دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

# تأثیر پودر میوه پنج‌انگشت بر بیان ژن نشانگرهای اوویداکت مرغ‌های تخمگذار

سیده تقوا موسوی[۱]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، هدایت‌اله روشنفکر[۳]، محمود نظری[۴] و محمدرضا قربانی[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲ و ۳- استاد 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،
(نویسنده مسوول: M.nazari@asnrukh.ac.ir)
۵- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۵
صفحه: ۱۳۸ تا ۱۴۶

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** فیتواستروژن‌ها، استروژن‌های گیاهی با عملکرد و ساختار استروژن هستند. استروژن در فرآیند سنتز پروتئین‌های سفیده تخم‌مرغ در مجرای اویداکت مرغ نقش مهمی ایفا می‌کند. گیاه پنج‌انگشت یک گیاه بومی کشورهای آسیای میانه، مرکزی، جنوب اروپا و کشورهای مدیترانه است. این گیاه در طب سنتی کاربردهای متعددی دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که گیاه پنج‌انگشت حاوی سطوح بالایی از فیتواستروژن است. فعال‌ترین فیتواستروژن‌ها در پنج‌انگشت شامل آپیژنین، وایتکسین و پندولتین است. تاکنون مطالعه‌ای در مورد اثر فیتواستروژن‌های گیاه پنج‌انگشت بر بیان نشانگرهای ژنی اوویداکت (اووآلبومین و اوووموئید) مرغ تخمگذار منتشر نشده است. از این رو، این مطالعه به منظور بررسی تأثیر میوه‌های گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن های اووآلبومین و اوووموئید اویداکت مرغ‌های تخمگذار انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۹۰ قطعه مرغ تخمگذار لگهورن (Hy-Line, W-36) در چرخه دوم تولید (در سن ۷۲ تا ۸۰ هفتگی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار، پنج تکرار و ۶ قطعه مرغ در هر تکرار مورد استفاده قرار گرفت. تیمارها شامل سطوح مختلف پودر میوه پنج‌انگشت شامل سطوح صفر، ۱ و ۲ درصد پودر میوه پنج‌انگشت به ازای هر کیلوگرم جیره بودند. پس از استخراج RNAی کل، کیفیت RNA با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از کیت سیناکلون cDNA سنتز شد. میزان بیان ژن با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان واقعی اندازه گیری شد. در این روش از ژن بتااکتین به عنوان ژن مرجع جهت نرمال نمودن داده‌ها استفاده شد. برای تایید اختصاصیت هر پرایمر نمودار ذوب آن مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به ترتیب قطعات ۶۰، ۱۳۳ و ۱۵۰ جفت باز را برای اووآلبومین، اوووموئید و بتااکتین نشان داد. همه نمودارهای ذوب دارای یک پیک بودند که نشان دهنده حداقل دایمر پرایمر و اختصاصیت پرایمرها برای هر ژن بود. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی نشان داد که مکمل سازی میوه پنج‌انگشت در سطوح ۱ و ۲ به جیره مرغ‌های تخمگذار تأثیری بر بیان ژن‌های اووآلبومین و اوووموئید مرغ تخمگذار ندارد.

**نتیجه‌گیری:** انتظار نمی‌رود که افزودن پودر میوه پنج‌انگشت به جیره مرغ‌های تخمگذار سبب افزایش تولید در مرغ تخمگذار شود. بنابراین افزودن گیاه پنج‌انگشت به جیره مرغ های تخمگذار پیشنهاد نمی شود.

**واژه‌های کلیدی:** اووآلبومین، بیان ژن، مرغ تخمگذار، وایتکس

## مقدمه

هورمون استروژن نقش مهمی در فرآیند سنتز پروتئین‌های سفیده تخم‌مرغ در مجرای اویداکت مرغ دارد (۲۶). استروژن در سلول‌های تیکای فولیکول‌های تخمدان در پرنده تولید می‌شود. عملکرد تولیدمثلی، رفتارهای تولیدمثلی، سنتز پروتئین‌های سفیده و زرده تخم‌مرغ در پرنده توسط استروژن تنظیم می‌شود (۱۰). همچنین استروژن مسئول فرآیند متابولیسم کلسیم برای تشکیل پوسته تخم‌مرغ و رشد زرده و فولیکول است (۶). علاوه‌براین، تمایز سلول‌های اپیتلیال و تشکیل غدد لوله‌ای شامل سلول‌های گابلت و مژک دار توسط استروژن در مگنوم القا می‌شود (۲۵). غدد لوله‌ای تعداد زیادی از پروتئین‌های سفید تخم‌مرغ مانند اووآلبومین (OVAL)، اوووموئید (OVM)، لیزوزیم و کونا آلبومین را سنتز می‌کنند (۲۳). دو نشانگر ژنی لوله اویداکت یعنی اووالبومین و اوووموئید که به عنوان نشانه های مولکولی سلول‌های مجرای اویداکت تخمدان شناخته می‌شوند، تنها در مجرای اویداکت مرغ‌های تخمگذار بیان می‌شوند (۳۵). مطالعات نشان داد که استروژن نقش مهمی را درتنظیم فرآیند رونویسی و مرحله پس از رونویسی اووالبومین ایفا می‌کند (۱۵،۳۴). از آنجایی که سطح هورمون‌های استروئیدی تخمدان در پرندگان مسن کاهش می‌یابد (۹) و پیری سیستم تولید مثل می‌تواند ظرفیت محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد را کاهش دهد، در نتیجه کاهش تولید پرنده در پایان دوره تولید پرنده اجتناب‌ناپذیر است (۱۸). اثر متقابل پیچیده‌ای بین استروژن و کلسیم وجود دارد. این اثر با شکل فعال ویتامین D باعث افزایش جذب کلسیم از مجرای گوارش می‌شود (۵). تحقیقات نشان داده که کاهش جذب کلسیم در روده به دنبال کاهش استروژن پلاسما آغاز شده و منجر به افزایش تجزیه استخوان و در نتیجه افزایش آزاد سازی کلسیم در فضای خارج سلولی می‌شود. بنابراین غلظت بالای کلسیم در فضای خارج سلولی باعث مهار ترشح هورمون پاراتیروئید می‌شود که موجبات کاهش تولید ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول مورد نیاز و کاهش جذب کلسیم از دستگاه گوارش را فراهم می‌آورد (۸). کلسیم و استروژن برای تولید و ترشح هورمون LH و پروژسترون ضروری می‌باشند (۲۴). جلوگیری از کاهش تولید تخم‌مرغ در اواخر دوره تخم‌گذاری مرغان تخمگذار می‌تواند سبب افزایش سود در واحد مرغداری شود. بنابراین روش‌هایی برای افزایش تولید و کیفیت تخم‌مرغ در اواخر دوره تخمگذاری مورد نیاز است. یک استراتژی پیشنهادی استفاده از گیاهان دارویی حاوی فیتواستروژن است. گیاهان دارویی

