دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن GnRH هیپوتالاموس مرغان تخمگذار

راضیه صباحی[۱]، محمود نظری[۲]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۳] و محمدرضا قربانی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(نویسنده مسوول: M.nazari@asnrukh.ac.ir)
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، 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-هیپوتالاموس است که رونویسی هورمون لوتئینه 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 پنج‌انگشت حاوی مقدار زیادی فیتواستروژن است. از این‌رو، در مطالعه حاضر به بررسی اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن GnRH و LH در مرغان تخمگذار با استفاده از تکنیک Real time qPCR پرداخته شد. برای انجام این آزمایش از ۹۰ قطعه مرغ تخمگذار سویه تجاری‌های‌لاین (W-36) از سن ۷۲ تا ۸۰ هفتگی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار، ۵ تکرار و ٦ قطعه مرغ در هر تکرار به‌مدت ٥٦ روز استفاده شد. سه تیمار آزمایشی عبارت بودند از: ۱- جیره شاهد (جیره پایه بدون هیچ افزودنی)، ۲- جیره پایه به‌همراه ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت، ۳- جیره پایه به‌همراه ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت. در انتهای آزمایش یک مرغ از هر تکرار کشتار شد، هیپوتالاموس آن‌ها جدا و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس RNA استخراج شده و برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان‌داد بیان ژن GnRH در تیمار ۳ (جیره حاوی ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت) نسبت به شاهد و تیمار ۱ درصد افزایش معنی‌داری داشت (p <۰/۰۱)، در حالی‌که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت به‌میزان ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن GnRH نداشت (p > ۰/۰۵). علاوه براین افزودن ۱ و ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن LH نداشت (p > ۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان‌داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت به‌میزان ۲ درصد نمی‌تواند بر محور هیپوفیز-هیپوتالاموس مرغ تخمگذار در سنین ۷۲ تا ۸۰ هفتگی تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، فیتواستروژن، گیاه پنج‌انگشت، GnRH

مقدمه

مغز، عملکرد تولیدمثلی را از راه محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- غدد جنسی (Hypothalamic- Pitutary-Gonadal= HPG) تنظیم می‌کند (۳۱). در برجستگی میانی، هورمون GnRH به عروق خونی باب هیپوفیز تراوش شده و در آن‌جا از راه جریان خون به هیپوفیز قدامی منتقل می‌شود. در هیپوفیز قدامی، نوروهورمون GnRH بر سلول‌های گنادوتروپ اثر گذاشته و با کمک سایر هورمون‌ها از جمله استروئیدهای جنسی، ترشح گنادوتروپین‌ها یعنی هورمون لوتئینی (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH) را تنظیم می‌کند (۹). گنادوتروپین‌ها از راه خون به غدد جنسی (تخمدان‌ها و بیضه‌ها) رسیده و در آن‌جا موجب تنظیم رشد فولیکول‌ها و تخمک‌گذاری در ماده‌ها و اسپرماتوژنز 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 حالی‌که GnRH2 به‌عنوان انتقال دهنده‌ی عصبی و GnRH3 به‌عنوان 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 گلیکوپروتئینی‌اند که هر یک از دو زنجیره‌ی پپتیدی 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 تخمدان، تخمک‌ریزی و تنظیم تولید و ترشح هورمون‌های غدد جنسی از آن جمله هستند. بلوغ فولیکولی تخمدان به‌وسیله‌ی هورمون LH و FSH صورت می‌گیرد (۳۲).

با افزایش سن از تولید و کیفیت تخم مرغ کاسته می‌شود. با شروع بلوغ جنسی در مرغ ها غلظت استروژن پلاسما به‌تدریج افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه هنسن و همکاران (۱۳) نشان داده که میزان استروژن در مرغ تخمگذار در سن ۷۰ هفتگی به سرعت نسبت به سن۲۹ هفتگی (پیک تولید تخم مرغ) کاهش می‌یابد و باعث کاهش تولید و کیفیت تخم‌مرغ می‌شود. این موضوع ضرر اقتصادی زیادی به مرغداران وارد می‌کند. افزودن عصاره گیاهان دارای خاصیت فیتواستروژنی مثل رازیانه (۱۷) و عناصر معدنی مثل روی (۳۵) می‌تواند جهت جلوگیری از این کاهش در انتهای دوره تولید مفید باشد. برای جلوگیری از این خسارت باید راه‌حلی یافت تا میزان استروژن را افزایش داد. با توجه به معایب هورمون‌ها و مشکلات و اثرات منفی آن‌ها و این‌که گیاهان حاوی فیتواستروژن فاقد اثرات منفی استروژن‌های صنعتی

