



تاثیر عصاره الکلی استویا (*Stevia rebaudiana*) بر عملکرد و پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی

زهرا بشارتی^۱، مهرداد محمدی^۲، محمد روستایی علی‌مهر^۳ و یوسف حمید اوغلی^۳

۱ و ۳- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه گیلان
۲- دانشیار، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: mohammadi@guilan.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۴

چکیده

هدف این تحقیق بررسی تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی گیاه استویا بر عملکرد و سیستم ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی بود. تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه از سویه تجاری راس ۳۰۸ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار بررسی شدند. به آب مصرفی تیمارها به ترتیب مقادیر صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ استویا در هر لیتر، از روز ۳ تا ۴۲ پرورش افزوده شد. مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی و نسبت اجزای لاشه به وزن زنده اندازه‌گیری شد. پاسخ ایمنی هومورال با اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی سرم در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پرورش در واکنش به تزریق عضلانی ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) در روزهای ۱۲ و ۲۹ پرورش تعیین شد. جوجه‌ها واکسن نیوکاسل را در ۱، ۶، ۱۸ و ۲۹ روزگی دریافت کردند و در ۴۲ روزگی عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل با روش HI تعیین شد. نتایج نشان داد که عصاره الکلی استویا تأثیر معنی‌داری بر عملکرد تولیدی نداشت ($P > 0/05$). همه تیمارهای دریافت کننده عصاره استویا باعث افزایش عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل شدند ($P < 0/05$). تیمارهای دریافت کننده ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره، نسبت به تیمار شاهد عیار آنتی‌بادی بیش‌تری علیه SRBC داشتند ($P < 0/05$). در شرایط این تحقیق عصاره الکلی برگ استویا تأثیر معنی‌داری بر عملکرد تولیدی جوجه‌ها نداشت ولی پاسخ‌های ایمنی هومورال را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: استویا، عملکرد، ایمنی هومورال، جوجه گوشتی

مقدمه

است. پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌تواند توسط عوامل متعددی از جمله برخی ترکیب‌های موجود در باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و نیز محصولات مصنوعی تنظیم شود. گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از منابع غنی تنظیم‌کننده‌های سیستم ایمنی^۱ هستند. مطالعات فراوانی در مورد اثر تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی گیاهان دارویی در کشورهای با سابقه طب سنتی صورت گرفته است. در کشور ما به‌رغم گنجینه غنی طب سنتی ایران و منابع گیاهان دارویی متأسفانه کم‌تر به این موضوع پرداخته شده است (۱۷).

استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاهی از خانواده Asteraceae، چند ساله و بومی نواحی شمالی آمریکای جنوبی است و به‌طور وحشی در سرزمین‌های بلند مناطق مرزی بین برزیل و پاراگوئه می‌روید و در این مناطق به گیاه برگ عسلی معروف است. ماده شیرین کننده آن که استویوزید^۲ نامیده می‌شود، کالری‌زا نیست و جذب دستگاه گوارش نمی‌شود. آزمایش‌ها نشان داده‌اند که این گیاه حاوی استرول، فلاونوئید، تری‌ترین، مونوترین، سسکوئی‌ترین، تانن و کلروفیل بوده (۷، ۱) و

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه حیوانات، به‌عنوان محرک‌های رشد ضد میکروبی (AGP)^۱، جهت بهبود فراسنجه‌های عملکردی حیوانات و پیش‌گیری از بیماری‌ها سودمند است. اما تهدید امنیت زیستی برای سلامت انسان و حیوان، ناشی از افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها و تجمع بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در تولیدات دامی و محیط، باعث اعتراض گسترده برای حذف AGP از جیره حیوانات شده است. اتحادیه اروپا در منع کامل مصرف همه AGP از ژانویه ۲۰۰۶ پیش‌گام بوده است، درحالی‌که با توجه به مقررات EC ۱۸۳۱/۲۰۰۳^۲ در مورد افزودنی‌ها در خوراک، کوکسیدیاواستات‌ها و هیستومونوستات‌ها نیز باید کم‌کم تا اواخر سال ۲۰۱۲ حذف شوند. در نتیجه، تقاضا برای محصولات جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها که می‌توانند به‌عنوان عوامل پیش‌گیری‌کننده و محرک رشد استفاده شوند، بسیار زیاد است (۱۵).

