp برای ژن بتاکتین (شکل ۲) روی ژل آگارز گردید. طی انجام واکنش، دستگاه ریل تایم میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد (شکل ۳). برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها،



(LH)

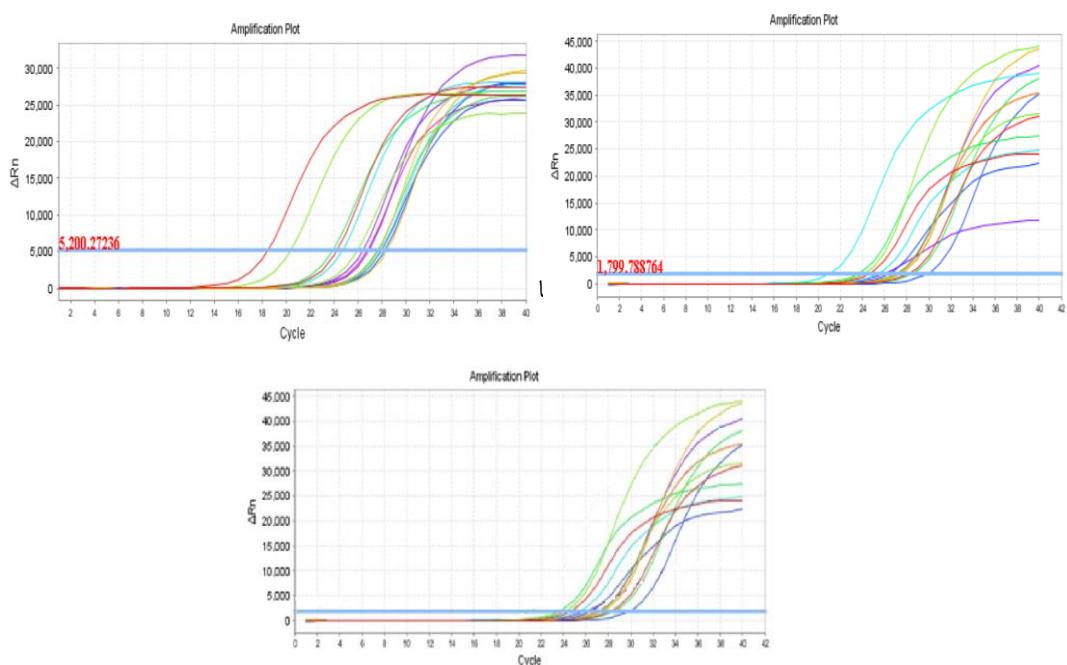
(GnRH)

شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژن: ژن GnRH ب: ژن LH چهارم: ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp.
Figure 1. Electrophoresis of PCR products for a) GnRH b) LH genes on the 2% Agarose gel. M: Molecular marker 100 bp.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR ژن Beta-Actin در ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp

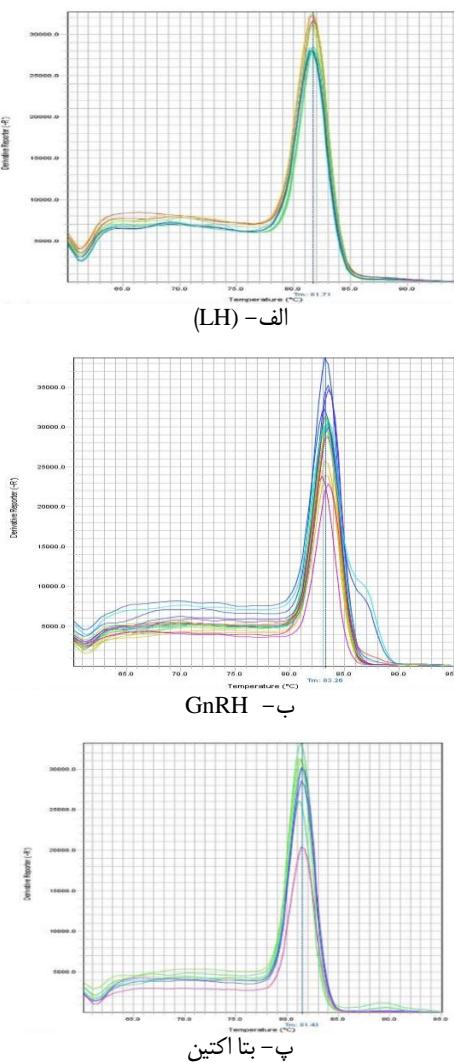
Figure 2. Electrophoresis of PCR products for Beta-Actin gene on the 2% Agarose gel. M: M: Molecular marker 100 bp.