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

حاوی مواد مفید با خاصیت هورمونی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، تقویت کننده سیستم ایمنی و تحریک کننده رشد هستند (۳۰،۳۱،۳۲)

فیتواستروژن‌ها استروژن‌های گیاهی با عملکردها و ساختارهای استروژن مانند هستند. گیاه پنج‌انگشت[1] یک گیاه چند منظوره متعلق به خانواده *Verbenaceae* با خواص فیتواستروژنیک است. همچنین گیاه پنج‌انگشت به دلیل خواص ضد قارچی، ضد آندروژنی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ضد عفونی کننده و فعالیت های بیولوژیکی مختلف مانند خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است (۲۱). گیاه پنج‌انگشت یک گیاه بومی کشورهای آسیای میانه، مرکزی، جنوب اروپا و کشورهای مدیترانه است. همچنین این گونه در مناطق مرکزی، نواحی مختلف البرز، جنوب غربی ایران، بعضی نقاط جنوبی نزدیک به خلیج فارس رویش می‌یابد (۱۹). این گیاه در طب سنتی کاربردهای متعددی دارد و به طور سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها در زنان از جمله ناباروری، سندرم پیش از قاعدگی، هیپرپرولاکتینمی، سیکل‌های غیر طبیعی قاعدگی، اندومتریوز، تسکین علائم یائسگی و کمبود شیر مادر استفاده می‌شود (۲۹،۱۴). مطالعات قبلی نشان داد که میوه پنج‌انگشت سطح استروژن و پروژسترون را در موش های ماده افزایش (۱) و LH را بدون تأثیر بر FSH در موشها کاهش (۱۱) داده است. همچنین میزان بیان ژن GnRH را در مرغان تخمگذار تا حدودی افزایش داده بدون اینکه بر میزان بیان LH تاثیری داشته باشد (۳۲).

بیشترین و فعال‌ترین فیتواستروژن‌ها در پنج‌انگشت شامل آپیژنین، وایتکسین و پندولتین است که بر گیرنده‌های استروژن نوع بتا تاثیرگذار هستند (۳۷،۱۶،۱۲). استفاده از استروژن‌های مصنوعی (شیمیایی) می‌تواند اثرات جانبی داشته باشد و حتی مشخص شده است می‌تواند سرطان سینه را در خانمها تحریک کند (۲). فیتواستروژن‌ها به دلیل طبیعی بودن آنها کمتر از استروژن‌های شیمیایی خطرناک هستند. در مطالعه حاضر، با توجه به خواص فیتواستروژنی میوه پنج‌انگشت، اثرات پودر میوه پنج‌انگشت بر بیان ژن اووآلبومین و اوموئید (نشانگرهای ژنی اوویداکت) مرغ‌های تخمگذار در چرخه دوم تولید مورد بررسی قرار گرفت. با این امید که بتوان با افزودن میوه پنج‌انگشت در جیره مرغ تخمگذار بر کاهش استروژن در انتهای دوره تولید مرغ تخمگذار فائق آمد و با این استراتژی تولید را افزایش داد.

## مواد و روش‌ها

میوه‌های گیاه پنج‌انگشت از یک تولیدکننده محلی شهرستان قم خریداری و در تاریکی خشک شده و توسط آسیاب برقی پودر شد. جهت تعیین تجزیه شیمیایی پودر میوه پنج‌انگشت برای ماده خشک توسط آون و با روش ۱۵-۹۳۰ از پروتکل (۳) برای پروتئین خام توسط دستگاه کلدال و با روش ۰۵-۹۸۸ از پروتکل (۳) و برای چربی با دستگاه سوکسیله و با روش ۳۹-۹۲۰ از پروتکل (۳) و برای خاکستر خام با دستگاه کوره الکتریکی و با روش ۰۳-۹۲۳ از پروتکل (۳) صورت گرفت. انرژی قابل متابولیسم آن نیز با استفاده از روش پائوزنگا (۲۸) محاسبه گردید.

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 کاملا تصادفی با ۳ تیمار، ۵ تکرار و ۶ قطعه مرغ در هر تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل جیره شاهد (جیره پایه بدون هیچ افزودنی)، جیره پایه به همراه ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت و جیره پایه به همراه ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بودند (جدول ۱).