تعدیل یا تنظیم پاسخ‌های ایمنی به‌منظور بهبود و کنترل بیماری‌ها، سال‌ها است که مورد توجه محققان

1- Antimicrobial growth promoters
4- Stevioside

2- European Commission

3- Immunomodulator

پنج تیمار آزمایشی وجود داشت که به هر یک ۴ تکرار شامل ۱۰ قطعه جوجه گوشتی (به‌صورت مخلوط دو جنس) اختصاص یافت. تیمارها به‌ترتیب مقادیر صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره الکلی برگ استویا در هر لیتر آب مصرفی از روز ۳ تا ۴۲ پرورش دریافت کردند. آب و خوراک به‌صورت آزاد در اختیار پرندگان قرار گرفت. دمای سالن در هفته اول پرورش ۳۳-۳۱ درجه سلسیوس بود و با افزایش سن به ازای هر هفته ۲-۱/۵ درجه کاهش یافت. برنامه نوردهی تا ۳ روز اول به‌صورت ۲۴ ساعت روشنایی بود و از روز سوم تا پایان دوره ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت تاریکی اعمال شد. شروع ساعت خاموشی همزمان با تاریک شدن هوا صورت گرفت. جیره غذایی جوجه‌ها با توجه به ترکیب مواد خوراکی پیشنهادی توسط انجمن تحقیقات ملی (NRC, 1994) و با استفاده از احتیاجات غذایی سویه راس ۳۰۸ تهیه شد (جدول ۱). مصرف خوراک روزانه و افزایش وزن روزانه تعیین گردید و ضریب تبدیل غذایی محاسبه شد.

در روزهای ۱۲ و ۲۹ پرورش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲۵ درصد گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) در بافر فسفات با استفاده از سرنگ انسولین به عضله سینه تمام جوجه‌ها تزریق شد (۱۳). خون‌گیری از جوجه‌ها برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی همورال در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پرورش انجام گرفت. پس از لخته شدن نمونه‌های خون، سرم آنها جدا و به‌مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ و برای انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی تولید شده علیه SRBC تزریقی، نمونه‌های سرم از حالت فریز خارج و جهت غیر فعال شدن سیستم کمپلمان به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس قرار داده شدند و با استفاده از روش هم‌آگلوتیناسیون (HA) عیار آنها تعیین شد (۴). جوجه‌ها واکسن نیوکاسل را در ۱ (روغنی - تزریقی)، ۶ (B1 - قطره چشمی) و ۱۸ و ۲۹ (لاسوتا - آشامیدنی) روزگی دریافت کردند و در روز ۴۲ پرورش خون‌گیری انجام شد و عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل با روش HI تعیین شد (۱۹). در ۴۲ روزگی ۲ جوجه از هر تکرار کشتار و اجزای لاشه شامل سینه، ران، بال، چربی بطنی، بورس و تیموس با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۱ گرم توزین شد و نسبت وزن آنها به وزن زنده محاسبه شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS (رویه GLM) بر اساس طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (۲۱) و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۵ درصد انجام شد.

وجود ترکیبات فنولی در برگ‌ها و کالوس^۱ این گیاه با خاصیت مؤثر آنتی‌اکسیدانی، قادر است رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و موجب خاصیت درمانی استویا شود (۲۲). اثرات ضد توموری (۱۲)، ضد باکتریایی، ضد ویروسی (۱۰) و ضد قارچی استویا ثابت شده و همچنین گزارش شده این گیاه اثرات التیام‌آوری روی آسیب‌های پوستی شامل زخم، بریدگی و خراش داشته و قادر به کاهش علائم سرماخوردگی و آنفلوانزا است (۹). گزارش شده استفاده از سطوح مختلف استویا در جیره، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی را بهبود نداد ولی باعث افزایش وزن جوجه‌های دریافت‌کننده استویا در دوره آغازین شد (۲۴). تحقیق دیگری نشان داده استفاده از برگ استویا در جیره جوجه‌های گوشتی موجب افزایش مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی در دوره رشد شد (۲).

گزارش شده مکمل کردن جیره با استویوزاید تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل جوجه‌های گوشتی نداشت. همچنین بیان شده تزریق استویوزاید در تخم‌مرغ، وزن و کیفیت جوجه‌ها، وزن قلب، کبد، طحال، بورس و گناد آنها را تحت تأثیر قرار نداد (۴).

با توجه به خواص مختلف استویا و نظر به این‌که تحقیقات کمی در مورد تأثیر گیاه استویا در طیور انجام شده و تاکنون تأثیر آن بر سیستم ایمنی جوجه‌ها بررسی نشده است، در این تحقیق تأثیر عصاره الکلی برگ استویا بر عملکرد تولیدی و پاسخ ایمنی همورال جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای عصاره‌گیری از گیاه استویا در هر مرحله مقدار ۱۰۰ گرم از پودر برگ خشک شده (تهیه شده از شرکت گلساران شمال) در داخل بشر ریخته و ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه شد. به‌مدت ۳ ساعت توسط شیکر تکان داده شد و پس از آن به‌مدت یک شبانه روز در محیط تاریک نگهداری شد. سپس محلول به‌دست آمده از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و ۱۰۰ mL آب مقطر به آن افزوده شد. پس از اتمام این مراحل محلول به‌دست آمده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی^۲ در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و سرعت ۶۰ دور در دقیقه تغلیظ و اتانول آن خارج و عصاره خالص تهیه شد. عصاره استخراج شده به‌صورت مایع بود و برای حفاظت در برابر نور در بطری‌های دودی ریخته شد (۱۱). آزمایشی با استفاده از ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه تجاری راس ۳۰۸ به‌مدت ۴۲ روز در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد.