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

می‌باشند، استفاده از استروژن‌های اگزوژن طبیعی مثل فیتواستروژن‌ها در صنعت دام و طیور رایج گردیده است. آزمایشات زیادی نشان داده‌است که گیاهان دارای فیتواستروژن می‌توانند بیان GnRH را تحت‌تأثیر قرار دهند. از مهم‌ترین فیتواستروژن‌ها می‌توان جنستئین (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 نعناییان یا لامیاسه است که به‌مقدار زیاد حاوی فیتواستروژن است. گیاه پنج انگشت را گیاه زنان می‌نامند. پنج انگشت در پیشگیری از اختلالات قاعدگی، پریود دردناک، قطع غیر طبیعی پریود، اختلال در زمان و مقدار خونریزی، نارسایی زودرس تخمدان و عوارض حین یائسگی مؤثر می‌باشد (۱۴،۳۴). گیاه پنج‌انگشت نام‌های زیادی از جمله، پنج‌پنجه، بنگر و دل‌آشوب، درخت پاک‌دامنی و فلفل بیابانی دارد (۳۰). این گیاه به‌طور 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 غیراشباع، ویتامین‌ها، رزین‌ها، نیترات‌پتاسیم، اسیدآسپارتیک و اسیدگلوتامیک است (۱۱). از میوه این گیاه نیز اسید لینولئیک، 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 به‌عنوان یکی از منابع غنی از فیتواستروژن‌ها شناخته شده است (۲۹). این ترکیبات ساختار و عملکرد شبیه به استرادیول دارند اما اثر آن‌ها نسبت به استروژن ضعیف‌تر است (۲۳). شباهت 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 به‌عنوان یک گیاه فیتواستروژن دارای خواص دارویی است و ترکیبات موجود در آن به‌عنوان جایگزین استروژن‌های مصنوعی در کنترل محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– گناد در موش به‌کار 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 تا کنون مطالعه‌ی مکتوبی در زمینه اثرات استفاده از پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر مرغ تخمگذار گزارش نگردیده است. لذا در این مطالعه به اثرات تغذیه‌ای 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 های‌لاین (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 به‌همراه ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت، جیره پایه به‌همراه ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بودند (جدول ۱).

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

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

ماده خوراکی (درصد)	شاهد	۱ درصد پنج‌انگشت	۲ درصد پنج‌انگشت
ذرت	۶۰/۱۹	۵۹/۰۰	۵۷/۶۰
کنجاله سویا	۲۲/۴	۲۲/۳	۲۲/۳
پنج‌انگشت	۰	۱/۰۰	۲
روغن گیاهی	۳/۰۵	۳/۳۴	۳/۷۴
دی کلسیم فسفات	۱/۶	۱/۶	۱/۶
پودر صدف	۶/۵	۶/۵	۶/۵
کربنات کلسیم	۵/۱۵	۵/۱۵	۵/۱۵
جوش شیرین	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
نمک طعام	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳
ال- لیزین هیدروکلراید	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
دی-ال متیونین	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینه	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مقادیر تامین شده			
انرژی قابل سوخت و ساز (kcal/kg)	۲۸۰۲	۲۷۹۸	۲۷۹۸
پروتئین خام (درصد)	۱۵/۰۵	۱۵/۰۳	۱۵/۰۱
کلسیم (درصد)	۴/۸۵	۴/۸۴	۴/۸۴
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۴۱	۰/۴۱	۰/۴۱
ال-لیزین هیدروکلراید (درصد)	۰/۷۷	۰/۷۷	۰/۷۷
متیونین+سیستئین	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۶۳

*: به‌ازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۸۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینA، ۲۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین K3، ۱۴۷۷میلی‌گرم ویتامین B1، ۴۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B2، ۷۸۴۰ میلی‌گرم ویتامین B3، ۳۴۶۵۰ میلی‌گرم ویتامین B5، ۲۴۶۴ میلی‌گرم ویتامین B6، ۱۱۰ میلی‌گرم ویتامین B9، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B12، ۴۰۰ گرم کولین کلراید می‌باشد.