در پایان دوره آزمایش ۱ قطعه مرغ از هر تکرار کشتار شد و نمونه مگنوم آن‌ها سریعا جدا گردید و با تانک ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. استخراج RNA ی نمونه‌ها با استفاده از ترایزول شرکت سیگما آلدریچ (شماره کاتالوگ T9424) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ مدل ( Thermo Scientific NanOdrOp. 2000. USA) و برای تعیین یکپارچکی RNA استخراج شده از ژل آگارز دو درصد در بافر 0.5x TBE استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون (شماره کاتالوگ RT5201) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق به منظور بررسی تغییر در رونوشت ژن اووآلبومین، اووموئید و بتااکتین توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی[2] (RT-qPCR) در جدول ۲ ارائه شده است.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad انجام شد. تکثیر قطعه ۶۰ جفت بازی برای ژن اووآلبومین و ۱۳۳ جفت بازی برای ژن اووموئید 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 mix 1.5 می‌باشند و برنامه حرارتی عبارتنداز: یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با دمای واسرشت سازی ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی آن با ماده سیف استین صورت گرفت.

1- *Vitex agnus-castus*
2- Real time quantitative polymerase chain reaction

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد)
Table 1. Food 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 | ۲۲/۳۰ |
| پنج‌انگشت | ۰/۰۰ | ۱/۰۰ | ۲/۰۰ |
| روغن گیاهی | ۳/۰۵ | ۳/۳۴ | ۳/۷۴ |
| دی کلسیم فسفات | ۱/۶۰ | ۱/۶۰ | ۱/۶۰ |
| پودر صدف | ۶/۵۰ | ۶/۵۰ | ۶/۵۰ |
| 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 |

*: به ازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۸۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینA، ۲۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینD3، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامینE، ۲۲۰۰ میلی‌گرم ویتامینK3، ۱۴۷۷میلی گرم ویتامینB1، ۴۰۰۰ میلی گرم ویتامین B2، ۷۸۴۰ میلی گرم ویتامین B3، ۳۴۶۵۰ میلی گرم ویتامینB5، ۲۴۶۴ میلی گرم ویتامینB6، ۱۱۰ میلی گرم ویتامینB9، ۱۰ میلی گرم ویتامین B12، ۴۰۰ گرم کولین کلراید می‌باشد.
**: به ازای هر کیلوگرم جیره حاوی ۷۴۴۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۷۵۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۶۷۵۶۴ میلی‌گرم روی، ۶۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۸۶۷ میلی‌گرم ید و ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم می‌باشد.

جدول ۲- توالی و خصوصیات آغازگرهای رفت و برگشت استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
Table 2. The sequence and characteristics of the primer used in PCR reaction.

| ژن ها | توالی پرایمر | اندازه محصول | دمای اتصال | منبع |
|---|---|---|---|---|
| اووآلبومین | F:5´- CGTTCAGCCTTGCCAGTAGA –3´<br>R:5´- AGTATTCTGGCAGGATTGGGT -3´ | ۶۰ | ۶۰ | Stadnicka et al. 2018 |
| اووموئید | F:5´-GTTGGTGCTGATGACCCTTT–3´<br>R:5´-TGGTGGTCACAGCCATACAT–3´ | ۱۳۳ | ۶۰ | Stadnicka et al. 2018 |
| بتا اکتین | F:5´- TGCTGTGTTCCCATCTATCG -3´<br>R:5´- TTGGGACAATACCGTGTTCAT -3´ | ۱۵۰ | ۶۰ | Wen et al. 2014 |

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 2x Master Mix Green (High ROX) استفاده شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل، ۴ میکرولیتر cDNA (حاوی ۵۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (رفت و برگشت)، ۴ میکرولیتر آب استریل، ۱۰ میکرولیتر کیت تجاری Real Q Plus 2x Master Mix Green (High ROX) می‌باشند و برنامه حرارتی شامل: یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل با دمای واسرشت سازی ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل با دمای ۹۵-۵۵ درجه به مدت 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 (۲۷):

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

در این رابطه Etarget و Eref به ترتیب بازدهی ژن مورد مطالعه و ژن مرجع می‌باشد. $\Delta CT$ حاصل تفریق CT (حد آستانه) ژن مورد مطالعه در نمونه از کنترل است.

آنالیز سطح بیان ژن اووآلبومین و اووموئید 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

### ترکیبات شیمیایی

جهت تعیین ارزش غذایی گیاه پنج‌انگشت ترکیب شیمیایی آن بدست آمد. میزان ماده‌خشک، پروتئین خام، عصاره اتری، خاکستر و فیبر خام به ترتیب ۹۱/۳، ۱۰/۵ ، ۵/۶ ، ۱۲/۶ و ۵۶ درصد ماده خشک تعیین شد. همچنین انرژی قابل متابولیسم ۱۰۸۰/۸ کیلوکالری/کیلوگرم محاسبه گردید.

### ارزیابی کیفیت RNA کل

یک تکنیک رایج برای ارزیابی کمیت و کیفیت RNA اندازه‌گیری چگالی نوری است. نسبت جذب نوری A260 به A280 بین ۱/۹ و ۲/۱ معمولاً شاخص قابل قبولی برای کیفیت خوب RNA در نظر گرفته می‌شود (۲۲). جداسازی RNA کل با استفاده از ترایزول منجر به یک محصول با

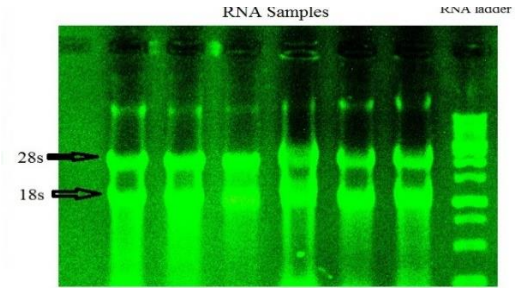
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

کیفیت بالا شد. نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ نشان داد که همه RNAها از کیفیت بالایی برخوردار هستند (بین ۱/۸۵ و ۲/۰۵).