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین، رشد و پایانی

دوره‌های پرورش			ترکیب شیمیایی	دوره‌های پرورش			اجزای خوراک (درصد)
پایانی	رشد	آغازین		پایانی	رشد	آغازین	
۳۰/۲۰	۲۹/۴۰	۲۸/۳۷	انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۶۴/۴	۶۱/۵	۵۸/۷	دانه ذرت
۱۸/۳	۱۹/۶	۲۱/۲	پروتئین (%)	۲۹	۳۲/۴	۳۵/۵۲	کنجاله سویا
۰/۹۰	۰/۹۶	۱/۰۰	کلسیم (%)	۲/۸	۲/۰۵	۱/۵	روغن گیاهی
۰/۴۵	۰/۴۸	۰/۵۰	فسفر قابل دسترس (%)	۱/۸۹	۱/۹۵	۲/۱۵	دی کلسیم فسفات
۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰	کلر (%)	۰/۸	۰/۸۵	۰/۷۶	کربنات کلسیم
۰/۱۶	۰/۱۷	۰/۲۰	سدیم (%)	۰/۲۲	۰/۲	۰/۲	نمک خوراکی
۱/۰۵	۱/۱۰	۱/۲۰	لیزین (%)	۰/۱۶	۰/۱۵	۰/۱۵	جوش شیرین
۰/۳۹	۰/۴۴	۰/۴۶	متیونین (%)	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل معدنی ^۱
۰/۸۲	۰/۸۴	۰/۸۹	متیونین + سیستین (%)	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینی ^۲
				۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۲	دی ال متیونین
				۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۲۶	لیزین هیدروکلراید

۱- هر کیلوگرم مکمل مواد معدنی حاوی: منگنز (اکسید منگنز ۰/۶۲) ۱۶ گرم، آهن (سولفات آهن ۰/۲۰) ۲۵ گرم، روی (اکسید روی ۰/۷۷) ۱۱ گرم، مس (سولفات مس ۰/۲۵) ۴ گرم، ید (کلسیم یدات ۰/۶۲) ۰/۱۶ گرم، سلنیوم (۰/۱) ۲ گرم.

۲- هر کیلوگرم مکمل ویتامینی حاوی ویتامین A (۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر گرم) ۱/۸ گرم، ویتامین B₁ (۰/۹۸/۸) ۰/۱۸ گرم، ویتامین B₆ (۰/۹۸/۵) ۰/۳ گرم، ویتامین B₁₂ (۰/۱) ۰/۱۵ گرم، ویتامین D₃ (۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی بر گرم) ۰/۴ گرم، ویتامین E (۵۰۰ واحد بین‌المللی بر گرم) ۳/۶ گرم، ویتامین K₃ (۰/۵۰) ۰/۴ گرم، ویتامین B₉ (۰/۸۰) ۰/۱۲۵ گرم، ویتامین B₅ (۰/۹۹) ۳ گرم، ویتامین H₂ (۰/۲) ۰/۵ گرم.

نتایج و بحث

مورد طیور انجام شده است. گزارش شده استفاده از ۸۴ ppm استویا در جیره جوجه‌های گوشتی تأثیر معنی‌داری روی عملکرد تولیدی نداشت (۲۴). همچنین بیان شده اختلاف چشم‌گیری در افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی مرغ‌های تغذیه شده با ۶۶۷ میلی‌گرم استویوزاید نسبت به گروه شاهد وجود نداشت (۴). نتایج این تحقیق با گزارش اته و همکاران (۲) که نشان دادند استفاده از ۲ درصد پودر استویا و ۱۳۰ ppm استویوزاید در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره رشد باعث افزایش چربی محوطه شکمی شد، مطابقت ندارد. آنها بیان کردند استفاده از برگ استویا و استویوزاید تقاضا برای مصرف خوراک را در دوره رشد افزایش داده و افزایش مصرف خوراک و تجمع چربی در ناحیه شکمی شد.

نتایج نشان داد (جدول ۲ و ۳) که عصاره الکلی استویا تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن روزانه، ضریب تبدیل غذایی، وزن سینه، ران، بال، چربی شکمی، بورس و تیموس نداشت ($P > 0.05$). گزارش شده استفاده از استویا به‌عنوان یک افزودنی در خوراک بچه خوک‌ها اثر کمی داشت و تغذیه بچه خوک‌های تازه از شیر گرفته شده با جیره حاوی ۸۳/۳، ۱۶ و ۳۳۴ ppm استویا در مقایسه با ساکارز اثری روی خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک نداشت (۱۶). همچنین گزارش شده است که میزان خوراک مصرفی خوک‌هایی که جیره آنها حاوی ۱۶۷ ppm استویوزاید بود در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت (۴). در این زمینه مطالعات کمی در

جدول ۲- تاثیر سطوح مختلف عصاره استویا بر مصرف خوراک روزانه (گرم)، افزایش وزن روزانه (گرم) و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی

تیمار	آغازین ۱ تا ۱۰ روزگی	رشد ۱۱ تا ۲۴ روزگی	پایانی ۲۵ تا ۴۲ روزگی	کل دوره ۱ تا ۴۲ روزگی
(مصرف خوراک روزانه (گرم))				
شاهد	۲۶/۲۰	۷۲/۴۸	۱۳۴/۲۰	۸۲/۹۹
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۶/۰۳	۷۳/۰۹	۱۳۵/۰۴	۸۳/۴۸
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۵/۸۷	۷۱/۰۵	۱۳۳/۹۰	۸۲/۳۵
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۴/۷۶	۷۲/۲۶	۱۳۴/۴۹	۸۲/۷۰
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۴/۹۷	۷۲/۶۳	۱۳۳/۵۱	۸۲/۴۶
SEM	۰/۳۲	۰/۳۱	۰/۵۴	۰/۳۱
P-value	۰/۵۳۴	۰/۳۱۲	۰/۹۳۸	۰/۸۱۹
(افزایش وزن روزانه (گرم))				
شاهد	۲۱/۹۸	۴۴/۹۷	۷۴/۱۰	۵۰/۱۹
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۴/۱۲	۴۶/۲۶	۷۴/۹۸	۵۱/۴۶
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۳/۴۸	۴۷/۰۸	۷۶/۰۸	۵۲/۰۰
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۲/۲۶	۴۶/۲۵	۷۵/۸۵	۵۱/۳۶
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۲۲/۲۹	۴۵/۹۳	۷۵/۱۵	۵۰/۹۹
SEM	۰/۴۴	۰/۶۶	۰/۴۹	۰/۲۵
P-value	۰/۵۱۵	۰/۹۲۱	۰/۷۷۶	۰/۳۴۲
(ضریب تبدیل غذایی (گرم))				
شاهد	۱/۱۹	۱/۶۳	۱/۸۲	۱/۶۵
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۰۹	۱/۵۹	۱/۸۰	۱/۶۲
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۱۱	۱/۵۲	۱/۷۶	۱/۵۸
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۱۲	۱/۵۶	۱/۷۷	۱/۶۱
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۱۲	۱/۵۸	۱/۷۸	۱/۶۲
SEM	۰/۰۱۸	۰/۰۲۳	۰/۰۱۱	۰/۰۱۰
P-value	۰/۵۰۸	۰/۷۱۵	۰/۶۴۶	۰/۲۷۶

جدول ۳- تاثیر سطوح مختلف عصاره استویا بر ترکیب لاشه جوجه‌های گوشتی (بر حسب درصد وزن زنده)

تیمار	لاشه قابل طبخ	سینه	ران	بال	چربی بطنی	بوس	تیموس
شاهد	۵۹/۸۹	۲۵/۵۸	۲۶/۱۹	۶/۱۵	۱/۶۷	۰/۰۶۸	۰/۶۹۸
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۶۰/۹۹	۲۴/۷۳	۲۷/۳۹	۶/۰۸	۱/۲۶	۰/۰۵۵	۰/۵۹۰
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۵۹/۶۱	۲۵/۹۰	۲۷/۱۱	۵/۷۸	۱/۴۸	۰/۰۶۵	۰/۶۸۸
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۶۲/۰۹	۲۴/۸۱	۲۵/۶۹	۵/۸۰	۱/۴۴	۰/۰۹۰	۰/۷۶۸
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۶۱/۳۳	۲۵/۴۸	۲۷/۴۲	۵/۶۲	۱/۲۱	۰/۰۷۵	۰/۶۷۵
SEM	۱/۰۱	۰/۳۷	۰/۴۱	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۳۰
P-value	۰/۹۵۰	۰/۸۵۸	۰/۶۱۷	۰/۶۴۳	۰/۳۰۶	۰/۴۵۵	۰/۵۰۹

و تیمارهای ۱ و ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). مقایسه میانگین عیار آنتی‌بادی تام در ۴۲ روزگی نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمارهای حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره وجود داشت ($P < 0.05$). همچنین تیمارهای دریافت‌کننده ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره، عیار آنتی‌بادی بالاتری در مقایسه با تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر داشتند ($P < 0.05$). اختلاف میانگین عیار آنتی‌بادی در تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر عصاره در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

میانگین عیار IgG در ۲۸ روزگی، بین تیمار شاهد با تیمار ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استویا اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$)، اما با سایر تیمارها، اختلاف معنی‌دار داشت، به طوری که مصرف ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره استویا باعث افزایش عیار IgG شد. مقایسه عیار IgG در

میانگین عیار Anti SRBC تام، ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین M در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پرورش در جدول ۴ و میانگین عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در ۴۲ روزگی در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین عیار آنتی‌بادی تام علیه SRBC در ۲۸ روزگی نشان داد بین تیمار شاهد با تیمارهای حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). در دو تیمار ذکر شده عیار آنتی‌بادی نسبت به شاهد بیش‌تر بود. اختلاف میانگین عیار تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر عصاره نسبت به شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). مقایسه میانگین عیار آنتی‌بادی تام در ۳۵ روزگی نشان داد تیمارهای دریافت‌کننده ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره نسبت به شاهد عیار آنتی‌بادی تام بیش‌تری داشتند ($P < 0.05$) و تفاوت تیمار دریافت‌کننده ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره با تیمار شاهد