شکل ۳- منحنی تکثیر استاندارد a: ژن LH ب: ژن GnRH پ: بتاکتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای مرغ تخم‌گذار
Figure 3. Standard amplification curve of a) LH b) GnRH c) Beta -Actin gene production using Real time PCR for laying hens

حالات دو رشته‌ای خارج می‌شود) واکنش ریل تایم این ژن‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۴).

منحنی ذوب ژن بتا اکتین، GnRH و LH اختصاصی بودن و دمای Tm محصول (دماهی) که در آن نیمی از محصول از



شکل ۴- منحنی ذوب محصول الف: ژن LH ب: ژن GnRH پ: بتا اکتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای مرغ تخمگذار
Figure 4. Melting curve of a) LH b) GnRH c) Beta -Actin gene production using Real time PCR for laying hens.

اثر تیمارها بر بیان ژن LH

جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که تیمارها بر بیان ژن LH اثر معنی‌داری نداشتند ($p > 0.05$). نتایج نرمال شده، نشان داد که میزان بیان ژن LH در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنچ انگشت برابر $1/2733$ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنچ انگشت $1/1$ برآورد شد که این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).

اثر تیمارها بر بیان ژن GnRH

جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که تیمارها بر بیان ژن GnRH اثر معنی‌داری داشتند ($p < 0.01$). نتایج نرمال شده، نشان داد که میزان بیان ژن GnRH در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنچ انگشت برابر $5/2067$ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنچ انگشت $1/3967$ برآورد شد که در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنچ انگشت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر پودر میوه گیاه پنچ انگشت بر بیان ژن GnRH هیپوталاموس مرغ تخمگذار
Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for Vitex Agnus-Castus fruit powder on hypothalamic GnRH gene expression in laying hens

خطا	تیمارها	منابع تغییرات	
درجه ازادی	مجموع مریعت	میانگین مریعت	سطح معنی‌داری
۲	۳۲/۳۶	۱۶/۱۸	.۰/۰۱۷
۶	۲/۳۵	۰/۷۲۶	

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس اثر پودر میوه گیاه پنج انگشت بر بیان ژن LH مرغ تخمگذار

تیمارها	خطا	منابع تغیرات	درجه آزادی	مجموع مربلات	میانگین مربلات	سطح معنی‌داری
۲	.۱۱۴۷	.۰/۵۷۳	.۰/۰۲۹	.۰/۱۶۲۲		
۶	.۰/۱۳۷۶					

جدول ۵- اثر پودر میوه گیاه پنج انگشت بر بیان ژن های GnRH و LH مرغ تخمگذار

Table 5. The Effect of Vitex Agnus Castus fruit powder on GnRH and LH genes expression in laying hens

تیمارها	گروه شاهد	سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت	سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج انگشت	حروف مشابه در ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0.05$)
بیان ژن LH	بیان ژن GnRH	^a	^b	
$1/1\pm 0/15^a$	$1/396\pm 0/85^b$			
$1/773\pm 0/15^a$	$5/206\pm 0/85^a$			

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت به میزان ۱ درصد نمی‌تواند تاثیری بر بیان ژن های GnRH و LH داشته باشد اما افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت به میزان ۲ درصد توانسته است بیان ژن LH را به میزان ۴/۲ واحد افزایش دهد. این در حالی است که این مقدار پودر میوه گیاه پنج انگشت تاثیری بر بیان ژن LH نداشته است. افزایش GnRH می‌بایستی سبب افزایش بیان LH می‌شود (۹) اما این اتفاق نیافتداده است. اگر افزایش GnRH سبب افزایش LH شده باشد بایستی اثر آن را در عملکرد و تولید و تولیدمیث مشاهده کرد. در مطالعه‌ای که محققین بر روی همین مرغان تخمگذار انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت اثری بر عملکرد و تولیدمیث و کیفیت تخم مرغ نداشته است (۸). پس به نظر می‌رسد که افزایش GnRH نتوانسته است سبب افزایش LH شود و بر عملکرد و تولید مرغ ها اثری نداشته است. شاید علت این امر بالا بودن سن مرغ ها (۲۲ تا ۸۰ هفتگی) و یا نامناسب بودن سطح پودر میوه گیاه پنج انگشت با مرحله تولید باشد.