**: به‌ازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۷۴۴۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۷۵۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۶۷۵۶۴ میلی‌گرم روی، ۶۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۸۶۷ میلی‌گرم ید و ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم می‌باشد.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

در پایان دوره آزمایش ۱ قطعه مرغ از هر تکرار کشتار شد و نمونه سر آن‌ها سریعا جدا گردید. سپس جمجه 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 کریستو و همکاران (۶) انجام گرفت. برای بررسی کمیت و خلوص RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000. USA) و برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۲ درصد در بافر 0.5x TBE استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سیناکولون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (تکاپوزیست) ساخته‌شد. اجزای سنتز cDNA، مرحله اول در حجم نهایی۱۰ میکرولیتر شامل، ۵ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر Oligo dt و ۴ میکرولیتر آب استریل و در مرحله دوم شامل، ۴ میکرولیتر 5X Buffer، ۱ میکرولیتر DTT، ۰/۵ میکرولیتر M-Mlv، ۰/۵ میکرولیتر RNase inhibitor، 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 سانتی‌گراد و مرحله دوم شامل ۶۰ دقیقه با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. به‌منظور 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.

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.

ژن‌ها	توالی پرایمر	اندازه محصول	دمای اتصال
ژن GnRH	F:5´-ATTTTCCAGCGGGAAGAGTTG -3´ R:5´-TGGGTTTGTTGATGGTGTTGT-3´	۳۵۰	۶۲
ژن LH	F:5´-GTTGGTGCTGATGACCCTTT-3´ R:5´-TGGTGGTCACAGCCATACAT-3´	۱۹۴	۶۲
ژن Beta-Actin	F:5´-GAGGGAGGGTGGATCATAGA-3´ R:5´-CCTCTGGGACCTTCAACAAT-3´	۱۵۰	۵۹

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 Bio-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 ۲۳ میکرولیتر شامل، ۶/۵ میکرولیتر آب استریل، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از سنتز cDNA و ۱۲/۵ میکرولیتر Master 1.5 mix می‌باشند و برنامه حرارتی عبارت است از: یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با دمای واسرشت‌سازی ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه و نگهداری در دمای ۴ درجه به مدت ۵ دقیقه می‌باشد. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل 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 میکرولیتر cDNA، ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲/۶ میکرولیتر آب استریل، ۵ میکرولیتر کیت تجاری Real Q Plus 2x Master Mix Green (High ROX) می‌باشند و برنامه حرارتی شامل: یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با دمای واسرشت‌سازی ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ سیکل با دمای ۹۵-۷۰ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه برای تهیه نمودار ذوب می‌باشد. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش ΔΔCT (آستانه مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن بتااکتین بود. (۲۴).

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

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به‌ترتیب بازدهی ژن مورد مطالعه و ژن مرجع می‌باشد. ΔCT حاصل تفریق CT (حد آستانه) ژن مورد مطالعه در نمونه از کنترل است.

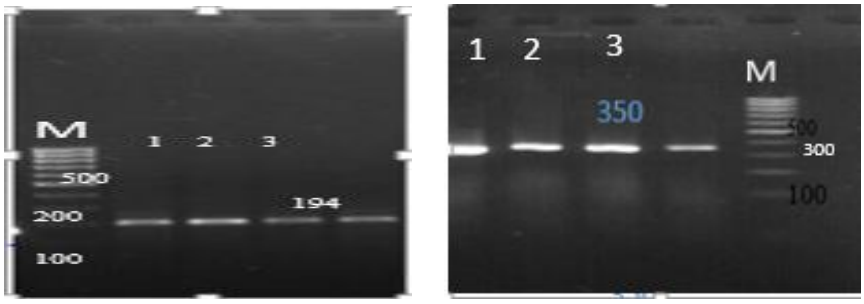
آنالیز سطح بیان ژن GnRH و LH با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و سپس آزمون دانکن در سطح خطای ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) بررسی شد.