در ۲۸ روزگی، عیار IgM بیش‌تری در مقایسه با تیمار ۱ میلی‌لیتر عصاره داشت. عیار IgM در ۳۵ روزگی افزایش معنی‌داری در تیمارهای ۱ و ۱/۵ میلی‌لیتر عصاره نشان داد ($P < 0.05$). اختلاف میانگین عیار IgM در تیمارهای دریافت‌کننده ۰/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره نسبت به شاهد در ۳۵ روزگی معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). مقایسه میانگین عیار IgM در ۴۲ روزگی اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با سایر تیمارها نشان نداد، همچنین تفاوت تیمارهای دریافت‌کننده عصاره استویا با یکدیگر معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

۳۵ روزگی تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمار دریافت‌کننده ۲ میلی‌لیتر عصاره نشان داد ولی با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). عیار IgG در ۴۲ روزگی افزایش معنی‌داری در تیمارهای ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره نشان داد ($P < 0.05$). اختلاف میانگین عیار IgG در تیمارهای دریافت‌کننده ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر عصاره نسبت به شاهد در ۴۲ روزگی معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

مقایسه میانگین عیار IgM در ۲۸ روزگی اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با سایر تیمارها نشان نداد ($P > 0.05$). ولی تیمار دریافت‌کننده ۲ میلی‌لیتر عصاره

جدول ۴- تاثیر مقادیر مختلف عصاره الکلی استویا بر میزان عیار Total Anti-SRBC، ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین M جوجه‌های گوشتی (\log_2)

تیمار	۲۸ روزگی	۳۵ روزگی	۴۲ روزگی
Total Anti-SRBC			
شاهد	۳/۲۵ ^c	۴/۵۸ ^c	۳/۶۷ ^b
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۳/۵۰ ^{bc}	۵/۰ ^{bc}	۳/۹۳ ^d
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۳/۶۷ ^{abc}	۵/۶۷ ^{ab}	۳/۷۵ ^b
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۳/۹۳ ^{ab}	۵/۷۵ ^{ab}	۴/۶۷ ^a
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۴/۰۸ ^a	۵/۸۳ ^a	۴/۸۳ ^a
SEM	۰/۰۸۹	۰/۱۵۱	۰/۱۳۳
P-value	۰/۰۰۷	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰۸
IgG			
شاهد	۱/۰۸ ^b	۳/۴۳ ^b	۲/۵۰ ^b
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۴۳ ^{ab}	۳/۷۵ ^{ab}	۲/۲۵ ^b
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۷۵ ^a	۳/۹۳ ^{ab}	۲/۵۰ ^b
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۶۷ ^a	۴/۰ ^{ab}	۳/۳۳ ^a
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۶۷ ^a	۴/۲۵ ^a	۳/۴۳ ^a
SEM	۰/۰۸۶	۰/۱۰۱	۰/۱۳۸
P-value	۰/۰۵۲	۰/۰۵۱	۰/۰۰۳
IgM			
شاهد	۲/۱۷ ^{ab}	۱/۱۷ ^b	۱/۱۷
۰/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲/۰۸ ^{ab}	۱/۲۵ ^b	۱/۶۷
۱ mL عصاره در یک لیتر آب	۱/۹۳ ^b	۱/۷۵ ^a	۱/۲۵
۱/۵ mL عصاره در یک لیتر آب	۲/۲۵ ^{ab}	۱/۷۵ ^a	۱/۳۳
۲ mL عصاره در یک لیتر آب	۲/۴۳ ^a	۱/۵۸ ^{ab}	۱/۴۲
SEM	۰/۰۶۱	۰/۰۸۲	۰/۰۸۰
P-value	۰/۰۳۳	۰/۰۳۲	۰/۳۴۸

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

($P < 0.05$) و همه تیمارهای دریافت‌کننده عصاره استویا باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل شدند ($P < 0.05$).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در ۴۲ روزگی نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با سایر تیمارها وجود داشت

جدول ۵- تاثیر سطوح مختلف عصاره استویا بر عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در ۴۲ روزگی (\log_2)

تیمار	۴۲ روزگی
شاهد	۳/۷۵ ^b
۰/۵mL عصاره در یک لیتر آب	۵/۷۵ ^a
۱mL عصاره در یک لیتر آب	۵/۵۰ ^a
۱/۵mL عصاره در یک لیتر آب	۶/۰۹ ^a
۲mL عصاره در یک لیتر آب	۶/۰۹ ^a
SEM	۰/۲۴۸
P-value	۰/۰۰۲

حروف غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

فراوانی لنفوسیت‌ها را محدود کرده و پاسخ‌های ایمنی را کاهش و در نتیجه بیماری‌ها و تلفات را افزایش می‌دهد (۳). آزمایش‌های انجام شده (*In vitro*) روی عصاره الکلی برگ استویا نشان داد که این گیاه دارای مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی بوده و قادر به مهار و دفع رادیکال‌های آزاد و پایان دادن به واکنش‌های زنجیره‌ای آنها است و به‌عنوان یک منبع قابل دسترس از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشد (۲۲).