بررسی یکپارچگی RNA یکی دیگر از معیارهای مهمِ آنالیز RNA استخراج شده است که با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز قابل ارزیابی است. یکپارچگی RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای تمام نمونه‌های RNA مورد آزمایش، دو باند واضح (۲۸ S و ۱۸ S) بدون شکستگی مشاهده شد (شکل ۱).

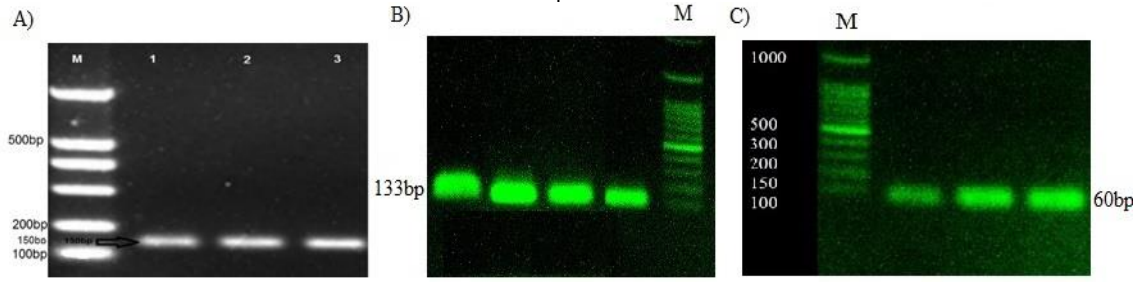
**تکثیر نشانگرهای مجرای اوویداکت تخمدان**

برای تعیین اینکه آیا mRNA ژن اووآلبومین، اوموئید و بتااکتین در مجرای اوویداکت مرغ‌های تخمگذار بیان می‌شوند یا خیر، RNA کل از سلول‌های مگنوم جدا شد و با استفاده از PCR تکثیر شد. الکتروفورز ژل آگارز بیان mRNA ژن بتااکتین (شکل ۲ A)، اووموئید (شکل ۲ B) اووآلبومین (شکل ۲ C) را در سلول‌های مگنوم مرغ‌های تخمگذار تایید کرد. اووآلبومین، اووموئید و بتااکتین به صورت یک باند روی ژل آگارز ۲ درصد ظاهر شدند. الکتروفورز محصولات PCR به ترتیب قطعات ۶۰، ۱۳۳ و ۱۵۰ جفت باز را برای اووآلبومین، اووموئید و بتااکتین نشان داد.




شکل ۱- بررسی یکپارچگی RNAی استخراج شده از مگنوم مرغ تخمگذار با استفاده از الکتروفورز ژل اگارز

Figure 1. RNA integrity analysis of total RNA samples extracted from magnum cell of laying hens using agarose gel electrophoresis.




شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز. A: ژن بتااکتین B: اووموئید C: اووآلبومین روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰ bp

Figure 2. Electrophoresis of PCR products for (A) Beta actin (B) Ovomucoid (C) Ovalbumin of laying hens on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp

**ارزیابی نتایج تکنیک PCR در زمان واقعی**

نمودار تکثیر و منحنی ذوب برای ژن‌های اووآلبومین، اووموئید و بتااکتین در شکل ۳ نشان داده شده است. وجود تنها یک پیک (قله) در منحنی ذوب بیان‌کننده حداقل دایمر-پرایمر و نشان‌دهنده اختصاصیت پرایمرهاست.

**اثر تیمارها بر بیان ژن اووآلبومین**

تجزیه واریانس نشان داد که تیمارها بر بیان ژن اووآلبومین اثر معنی داری نداشته‌اند ($p>0/05$). میزان بیان ژن اووآلبومین در گروه تغذیه شده با سطح ۲درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۱/۴۶۵۸ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۱/۴۰۱۴ برآورد شد که در هر دو گروه تغذیه شده با سطح ۱ و ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۵ درصد معنی دار نشد ($p>0/05$). طبق نتایج جدول ۳ میانگین تغییرات بیان ژن اووآلبومین در گروه تغذیه شده با سطح ۱درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۰/۴۰۱۴ و در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۰/۴۶۵۸ واحد نسبت به میانگین تغییرات کنترل که برای دو تیمار ۱ در نظر گرفته شده، افزایش یافته است که در هردو سطح ۱ و ۲ درصد معنی‌دار نشد ($p>0/05$).