نتایج و بحث

استخراج RNA در تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. پس از استخراج RNA و اندازه‌گیری میزان خلوص آن، توسط دستگاه نانودراپ، میزان خلوص آن با نسبت جذب نوری۲۶۰ به ۲۸۰ بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج شده در این پژوهش بین ۲-۱/۸ بود و همچنین غلظت RNA استخراج شده در حدود ۱۵۰۰ الی ۳۰۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. بررسی کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد منجر به ایجاد دو باند ۲۸s و ۱۸s شد که نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA بود. در تأیید صحت تکثیر ژن‌های GnRH و LH و بتااکتین 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

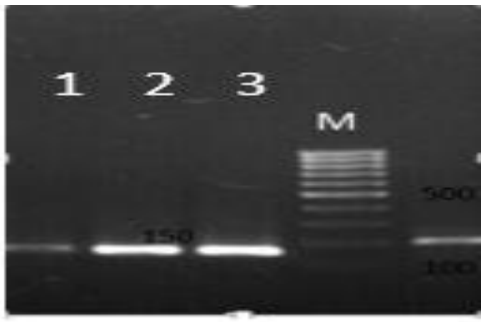
(شکل ۱) و باند bp ۱۵۰ برای ژن بتااکتین (شکل ۲) روی ژل آگارز گردید. طی انجام واکنش، دستگاه ریل تایم میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به‌صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد (شکل ۳). برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان‌دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.



ب (LH) الف (GnRH)

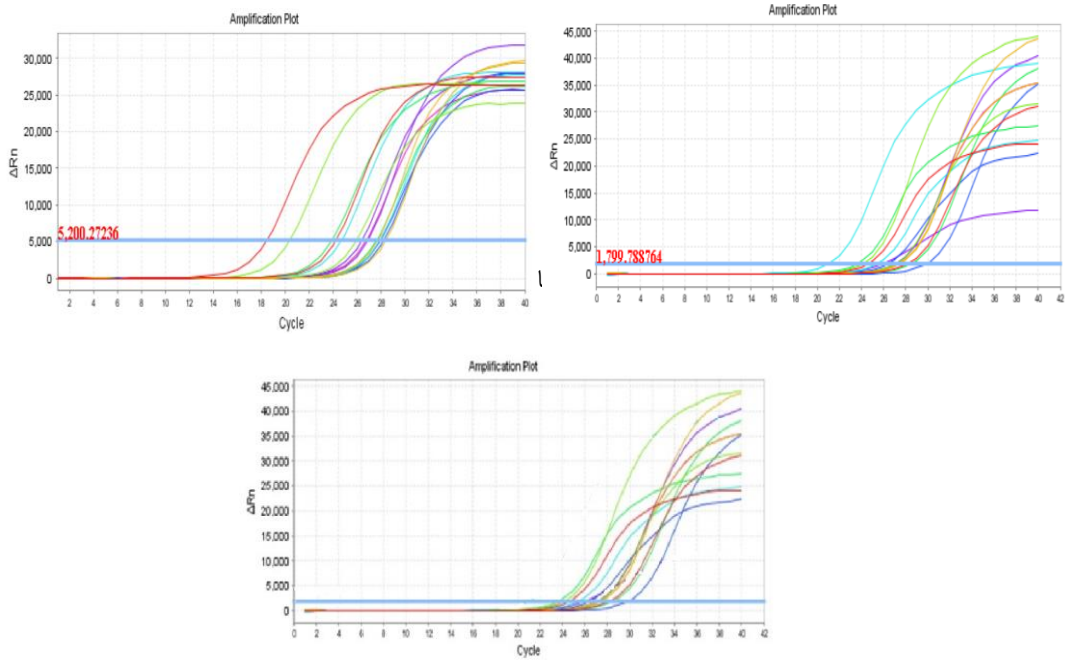
شکل ۱– الکتروفورز محصولات PCR الف: ژن GnRH ب: LH روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp

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 روی 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.