گزارش شده عصاره الکلی برگ استویا فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در مهار رادیکال‌های DPPH^۱، هیدروکسیل، نیتریک اکسید، آنیون سوپر اکسید و هیدروژن پروکسید در مقایسه با نمونه استاندارد اسید آسکوربیک دارد. بیان شده یک رابطه خطی و معنی‌دار بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی عصاره برگ استویا وجود دارد و ترکیبات فنولی شرکت‌کنندگان اصلی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (۲۵). همچنین عنوان شده ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها و متعاقب آن افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) می‌شوند این ترکیب یک مولکول مهم تنظیم کننده سیستم ایمنی محسوب می‌شود و سبب تکثیر و تمایز سلول‌های T کمکی (Th-1) و همچنین باعث مرگ عوامل عفونی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و کرم‌ها می‌شود (۲۰، ۸).

مشخص شده عصاره استویا به‌طور مؤثر قادر به مهار رتروویروس انسانی (HRV)^۲، تسکوویروس خوکی و ویروس هرپس گاوی^۵ از طریق بلوک کردن اتصال ویروس به سلول‌های مستعد بوده و دارای خاصیت ضد باکتری است. گزارش شده استویزاید خاصیت ضد توموری داشته و قادر به مهار سرطان پوست در موش می‌باشد (۱۲، ۱۰). گزارش شده ۱ میلی‌مول از استویزاید اثر مهار روی لیپوپلی‌ساکاریدهای القاء کننده آزادسازی TNF- و IL-1 داشته است. TNF- و IL-1 سیتوکین‌هایی هستند که عمدتاً توسط ماکروفاژها ترشح می‌شوند. TNF- در تعداد زیادی از واکنش‌های ایمنی و التهابی دخالت دارد و IL-1 عمده‌ترین محرک سلول‌های T کمک‌کننده (Th-2) است و همچنین موجب بروز واکنش فاز حاد می‌شود. تحقیقات انجام شده روی موش افزایش فعالیت فاگوسیتوز، عیار آنتی‌بادی، تحریک سلول‌های T و B و به تأخیر انداختن ازدیاد حساسیت را با تجویز استویزاید (مقادیر ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) گزارش کرده‌اند (۲۳، ۱۴).

گیاهان دارویی و عصاره آنها دارای فعالیت‌های زیستی متنوعی از قبیل خاصیت ضد میکروبی، ضد انگلی، ضد ویروسی و خواص آنتی‌اکسیدانی در پرندگان

با تحریک سیستم ایمنی توسط پروتئین خارجی می‌توان واکنش آنتی‌بادی بر ضد این پروتئین را مشاهده کرد (۵). گزارش شده اگر خون حیوانی به حیوان دیگر که از نظر ژنتیکی با یکدیگر مشابه نیستند انتقال یابد، آنتی‌ژن موجود در سطح گلبول‌های قرمز واکنش ایمنی را در دریافت کننده برمی‌انگیزد و در نتیجه گلبول قرمز خون تزریق شده تحت تأثیر آنتی‌بادی و مکمل در داخل عروق پاره شده و در خارج عروق به‌وسیله اپسونین توسط سیستم ماکروفاژ منهدم می‌شود (۲۳).

گزارش شده پاسخ حیوان در برابر تزریق دوم آنتی‌ژن نسبت به پاسخ اول بسیار متفاوت است، واکنش سریع ایجاد می‌شود و عیار آنتی‌بادی بیش‌تر و دوام آن طولانی‌تر است. حتی اگر پاسخ حیوان در برابر تزریق اول ضعیف و غیر قابل تشخیص باشد، تزریق دوم سریع و با دوام خواهد بود. خصوصیات پاسخ‌گویی معرف آن است که دستگاه پادتن‌ساز بدن می‌تواند برخورد اول با آنتی‌ژن را به خاطر داشته باشد. به این دلیل، واکنش ثانویه را پاسخ آنامستیک^۱ (در زبان یونانی به معنای خاطره) می‌نامند (۲۳).

چون تزریق ثانویه (پس از دومین تزریق SRBC)، به‌صورت غالب با پاسخ قوی‌تری همراه بوده و علاوه بر آن با افزایش سن جوجه‌ها سیستم ایمنی آنها کامل‌تر می‌شود، بنابراین می‌توان انتظار داشت که پاسخ ثانویه به‌صورت مشهودتری تفاوت‌ها را نشان دهد (۱۸). مقایسه تزریق اولیه و ثانویه میانگین عیار آنتی‌بادی تام و IgG علیه گلبول قرمز گوسفند نشان داد که آنتی‌بادی تام و IgG هفت روز بعد از تزریق ثانویه (۳۵ روزگی) بیش‌ترین مقدار را نشان دادند.