به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر، افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت به جیره مرغ های تخمگذار بر بیان ژن GnRH تأثیر معنی‌داری داشت. سطح ۲ درصد از پودر میوه گیاه پنج انگشت بیشترین میزان بیان را در ژن GnRH شامل شد. در حالی که افزودن این مقدار نتوانسته سبب افزایش بیان LH شود لذا موضوع پیشنهاد می‌گردد از سطح بالاتری از پودر میوه پنج انگشت استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل تامین بودجه این پژوهش همکاری صمیمانه‌شان تشکر به عمل می‌آید.

مطالعات نشان داده‌اند که گیاه پنج انگشت خاصیت فیتواستروژنی دارد (۲۰). از این‌رو پژوهش حاضر به منظور بررسی خاصیت استروژنی این گیاه بر بیان ژن های GnRH و LH در مرغ تخمگذار صورت گرفت. فیتواستروژن‌ها تبدیل کننده هورمونی هستند که در شرایطی که سطح هورمون استروژن پایین باشد به عنوان یک آگونیست استروژن عمل نموده و اثرات شبه استروژنی ایجاد می‌کنند و در شرایط بالا رفتن سطح هورمون استروژن به عنوان یک آنتاگونیست استروژن در سلول‌های عصبی GnRH می‌شود (۱۵). آزمایشات زیادی نشان داده است که گیاهان دارای خواص فیتواستروژنی می‌توانند بیان GnRH را تحت تأثیر قرار دهند. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد کاربردهای دارویی گیاه پنج انگشت برای انسان (۲۰، ۳۴) موش (۳۳، ۷) و ماهی (۲۷، ۳۴) انجام گرفته است. اما تا کنون مطالعه‌ی مکتوبی در زمینه اثرات استفاده از پودر میوه گیاه پنج انگشت بر مرغ تخمگذار گزارش نگردیده است. اما گزارشاتی در زمینه استفاده از دیگر گیاهان دارای خواص فیتواستروژنی وجود دارد. از مهم‌ترین فیتواستروژن‌های مورد استفاده در مرغ تخمگذار می‌توان عصاره رازیانه، جستین و دایزین را نام برد. محققین نشان دادند که افزودن ۵۰ میلیگرم عصاره رازیانه در کیلوگرم چیره به همراه ویتامین D باعث بهبود عملکرد مرغ های مادر گوشته می‌شود (۱۷). در تحقیقی نشان داده شد که میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار جستین باعث افزایش بیان ژن GnRH و بهبود سطح سرمی استروژن و افزایش میزان تخمگذاری در مرغ های دچار سندروم کبد چرب می‌شود (۱۹). همچنین محققین نشان دادند که دایزین عملکرد مرغ تخمگذار را از جمله تولید تخم مرغ و بازده خوارک را افزایش می‌دهد (۵۳، ۲۲).

منابع

1. Arokiyaraj S., K. Perinbam, P. Agastian and R.M. Kumar. 2009. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*. International Journal of Green Pharmacy, 3(2): 162-164.
2. Ball, E. R., M.K. Caniglia, J.L. Wilcox, K.A. Overton, M.J. Burr, B.D. Wolfe and C.C. Wrenn. 2010. Effects of genistein in the maternal diet on reproductive development and spatial learning in male rats. Hormones and behavior, 57(3): 313-322.
3. Borrione, P., L. Di Luigi, N. Maffulli and F. Pigozzi. 2008. Herbal supplements: cause for concern? Journal of sports science and medicine, 7(4): 562.