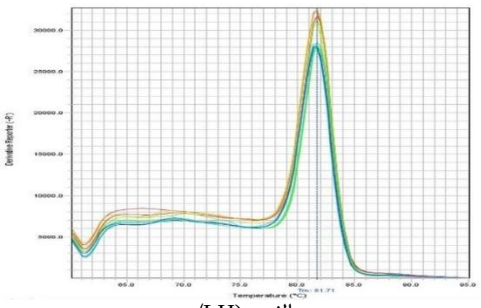


شکل ۳– منحنی تکثیر استاندارد الف: ژن LH ب: GnRH پ: بتااکتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای مرغ تخمگذار

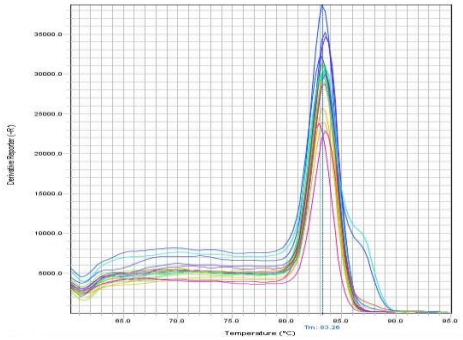
Figure 3. Standard amplification curve of a) LH b) GnRH c) Beta -Actin gene production using Real time PCR for laying hens

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

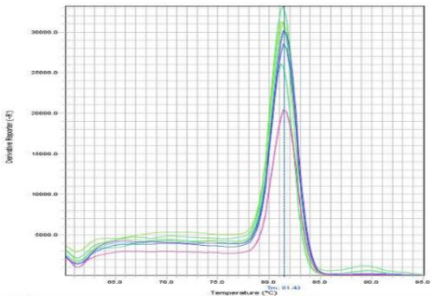
منحنی ذوب ژن بتا اکتین، GnRH و LH اختصاصی بودن و دمای Tm محصول (دمایی که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج می‌شود) واکنش ریل تایم این ژن‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۴).



الف- (LH)



ب- GnRH



پ- بتا اکتین

شکل ۴- منحنی ذوب محصول الف: ژن LH ب: GnRH پ: بتااکتین 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 GnRH

جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان‌داد که تیمارها بر بیان ژن GnRH اثر معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۱). نتایج نرمال شده، نشان‌داد که میزان بیان ژن GnRH در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت برابر ۵/۲۰۶۷ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۱/۳۹۶۷ برآورد شد که در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (p<۰/۰۱).

اثر تیمارها بر بیان ژن LH

جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که تیمارها بر بیان ژن LH اثر معنی‌داری نداشتند (p >۰/۰۵). نتایج نرمال شده، نشان‌داد که میزان بیان ژن LH در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت برابر ۱/۲۷۳۳ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۱/۱ برآورد شد که این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار نبود (p >۰/۰۵).

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن GnRH هیپوتالاموس مرغ تخمگذار

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for Vitex Agnuse Castus fruit powder on hypothalamic GnRH gene expression in laying hens

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	سطح معنی‌داری
تیمارها	۲	۳۲/۳۶	۱۶/۱۸	۰/۰۰۱۷
خطا	۶	۲/۳۵	۰/۷۲۶	

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

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

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for Vitex Agnuse Castus fruit powder on LH gene expression in laying hens

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	سطح معنی‌داری
تیمارها	۲	۰/۱۱۴۷	۰/۰۵۷۳	۰/۱۶۲۲
خطا	۶	۰/۱۳۷۶	۰/۰۲۲۹	

جدول ۵- اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن‌های GnRH و LH مرغ تخمگذار

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

تیمارها	بیان ژن GnRH	بیان ژن LH
گروه شاهد	۱[b]	۱[a]
سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت	۱/۳۹۶± ۰/۸۵ [b]	۱/۱±۰ /۱۵ [a]
سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت	۵/۲۰۶ ± ۰/۸۵ [a]	۱/۲۷۳± ۰/۱۵ [a]

حروف مشابه در ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p>۰/۰۵).