ایمونوگلوبولین M عیار بیش‌تری در پاسخ اولیه داشت و در پاسخ ثانویه کاهش یافت. روندکاهشی بعد از تزریق ثانویه به‌دلیل افزایش سریع مقدار IgG خون است که به‌عنوان یک عامل بازدارنده تولید IgM می‌تواند عمل کند، از این رو با افزایش تولید IgG در تزریق ثانویه، IgM روندکاهشی را پیش خواهد گرفت. در نتیجه کاهش عیار آنتی‌بادی حساس به ۲- مرکاپتواتانول در فاز دوم تزریق به‌دلیل افزایش عیار IgG است که در تزریق دوم، آنتی‌بادی غالب پاسخ را تشکیل می‌دهد و اثر بازدارندگی بر تولید IgM دارد (۱۸).

نتایج این تحقیق نشان داد تیمارهای دریافت‌کننده ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره الکلی استویا دارای بیش‌ترین پاسخ به SRBC تزریقی و بیش‌ترین عیار ایمونوگلوبولین G بودند. در حقیقت در زمان تزریق گلبول قرمز گوسفند استویا به‌عنوان محرک، تکثیر بهتر سلول‌های ایمنی تولیدکننده آنتی‌بادی علیه SRBC را موجب شد. گزارش شده کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها

1- Anamnestic
4- Porcine teschovirus

2- Diphenylpicrylhydrazyl
5- Bovine herpesvirus

3- Human retrovirus

هستند. آنها همچنین باعث تحریک سیستم ایمنی و هورمونی می‌شوند. ترکیبات فنولی با خاصیت ضد میکروبی شناخته شده‌اند و از آنجایی که بافت هدف آنها دیواره سلولی باکتری است بر ساختار دیواره سلولی اثر می‌گذارند. آنها با تغییر نفوذپذیری برای یون‌هایی مانند H^+ و K^+ روی غشای سیتوپلاسمی تأثیر می‌گذارند. کاهش گرادیان یونی منجر به تخریب فرآیندهای ضروری سلول شده و امکان تراوش اجزای سلولی را فراهم نموده و سبب عدم تعادل مایعات، تخریب غشا، جلوگیری از سنتز ATP و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (۱۵). آنتی‌اکسیدان‌ها با دادن الکترون اضافی در طول چرخه‌های تولید انرژی قادر به کنترل و مهار تولید رادیکال‌های آزاد هستند، در نتیجه از پراکسیداسیون چربی‌های غشا جلوگیری کرده و مانع از تضعیف سیستم ایمنی می‌شوند. مشخص شده که کمبود آنتی‌اکسیدان‌ها در داخل سلول موجب اختلال در عملکرد لنفوسیت‌ها می‌شود (۳).

گزارش شده استویوزاید به همراه استویوبیوزاید، ایزواسترویل و استویول، فسفریلاسیون اکسیداتیو را در میتوکندری کبد موش مهار کرده و قادر به مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو روی ATP_{ase} ، NADH اکسیداز، سوکسینات-اکسیداز، سوکسینات دهیدروژناز و گلوتامات دهیدروژناز بودند. استویول گلیکوزاید، استویوزاید، ربادیوزاید (A و C) و دولکوزاید A که در استویا موجودند، فعالیت مهاری زیادی علیه TPA^1

در شرایط این تحقیق عصاره الکلی برگ استویا تأثیر معنی‌داری بر عملکرد تولیدی جوجه‌های گوشتی نداشت، ولی پاسخ‌های ایمنی هومورال را در آنها بهبود بخشید. به‌طور کلی می‌توان گفت مقادیر ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر عصاره استویا در هر لیتر آب آشامیدنی اثر بیش‌تری بر بهبود سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی داشت.

منابع

1. Arya, A., K. Sandeep and M.S. Kasana. 2012. Anti-inflammatory activity of in vitro regenerated calli and in vivo plant of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton. International Journal of Science and Research, 2: 1-5.
2. Atteh, J.O., O.M. Onagbesan, K. Tona, E. Decuyper, J.M.C. Geuns and J. Buyse. 2008. Evaluation of supplementary Stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) leaves and Stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 92: 640-649.
3. Bendich, A. 1993. Physiological role of antioxidant in the immune system. Journal of Dairy Science, 76: 2789-2794.
4. Buyse, J.G. and J.M.C. Geuns. 2004. The metabolism of Stevioside by animals: chickens and pigs. In: proc. 1st symposium: safety of Stevioside. KULeuven, April 16th 2004. Euprint ed., Heverless. pp: 35-50.
5. Cheng, S., M.F. Rotschild and S.J. Lamont. 1991. Estimates of quantitative genetic parameters of immunological traits in the chicken. Journal of Poultry Science, 70: 2023-2027.
6. Erf, G.F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. Poultry Science, 83: 580-590.
7. Gardana, C., M. Scaglianti and P. Simonetti. 2010. Evaluation of Steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1217: 1463-1470.
8. Goel, V., C. Chang, J.V. Slama, R. Barton, R. Bauer, R. Gahler and T.K. Basu. 2002. Alkylimidof echinaceapurpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats. International Journal of Immunopharmacology, 2: 381-387.
9. Gujral, S.R. 2004. Stevia 0% calorie, 100% sweet, 100% nature. Science Tech Entrepreneur, 12: 1-7.
10. Kedik, S.A., E.I. Yartsev and I.E. Stanishevskaya. 2009. Antiviral activity of dried extract of Stevia. Pharmaceutical Chemistry Journal, 43: 19-20.
11. Khosravi, R., J. JalaliSendi and M. Ghadamyari. 2010. Effect of *Artemisia annual*L. on deterrence and nutritional efficiency of lesser mulberry pyralid (*glyphodespylola*walker) (lepidoptera: pyralidae). Journal of Plant Protection Research, 50: 421-428.
12. Konoshima, T. and M. Takasaki. 2002. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. Pure and Applied Chemistry, 74: 1309-1316.