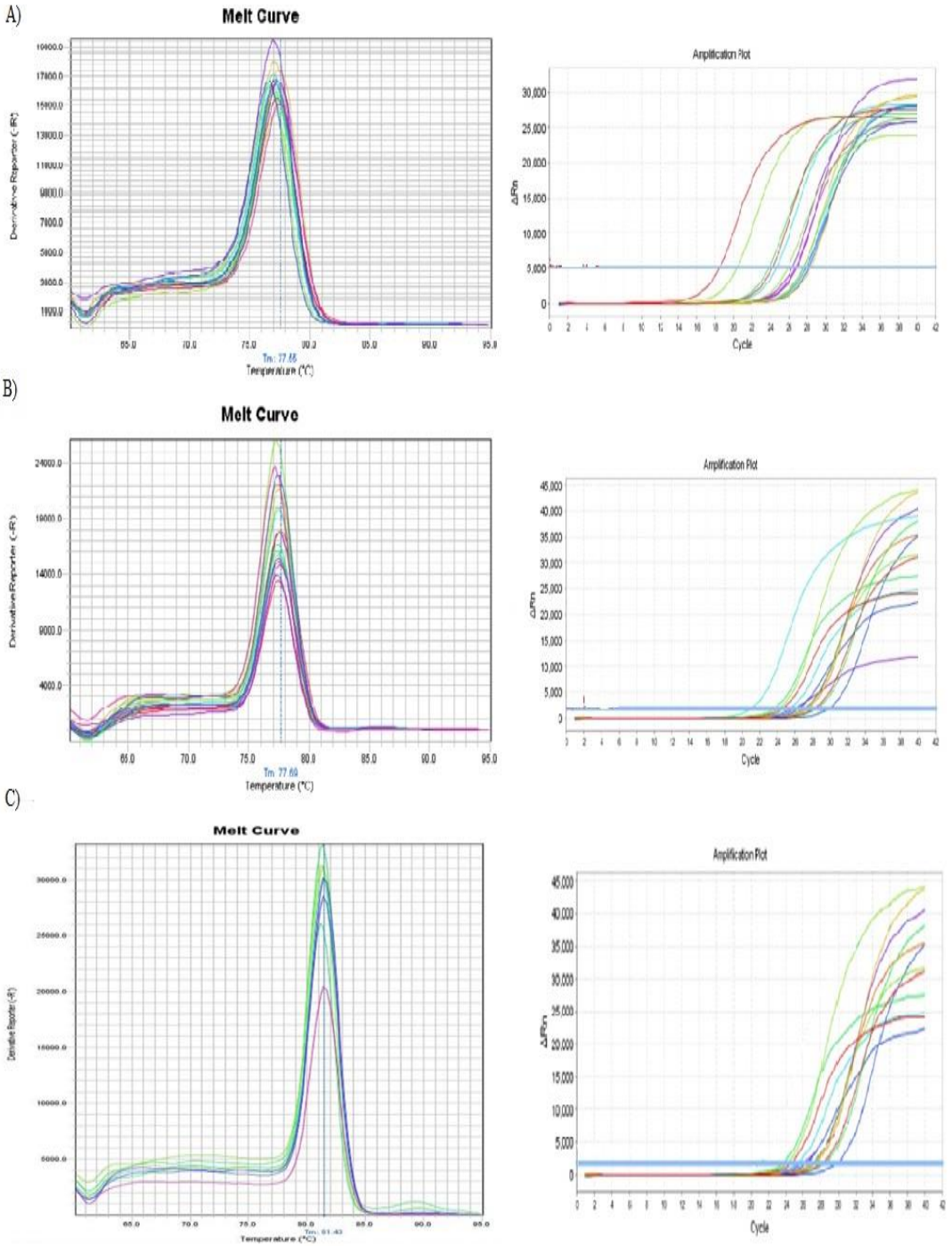
**اثر تیمارها بر بیان ژن اوموئید**

تجزیه واریانس نشان داد که تیمارها بر بیان ژن اوموئید اثر معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$). نتایج نرمال شده، نشان داد که میزان بیان ژن اوموئید در گروه تغذیه شده با سطح ۲ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت برابر ۱/۳۶۰۴ و در گروه تغذیه شده با سطح ۱ درصد پودر میوه گیاه پنج‌انگشت ۱/۵۸۰۸ برآورد شد که این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار نبود ($p>0/05$) (جدول ۳).

تحقیقات گذشته نشان داده است که افزودن همزمان استروژن و پروژسترون بر میزان mRNAی اووآلبومین تأثیر

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

می‌گذارند. کشت سلول‌های اوویداکت در محیط آزمایشگاه و القا توسط استروژن نشان داد که بیان ژن سفیده تخم‌مرغ توسط استروژن القا و حفظ می‌شود مانند آنچه در داخل بدن مشاهده می‌شود (۲۰). استروژن باعث افزایش نیمه‌عمر mRNAی اووآلبومین مرغ در داخل بدن می‌شود.




شکل ۳- منحنی تکثیر استاندارد (راست) و محنی ذوب (چپ) مربوط به ژن‌های A: اووآلبومین B: اوموئید و C: بتااکتین حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی برای مرغ تخمگذار

Figure 3. Real-time PCR amplification curves (Right) and melting curves (Left). Pictures Show real-time PCR amplification curves and melting curves for A) Ovalbumin B) Ovomucoid (C) Beta actin genes in laying hens

علاوه براین، نشان داده شده که استروژن mRNAی اووآلبومین را تثبیت می‌کند و نیمه عمر mRNAی اووآلبومین در حضور و عدم حضور استروژن تقریباً با آنچه در مطالعات درون‌تنی (موجود زنده) بدست آمده یکسان است (۴). به دلایل بیان شده در بالا انتظار می‌رفت افزودن میوه گیاه پنج‌انگشت به جیره مرغ تخمگذار بدلیل داشتن مقادیر زیادی

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

استروژن گیاهی منجر به افزایش سطح mRNAی اووآلبومین گردد. همچنین افزایش عملکرد و تولید تخم و بهبود بازده خوراک با اضافه شدن فیتواستروژن هایی مانند دایدزئین به جیره مرغ تخمگذار (۳۶) و اردک (۳۸) این فرضیه را قوت میداد که افزودن گیاه پنج‌انگشت به جیره مرغ تخمگذار میتواند سبب افزایش تولید گردد.