مطالعات نشان‌داده‌اند که گیاه پنج‌انگشت خاصیت فیتواستروژنی دارد (۲۰). از این‌رو پژوهش حاضر به‌منظور بررسی خاصیت استروژنی این گیاه بر بیان ژن‌های GnRH و LH در مرغ تخمگذار صورت گرفت. فیتواستروژن‌ها تعدیل‌کننده هورمونی هستند که در شرایطی که سطح هورمون استروژن پایین باشد به‌عنوان یک آگونیست استروژن عمل نموده و اثرات شبه استروژنی ایجاد می‌کنند و در شرایط بالا رفتن سطح هورمون استروژن به‌عنوان یک آنتاگونیست عمل می‌کنند (۲). استروژن رسپتور بتا در نورون‌های GnRH هیپوتالاموس وجود دارد و باعث افزایش اثرات مستقیم استروژن در سلول‌های عصبی GnRH می‌شود (۱۵). آزمایشات زیادی نشان داده است که گیاهان دارای خواص فیتواستروژنی می‌توانند بیان GnRH را تحت‌تأثیر قراردهند. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد کاربردهای دارویی گیاه پنج انگشت برای انسان (۲۷،۳۴) موش (۳،۲۰) و ماهی (۳۳،۷) انجام گرفته است. اما تا کنون مطالعه‌ی مکتوبی در زمینه اثرات استفاده از پودر میوه گیاه پنج‌انگشت 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، جنستئین و دایدزئین را نام برد. محققین نشان‌دادند که افزودن ۵۰ میلیگرم عصاره رازیانه در کیلوگرم جیره به‌همراه ویتامین D باعث بهبود عملکرد مرغ‌های مادر گوشتی می‌شود (۱۷). در تحقیقی نشان داده‌شد که میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تیمار جنستئین باعث افزایش بیان ژن GnRH و بهبود سطح سرمی استروژن و افزایش میزان تخمگذاری در مرغ‌های دچار سندروم کبد چرب می‌شود (۱۹). همچنین محققین نشان‌دادند که دایدزئین عملکرد مرغ تخمگذار را از جمله تولید تخم‌مرغ و بازده خوراک را افزایش می‌دهد (۵،۳۶،۲۲).

نتایج این تحقیق نشان‌داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت به‌میزان ۱ درصد نمی‌تواند تأثیری بر بیان ژن‌های GnRH و LH داشته باشد اما افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت به‌میزان ۲ درصد توانسته است بیان ژن GnRH را به‌میزان ۴/۲ واحد افزایش دهد. این در حالی است که این مقدار پودر میوه گیاه پنج‌انگشت تأثیری بر بیان ژن LH نداشته‌است. افزایش GnRH می‌بایستی سبب افزایش بیان LH می‌شد (۹) اما این اتفاق نیفتاده است. اگر افزایش GnRH سبب افزایش LH شده باشد بایستی اثر آن را در عملکرد و تولید و تولیدمثل مشاهده کرد. در مطالعه‌ای که محققین بر روی همین مرغان تخمگذار انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت اثری بر عملکرد و تولیدمثل و کیفیت تخم مرغ نداشته است (۸). پس به‌نظر می‌رسد که افزایش GnRH نتوانسته است سبب افزایش LH شود و بر عملکرد و تولید مرغ‌ها اثری نداشته است. شاید علت این امر بالا بودن سن مرغ‌ها (۷۲ تا ۸۰ هفتگی) و یا نامناسب بودن سطح پودر میوه گیاه پنج‌انگشت با مرحله تولید باشد.

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

تشکرو قدردانی

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

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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

27. Ramezani, M., S. Nasri and H. Bahadoran. 2008. The effects of *Vitex agnus castus* total extract on spermatogencsis 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 consentration of female rats in gastation. 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]

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

Razieh Sabahi[1], Mahmood Nazari[2], Mohammad Taghi Beigi Nassiri[3] and Mohammad Reza Ghorbani[4]

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*

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1399.11.30.6.8]
[DOI: 10.52547/rap.11.30.92]