4. Brebion, P., J.P. Belloc, M. Brioison and L. Elite. 1990. Ewe pretreated with a GnRH antagonist yield more usable embryos following FSH. In sixth meeting European association for embryo transfer, 12.
5. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*, 162: 156-159.
6. Christou, A., E.C. Georgiadou, P. Filippou, G.A. Manganaris and V. Fotopoulos. 2014. Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. *Gene*, 537(1): 169-173.
7. Enayat gholampour, T., V. Jafari, M.R. Imanpour and H. Kolangi Miandare. 2017. Investigation of expression of CYP19 (a) and reproduction in *Danio rerio* fed a diet enriched with *Vitex agnus castus* extract. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 4(3): 27-41 (In Persian).
8. Fathi Moghaddam, N., M.R. Ghorbani, S. Tabatabaie and A. Tatar. 2020. The effect of different levels of *Vitex agnus castus* fruit powder on performance, egg quality, some blood biochemical parameters, immunity response and some tibial bone characteristics in laying hens. Master thesis Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan (In Persian).
9. Fink, G. 2000. Neuroendocrine regulation of pituitary function. In *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Humana Press, Totowa, NJ, 107-133.
10. Ghahraman, A. 2003. Iranian cryophytes. Tehran: Tehran University Pub. 315 pp.
11. Ghosal, I. and S.B. Chakraborty. 2014. Effects of the aqueous leaf extract of *Basella alba* on sex reversal of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9(2): 162-164.
12. Hafez, A.S.A. and B. Hafez. 2013. Reproduction in farm animals. 7th edition. Blackwell publishing. 509 pp.
13. Hansen, K.K., R.J. Kittok, G. Sarath, C.F. Toombs, N. Caceres and M.M. Beck. 2003. Estrogen receptor- α population change with age in commercial laying hens. *Poultry Science*, 82: 1624-1629.
14. Jelodar, Gh.A. and E. Karami. 2014. Effect of hydroalcoholic extract of *Vitex agnus-castus* fruit on ovarian tissue changes in induced Polycystic Ovarian Syndrome in rat. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 15(3): 96-102 (In persian).
15. Kallo, I., J.A. Butler, M. Barkovics-Kallo, M.L. Goubillon and C.W. Coen. 2001. Oestrogen receptor β - immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *Journal of neuroendocrinology*, 13(9): 741-748.
16. Kauffman, A.S., M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton and M. Tena-Sempere, M. 2007 . Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, 148(4): 1774-1783.
17. Kazemi-Fard, M., H. Kermanshahi and M. Rezaei. 2013. Effect of Different Levels of Fennel Extract and Vitamin D3 on Performance, Hatchability and Immunity in Post Molted Broiler Breeders. *Research on Animal Production*, 4(2): 15-34 (In Persian)
18. Lal, P., P.J. Sharp, I.C. Dunn and R.T. Talbot. 1990. Absence of an effect of naloxone, an opioid antagonist, on luteinizing hormone release in vivo and luteinizing hormone-releasing hormone I release in vitro in intact, castrated, and food restricted cockerels. *Gen. Comp. Endocrinology*, 77: 239-245.
19. Lv, Z., K. Xing, G. Li, D. Liu and Y. Guo. 2018. Dietary genistein alleviates lipid metabolism disorder and inflammatory response in laying hens with fatty liver syndrome. *Frontiers in physiology*, 9.
20. Nasri, S., S. Oryan, A. Haeri Rohani, G.H. Amin and H. Yahyavi. 2004. The effects of vitex agnus castus L. extract on gonadotrophines and testosterone in male mice. *Iranian International Journal of Science*, 5(1): 25-31.
21. Nejati, Z. and S.E. Hossini. 2017. The effect of *Vitex agnus castus* alcoholic extract and Vitamin E on Serum Levels of Liver Enzymes in Rats. *Journal of Animal Biology*. Damghan Azad University, 9(2): 381-385 (In Persian)
22. Ni, Y., Q. Zhu, Z. Zhou, R. Grossmann, J. Chen and R. Zhao. 2007. Effect of dietary daidzein on egg production, shell quality, and gene expression of ER- α , GH-R, and IGF-IR in shell glands of laying hens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(17): 6997-7001.
23. Park, J.A., S.K. Ha, T.H. Kang, M.S. Oh, M.H. Cho, S.Y. Lee and S.Y. Kim. 2008. Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Life sciences*, 82(25-26): 1217-1223.
24. Pfaffl, M.W., G.H. Horgan and L. Dempfle. 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(9): 36.
25. Podlech, D. and K.H. Rechinger. 1986. Flora iranica akademische druch -u. verlagsansalt. Graz, 159-223.
26. Proudman, J.A., C.G. Scanes, S.A. Johannsen, L.R. Berghman and M.J. Camp. 2006. Comparison of the ability of the three endogenous GnRHs to stimulate release of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in chickens. *Domestic Animal Endocrinology*, 31: 141-153.