اما برخلاف این باور نتایج تجزیه واریانس در این مطالعه نشان داد که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۱ و ۲ درصد نتوانسته سبب افزایش بیان سطح mRNAی اووآلبومین و مقدار آلبومین تخم‌مرغ گردد. نتایج این تحقیق با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد. در آزمایشی که بر روی همین مرغان تخمگذار جهت بررسی اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن GnRH انجام شد نشان داده شد که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۱ درصد، تاثیری بر بیان GnRH نداشت. همچنین افزودن پودر میوه گیاه پنج انگشت در سطح ۲ درصد منجز به افزایش مقدار کم در بیان ژن GnRH گردید و این افزایش در نهایت تاثیری بر بیان LH نداشت (۳۲). همچنین در تحقیقی که فتحی‌مقدم و همکاران (۷) بر روی همین مرغان تخمگذار انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزودن پودر میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۱ و ۲ درصد اثری بر کمیت و کیفیت تخم‌مرغ و تولیدمثل نداشته است. مطابق با این نتایج، محققان دیگر نیز گزارش کردند مکمل‌سازی جیره مرغان تخمگذار با ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم عصاره پنج‌انگشت اثر معنی‌داری بر وزن بدن، مصرف خوراک، تولید تخم‌مرغ و بازده خوراک مرغ تخمگذار نداشت (۱۳). مخالف نتایج آزمایش حاضر سالاری و همکاران (۳۳) نشان دادند استفاده از عصاره هیدروالکلی مخلوط گیاهان پنج‌انگشت، آویشن، اسطوخدوس و گل همیشه بهار درآب آشامیدنی قناری در دوران تولک‌بری، باعث کاهش خطی در میزان پرولاکتین پلاسما و افزایش خطی غلظت استروژن و پروژسترون پلاسما در دوره آزمایش و سبب کوتاهی دوره تولک‌بری قناری‌ها گردید. همچنین استفاده از عصاره هیدروالکلی مخلوط گیاهان پنج‌انگشت، آویشن، اسطوخدوس و گل همیشه بهار به میزان ۲/۲۵ گرم در یک لیتر آب آشامیدنی مرغان تخمگذار، تولید تخم‌مرغ در هفته‌های اول، دوم و سوم آزمایش پس از دوره تولک‌بری را افزایش داد.

بدلیل مخلوط بودن چندین عصاره با هم در مطالعه سالاری و همکاران (۳۳) نمی‌توان این تغییرات تولید را به یکی از این عصاره‌ها نسبت داد. نمی‌توان به یقین گفت که گیاه پنج‌انگشت تاثیرگذار بوده است. همه گزارشات دلالت بر عدم تاثیرگذاری استفاده از گیاه پنج‌انگشت در جیره مرغ تخمگذار دارند. بقیه محققین دلیل عدم تاثیرگذاری گیاه پنج‌انگشت جهت افزایش تولید را مواردی همچون نحوه استفاده از این گیاه دارویی ذکر کرده‌اند. حال آنکه هر دو شکل عصاره (۱۳) و پودر (۷) نتوانسته است سبب افزایش تولید شود.

جدول ۳- اثر پودر میوه گیاه پنج‌انگشت بر بیان ژن اووآلبومین و اوموئید مجرای اوویداکت مرغ تخمگذار

Table 3. The Effect of *Vitex Agnuse Castus* fruit powder on ovalbumin and ovomucoid genes expression of laying hens

| | تیمار | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ژن | شاهد (کنترل) | سطح ۱٪ پودر میوه گیاه پنج‌انگشت | سطح ۲٪ پودر میوه گیاه پنج‌انگشت | خطای معیار میانگین (SEM) | p. value |
| اووآلبومین | ۱ | ۱/۴۰۱۴ | ۱/۴۶۵۸ | ۰/۲۲ | ۰/۴۹ |
| اوموئید | ۱ | ۱/۵۸۰۸ | ۱/۳۶۰۴ | ۰/۲۵ | ۰/۶۹ |

شاید علت عدم تاثیر استروژن‌های میوه پنج‌انگشت بر روی اوویداکت مرغ تخمگذار را در چگونگی اتصال این استروژن‌های گیاهی به انواع گیرنده‌های استروژن جستجو کرد. استروژن با اتصال به گیرنده استروژن بتا و آلفا که یک پروتئین هسته‌ای دیمریک است با DNA باند شده و بیان ژن را کنترل می‌کند. محققین نشان دادند که گیرنده استروژن آلفا در تمام قسمت‌های اوویداکت بیان می‌شوددر حالی که استروژن رسپتور بتا در مغز عملکرد تنظیمی را برعهده دارد و در اویداکت بیان نمی‌شود (۳۵). از طرف دیگر مشخص شده که مهمترین فیتواستروژن‌های پنج‌انگشت (وایتکسین،آپی ژنین و پاندولتین) که به مقدار زیاد در پنج‌انگشت وجود دارند به گیرنده استروژن بتا متصل می‌شوند (۳۷). این فیتواستروژن‌ها تمایل زیادی به اتصال به گیرنده استروژن بتا دارند. البته در پنج‌انگشت مقادیر کمی فیتواستروژن‌هایی مانند اسیدلینولئیک وجود دارد که تمایل به اتصال به گیرنده استروژن آلفا دارد (۱۷) و شاید به همین دلیل است که در تحقیق صباحی و همکاران (۳۲) گیاه پنج‌انگشت توانسته است در سطح بالا (۲ درصد) منجر به افزایش ناچیزی در GnRH شود. پس نمی‌توان انتظار داشت که فیتواستروژن های پنج‌انگشت بر روی اوویداکت که تنها گیرنده استروژن آلفا در آن بیان می‌شود، اثری داشته باشد. به همین دلیل بیان ژن های اووآلبومین و اوموئید تحت تاثیر فیتواستروژن های پنج‌انگشت قرار نگرفته است.

## نتیجه‌گیری کلی

افزودن میوه گیاه پنج‌انگشت در سطح ۱ و ۲ درصد به جیره مرغ تخمگذار تاثیری بر بیان ژن های اووآلبومین و اوموئید ندارد. استفاده از میوه گیاه پنج‌انگشت در مرغ تخمگذار جهت افزایش تولید سودمند نیست و استفاده از این گیاه در جیره مرغ تخمگذار پیشنهاد نمی‌شود.

## تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه این تحقیق را تأمین نمودند تشکر به عمل می‌آید.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

## منابع

1. Ahangarpour, A., S.A. Najimi and Y. Farbood. 2016. Effects of Vitex agnus-castus fruit on sex hormones and antioxidant indices in a D-galactose-induced aging female mouse model. Journal of the Chinese Medical Association, 79: 589-596.
2. Ali, S. and R.C. Coombes. 2000. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 5(3): 271-81.
3. AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Vol. I. 18th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
4. Arao, Y., N. Miyatake, Y. Ninomiya, T. Hasegawa, S. Masushige and S. Kato. 1994. Estrogen stabilization of the mRNA of chicken ovalbumin gene in the cultured organ from estrogen induced-chick oviduct. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(2): 261-264.
5. Bar, A. and S. Hurwitz. 1979. The interaction between calcium and gonadal hormones in their effect on plasma calcium, bone, 1-25-hydroxycolecalciferol hydroxylase and duodenal calcium binding protein, measured by radioimmunoassay in chicks. Endocrinology, 104: 1455-1460.
6. Dougherty, D.C. and M.M. Sanders. 2005. Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. Trends in Endocrinology and Metabolism, 16: 414-419.
7. Fathimoghadam, N., M.R. Ghorbani, S. Tabatabaei Vakili and A. Tatar. 2022. The effect of Vitex agnus castus fruit powder on performance, egg quality, blood biochemical parameters, immune response, reproductive system and tibial characteristics of laying hens in the second cycle of production. Journal of Animal Science, 31(4): 127-140 (In Persian).
8. Gallagher, J.C., B.L. Riggs, J. Eisman, A. Hamstra, S.B. Arnoud and H. Deluca. 1979. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients. Journal of Clinical Investigation, 64: 729-73.
9. Hansen, K.K., R.J. Kittok, G. Sarath, C.F. Toombs, N. Caceres and M.M. Beck. 2003. Estrogen receptor-α population's change with age in commercial laying hens. Poultry Science, 82: 1624-1629.
10. Hrabia, A., M. Wilk and J. Rzasa. 2008. Expression of alpha and beta estrogen receptors in the chicken ovary. Folia Biologica (Krakow), 56(3-4): 187-91.
11. Ibrahim, N., A. Shalaby, R. Farag, G. Elbaroty, S. Nofal and E. Hassan. 2008. Gynecological efficacy and chemical investigation of Vitex agnus-castus L. fruits growing in Egypt, Natural Product Research, 22: 537e46.
12. Jarry, H., B. Spengler, A. Porzel, J. Schmidt, W. Wuttke and V. Christoffel. 2003. Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of Vitex agnus-castus and isolated flavones. Planta Medica, 69(10): 945-947.
13. Karacollokcu, M.Z., B.K. Guclu, K. Kara and S. Tugrulay. 2016. Effect of some essential oil supplementation to laying hen diet on performance and egg quality, Journal of the Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University, 42(1): 31-37.
14. Katiraee, F., R. Mahmoudi, K. Tahapour, G. Hamidian and S.J. Emami. 2015. Biological properties of Vitex agnus-castus essential oil (phytochemical component, antioxidant and antifungal activity). Biotechnology and Health Sciences, 2(2): 267-97.
15. Kato, S., L. Tora, J. Yamauchi, S. Masushige, M. Bellard and P.A. Chambon. 1992. Far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5′-TGACC-3′? Motifs acting synergistically. Cell, 68: 731-742.
16. Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. Van der Saag, B. van der Burg and J.A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology, 139: 4252-4263.
17. Liu, J., J.E. Burdette, Y. Sun, S. Deng, S.M. Schlecht, W. Zheng, D. Nikolić, G. Mahady, R.V. van Breemen, H. Fong, J. Pezzuto, J. Bolton and N. Farnsworth. 2004. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus L*. (chaste-berry). Phytomedicine, 11(1): 18-23.
18. Liu, Z., C. Sun, Y. Yan, G. Li, F. Shi, G. Wu, A. Liu and N. Yang. 2018. Genetic variations for egg quality of chickens at late laying period revealed by genome-wide association study. Scientific Reports, 8: 10832.
19. Mari, A., P. Montoro, G. D'Urso, M. Macchia, C. Pizza and S. Piacente. 2015. Metabolic profiling of Vitex agnus-castus leaves, fruits and sprouts: analysis by LC/ESI/(QqQ)MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 102: 215-221.
20. Mcknight, G.S., P. Pennequin and R.T. Schimke. 1975. Induction of ovalbumin mRNA sequences by estrogen and progesterone in chick oviduct as measured by hybridization to complementary DNA. Journal of Biological Chemistry, 250(20): 8105-8110.
21. Nasri, S. and V.S. Ebrahimi. 2007. Therapeutic effects of vitex agnus-castus L. Journal of Babol University of Medical Sciences, 8(7): 49-53.
22. New England Biolabs (NEB) Inc. Guidelines for RNA Quantitation. https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/guidelines-for-rna-quantitation.
23. Ohler, P.O., P.M. Grimley and B.W. O'Malley. 1968. Protein synthesis: differential stimulation of cell-specific proteins in epithelial cells of chick oviduct. Science, 160: 86-87.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