13. Kuehn, L.A., S.E. Price, C.F. Honaker and P.B. Siegel. 2006. Antibody response of chickens to sheep red blood cells: crosses among divergently selected lines and relaxed sublines. *Journal of Poultry Science*, 85:1338-1341.
14. Madan, S., S. Ahmad, G.N. Singh, K. Kohli, Y. Kumar, R. Singh and M. Garg. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1: 267-286.
15. Mohiti-Asli, M., S.A. Hosseini, A. Meimandipour and A. Mahdavi. 2010. *Phytogenics in animal nutrition* (Translation). *Animal Science Research Institute*, pp: 317.
16. Munro, P.J., A. Lirette, D.M. Anderson and H.Y. Ju. 2000. Effects of a new sweetener, stevia, on performance of newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 80: 529-531.
17. Naseri, M. 2004. *Iranian traditional medicine and its developing world health organization guide lines*. *Daneshvar, Shahed University*, 52: 53-66.
18. Nelson, N.A., N. Lakshmana and S.J. Lanont. 1995. Sheep red blood cell and burrcellaabortus antibody response chicken selected for multi trait immune competence. *Journal of Poultry Science*, 74: 1603-1609.
19. OIE. 2012. Chapter 2. 3. 14. Newcastle disease, in: *OIE terrestrial manual: manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal*. World Organistion for Animal Health. Paris. France.
20. Park, H.J., C.M. Lee, I.D. Jung, J.S. Lee, Y.I. Jeong, J.H. Chang, S.H. Chun, M.J. Kim, W. Choi, S.C. Ahn, Y.K. Shin, S.R. Yeom and Y.M. Pak. 2009. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immuno pharmacology*, 9: 261-267.
21. SAS Institute. 2004. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary. NC.
22. Shukla, S., A. Mehta and V. K. Bajpai. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2338-2343.
23. Tizard, I. 2012. *Veterinary immunology*. English editon. Press of saunders Philadelphia, pp: 568.
24. Wood, D.J., A. Lirette, D.C. Crober and H.Y. Ju. 1996. The effect of *Stevia* as a feed sweetener on weight gain and feed consumption of broiler chickens. *Canadian Journal of Animal Science*, 76: 267-269.
25. Zayova, E., I. Stancheva, M. Geneva, M. Petrova and L. Dimitrova. 2013. Antioxidant activity of in vitro propagated *Stevia rebaudiana*Bertoni plant of different origins. *Turkish Journal of Biology*, 37: 106-113.

Effect of Stevia (*Stevia Rebaudiana*) Alcoholic Extract on Performance and Humoral Immunity Response in Broilers

Zahra Besharati¹, Mehrdad Mohammadi², Mohammad Roostaei Ali-Mehr³
and Yousuf Hamidoghli³

1 and 3- M.Sc. and Associate Professor, University of Guilan

2- Associate Professor, University of Guilan (Corresponding author: mohammadi@guilan.ac.ir)

Received: October 5, 2013

Accepted: February 23, 2014

Abstract

The aim of this study was to survey the effects of different levels of Stevia alcoholic extract on performance and humoral immune system of broilers. Two hundred one-day chicks (Ross 308) were studied in a completely randomized design with 5 treatments, 4 replications and 10 chicks per replicate. The treatment groups received 0 (control), 0.5, 1, 1.5 and 2 mL/L of Stevia extract, in drinking water, during days 3 to 42. Daily feed intake, daily body weight gain, feed conversion ratio and carcass characteristics were measured. The birds were immunized by sheep red blood cell (SRBC) on days 12 and 29 of age and serum antibody levels produced in response to SRBC were measured on days 28, 35 and 42. Newcastle vaccine was given on days 1, 6, 18 and 29 to chicks and blood samples were collected at 42d. Antibody titer against Newcastle virus was determined by the HI method. Result indicated that Stevia alcoholic extract hadn't any significant effect on performance ($P>0.05$). All experimental groups increased antibody titer against Newcastle virus ($P<0.05$). Consumption of 1.5 and 2 mL Stevia extract increased anti SRBC titers ($P<0.05$). It is concluded that Stevia alcoholic extract had no significant effect on performance, but improved humoral immunity of broilers.

Keywords: Stevia (*Stevia rebaudiana*), Performance, Humoral immunity, Broiler chick