27. Ramezani, M., S. Nasri and H. Bahadoran. 2008. The effects of *Vitex agnus castus* total extract on spermatogenesis of Balb/C Mice. *Armaghane-Danesh*, 13(3): 35-44 (In Persian).
28. Reddy, I. J., C.G. David, S. Selvaraju, S. Mondal and G.R. Kiran. 2012. GnRH-1 mRNA, LH surges, steroid hormones, egg production, and intersequence pause days alter in birds exposed to longer wavelength of light in the later stages of production in *Gallus gallus domesticus*. *Tropical animal health and production*, 44(6): 1311-1317.
29. Sehmisch, S., J. Boeckhoff, J. Wille, D. Seidlova-Wuttke, T. Rack, M. Tezval, W. Wuttke, K. Stuermer and E. Stuermer. 2009. *Vitex agnus castus* as prophylaxis for osteopenia after orchidectomy in rats compared with estradiol and testosterone supplementation. *Phytotherapy Research: an International Journal devoted to Pharmacological and Toxicological evalution of natural product derivatives*, 23(6): 851-858.
30. Shoorideh Ziyaberi, M., A. Azadbakht, A. Zarifkar, A. Jafari and Sh. Hossienie. 2008. The Effect of *Vitex Agnus Castus* folio extract on serum prolactin concentration of female rats in gestation. *Iranian Journal of Biology* 20(1): 99-109 (In Persian).
31. Smith, J.T. 2008. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain research reviews*, 57(2): 288-298.
32. Squires, E.J. 2003. *Applied animal endocrinology*. First ED., CABI Publishing, London, UK.
33. Zamani, Sh., M. Sudagar, Sh. Dadgar, H. Adineh and A.A. Hajibeglou. 2018. Effects of *Vitex agnus-castus* extract on reproductive performance, growth and survival in *Xiphophorus helleri*. *Journal of Aquaculture Sciences*, 5(7): 23-29 (In Persian).
34. Zargari, A. 2011. *Medicinal plants*. vol. 37 Th edition, University of Tehran press, 733-748.
35. Soroush, Z., S. Salari, M. Sari, J. Fayazi and S. Tabatabaii. 2015. Effects of Different Levels of Zinc on Performance, Egg Quality Traits and Some Blood Parameters of Laying Hens. *Research on Animal Production*, 6(11): 19-27 (In Persian).
36. Zhao, R. Q., Y.C. Zhou, Y.D. Ni, L. Z. Lu, Z.R. Tao, W. H Chen and J. Chen. 2005. Effect of daidzein on egg-laying performance in Shaoxing duck breeders during different stages of the egg production cycle. *British Poultry Science*, 46(2): 175-181.

The Effect of *Vitex Agnuse Castus* Fruit Powder on Hypothalamic GnRH Gene Expression in Laying Hens

Razieh Sabahi¹, Mahmood Nazari², Mohammad Taghi Beigi Nassiri³ and Mohammad Reza Ghorbani⁴

1- M.Sc. Student of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
(Corresponding author: M.nazari@asnrukh.ac.ir)

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: February 19, 2020 Accepted: April 20, 2020

Abstract

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a key regulatory molecule of the hypothalamus–pituitary gonadal axis which induces transcription of luteinizing hormone (LH) from the anterior pituitary. Research has shown that estrogen plays an important role in regulating GnRH. Also, recent experiments indicated that *Vitex agnus-castus* (VAC) has high levels of phytoestrogen. Hence, this research was performed to investigate the effect of Vitex Agnuse Castus (VAC) fruit powder on GnRH and LH genes expression in laying hens using Real time qPCR technique. For this purpose, 90 Hy-line W-36 leghorn (at 72 to 80 weeks old) were used in a completely randomized design with 3 treatments, 5 replicates and 6 hens per replicate for 56 days as an experimental period. The three experimental treatments were: 1- control diet (basal diet without any additives), 2- basal diet plus 1% VAC fruit powder, 3- Basal diet plus 2% VAC fruit powder. At the end of the experiment one hens were slaughtered and their hypothalamus was rapidly separated and transferred to the laboratory with liquid nitrogen. Then, RNA was extracted and used for cDNA synthesis. Finally, GnRH gene expression was evaluated by Real-Time qPCR. The ANOVA results showed that GnRH gene expression was significantly increased in treatment 3 (diet containing 2% VAC) compared to the control and 1% VAC groups ($P < 0.01$). While, addition of 1% VAC fruit powder to diet had no significant effect on GnRH gene expression ($P > 0.05$). Furthermore, addition of 1 or 2 % VOC fruit powder had no significant effect on LH gene expression ($P > 0.05$). The results of this study showed that the addition of VOC fruit powder fruit powder up to 2% level could not affect the pituitary-hypothalamic axis of laying hens at 72 to 80 weeks old.

Keywords: GnRH, Gene expression, Phytoestrogen, *Vitex Agnuse Castus*