24. Onagbesan, O.M. and M.J. Peddie. 1989. Calcium-dependent stimulation of estrogen secretion by FSH from theca cells of the domestic hen (*Gallus domesticus*). General and Comparative Endocrinology, 75: 177-186.
25. Palmiter, R.D. and J.T. Wrenn. 1971. Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. 3. Tubular gland cell cyto-differentiation. Journal of Cell Biology, 50: 598-615.
26. Palmiter, R.D. 1972. Regulation of protein synthesis in chick oviduct. I. Independent regulation of ovalbumin, conalbumin, ovomucoid, and lysozyme induction. Journal of Biological Chemistry, 247: 6450-6461.
27. Pfaffl, M.W., G.W. 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.
28. Pauzenga, U. 1985. Feeding parent stock. Zoo Technical International, 22-24.
29. Rani, A. and A. Sharma. 2013. The genus Vitex: a review. Pharmacognosy Reviews, 7(14): 188-98.
30. Rabieh, M.H. Rooshanfekr, M. Nazari and M.R. Ghorbani. 2020. 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. Iranian Veterinary Journal, 17(2): 51-60 (In Persian).
31. Safamehr, A.R., F. Chavooshi and A. Nobakht. 2017. The Effects of using the effects of saturea and thyme medicinal plants with or without enzyme on performance, blood parameters in broiler chickens. Research on Animal Production, 8(16):70-78 (In Persian).
32. Sabahi, R., M. Nazari, M.T. Beigi Nassiri and M.R. ghorbani. 2020. The Effect of Vitex Agnuse Castus Fruit Powder on Hypothalamic GnRH Gene Expression in Laying Hens. Research on Animal Production, 11(30): 92-100 (In Persian).
33. Salary, J., H.R. Hemati Matin and H. Hajati. 2016. The effect of a dietary innovative multi-material on sex hormones and molting period of canaries and laying hens. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4): 937-942.
34. Schweizer, G., F. Cadepond-Vincent and E.E. Baulieu. 1985. Nuclear Synthesis of Egg White Protein Messenger Ribonucleic Acids in Chick Oviduct: Effects of the Anti-Estrogen Tamoxifen on Estrogen, Progesterone, and Dexamethasone-Induced Synthesis. Biochemistry, 24: 1742-1749.
35. Stadnicka, K., A. Sławińska, A. Dunisławska, B. Pain and M. Bednarczyk. 2018. Molecular signatures of epithelial oviduct cells of a laying hen (*Gallus gallus domesticus*) and quail (Coturnix japonica). BMC Developmental Biology, 18: 9.
36. Shen, Y., Q. Wang, D. Shao, X. Zhao, Y. Hu, H. Tong, and S.R. Shi. 2016. Effects of daidzein on egg production and gonadotropin related gene expression in the ovary and follicles of laying hens. Europ Poultry Science, 80: 160.
37. Wuttke, W., H. Jarry, V. Christoffel, B. Spengler and D. Seidlova-Wuttke. 2003. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) – Pharmacology and clinical indications. Phytomedicine, 10(4): 348-57.
38. 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 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]

# The Effect of *Vitex Agnuse Castus* Fruits Powder on Oviduct Markers Gene Expression of Laying Hens

**Seyedeh Taghva Mosavi[1], Mohammad Taghi Beigi Nasiri[2], Hedayetollah Rooshanfekr[3], Mahmoud Nazari[4] and Mohammad Reza Ghorbani[5]**

1-M.Sc. Graduate of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran
2 and 3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran,
(Corresponding author: M.nazari@asnrukh.ac.ir)
5- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
Received: 17 Jun, 2022 Accepted: 16 August, 2022

## Extended Abstract

**Introduction and Objective:** Phytoestrogens are herbal estrogens with estrogen-like functions and structures. The estrogen hormone has an important role in the process of the synthesis of egg white proteins in the avian oviduct. *Vitex agnus-castus* (VAC) is a native plant of the middle Asian, southern European, and Mediterranean countries. This plant has numerous uses in traditional medicine and is traditionally used to treat many diseases in women. Previous studies have shown that VAC contains high levels of phytoestrogens. VAC consists of compounds such as vitexin, apigenin, and pendoltin, which are the most active phytoestrogen in VAC fruits. No study has been published so far on the effect of VAC on oviduct markers gene expression (ovalbumin (OVAL) and ovomucoid (OVM)). Hence, this study was performed to evaluate the effect of VAC fruits on gene expression for two oviduct markers OVAL and OVM of laying hens.

**Material and Methods:** A total of 90 leghorns (Hy-Line, W-36) laying hens on the second cycle of production (at 72 to 80 weeks old) were used in a completely randomized design with three treatments, five replicates and six hens per replivate. The treatments were various levels of VAC fruit powder including zero, 1, and 2% levels of VAC fruit powder per kg of diet. After extraction of total RNA, RNA quality was evaluated using Nanodrop and agarose gel electrophoresis and cDNA was synthesized using a Sinaclone kit. Eventually, gene expression was measured by the real-time qPCR method. In this method, $\boldsymbol{\beta}$-actin gene was used as a reference gene to normalize the gene expression data. To confirm the specificity of each primer, its melting curves were examined.

**Results:** Electrophoresis of the PCR products showed the 60, 133, and 150-bp fragments for OVAL, OVM, and Beta-actin, respectively. Melting peaks analysis on the PCR products for all primers confirmed minimal primer-dimers and primer specificity. The results of the real-time qPCR method indicated that supplementation of VAC fruits powder at levels 1 and 2 to the diet of laying hens has no effect on the expression of OVAL and OVM genes of laying hens in the second production cycle.

**Conclusion:** Therefore, Adding VAC fruit powder to the diet of laying hens is not expected to increase egg production in laying hens. Therefore, VAC supplementation is not recommended to the diet of laying hens.

**Keywords:** Gene expression, Hens, Ovalbumin, Vitex

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-12-28 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.38.15.7 ]
[ DOI: 10.52547/rap.13.38.138 ]