Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

# Comparison of the Effects of Different Levels of *Zataria multiflora* E*essence with Avilamycin and* Probiotic Based on Bacillus subtilis on Immune System and MUC2 Gene Expression in Broiler Chickens

**Hamidreza Seyedabadi**
Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: hseyedabadi@yahoo.com

**Khadijeh Nasiri**
Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Email: kh.nasiri@umz.ac.ir

**Said Abdoullah Hosseini**
Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: hosseini1355@gmail.com

**Zahra Roudbari**
* Corresponding Author: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. Tel: +989132483343, Email: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

## Abstract

### Objective

The aim of the present study was to compare the effects of two different levels of *Zataria multiflora* with Avilamycin antibiotic and probiotic based on Bacillus subtilis on humoral and cellular immunity and expression of MUC2 gene in broiler chickens of Arian strain.

### Materials and methods

This study was conducted in a completely randomized design with five experimental groups with 4 replicates and 25 observations in each replicate. Experimental groups included basal diet and basal diet containing 100 mg Bacillus subtilis, 150 mg avilamycin, 200 mg and 400 mg *Zataria multiflora* essence, respectively. In order to evaluate the humoral and cellular immunity, the antibody produced against the sheep's red blood cell, white blood cell differential counts and the volume percentage of red blood cells were

determined. Expression of MUC2 gene from the intestinal tissues was investigated by Real time PCR.

**Results**

The results showed that response to red blood cells of sheep, immunoglobulin G and M was not affected by experimental groups($p>0.05$). The number of white blood cells and the ratio of heterophil to lymphocyte were not affected by the experimental groups ($p>0.05$). The expression of MUC2 gene in the chickens that consumed the basal diet included *Zataria multiflora* was significantly increased compared with the control group.

**Conclusions**

The results showed that the use of *Zataria multiflora* essence could be having moderating effects on the immune system. *It*, by increasing the expression of MUC2 gene, could be having improving effect on the digestive system performance of broiler chickens.

**Keywords:** Broiler chickens, Immune system, MUC2 gene, Zataria multiflora.

**Citation**: Seyedabadi H, Nasiri K, Hosseini SA, Roudbari Z (2019) Comparison of the Effects of Different Levels of Zataria multiflora Eessence with Avilamycin and Probiotic Based on Bacillus subtilis on Immune System and MUC2 Gene Expression in Broiler Chickens. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 55-74.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 55-74.
DOI: 10.22103/jab.2019.13490.1115
Received: February 2, 2019; Accepted: April 4, 2019
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

# مقایسه تأثیر سطوح مختلف اسانس آویشن شیرازی با آویلامایسین و پربیوتیک بر پایه باسیلوس سوبتلیس بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن موسین در جوجه‌های گوشتی

**حمیدرضا سیدآبادی**

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ایمیل:hseyedabadi@yahoo.com

**خدیجه نصیری**

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. kh.nasiri@umz.ac.ir

**سیدعبدالله حسینی**

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ایمیل:hosseini1355@gmail.com

**زهرا رودباری**

*نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. تلفن:09132483343، ایمیل: Roudbari.zahra@ujiroft.ac.ir

**تاریخ دریافت: 1397/11/13، تاریخ پذیرش: 1398/01/15**

## چکیده

**هدف:** هدف از مطالعه حاضر مقایسه تأثیر دو سطح مختلف آویشن شیرازی با آنتی‌بیوتیک آویلامایسین و پروبیوتیک بر پایه باسیلوس سوبتیلیس بر عملکرد ایمنی هومورال و سلولی و بیان ژن MUC2 در جوجه‌های گوشتی سویه آرین بود.

**مواد و روش:** این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با 5 گروه آزمایشی مشتمل بر 4 تکرار و هر تکرار شامل 25 قطعه جوجه اجرا شد. گروه‌های آزمایشی شامل، جیره پایه و جیره پایه حاوی 100 میلی‌گرم باسیلوس سوبتیلیس ،150 میلی‌گرم آویلامایسین، 200 میلی‌گرم اسانس آویشن و 400 میلی‌گرم اسانس آویشن شیرازی، به ترتیب بودند. به منظور ارزیابی سیستم ایمنی هومورال و سلولی، عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گو سفند، شمارش تفریقی گلبول های سفید و در صد حجمی گلبول قرمز تعیین شدند. بیان ژن MUC2 بافت روده با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمنوگلبولین G و ایمنوگلبولین M تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار نگرفت($P>0.05$). تعداد گلبول‌های سفید و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار نگرفتند($P>0.05$). بیان ژن MUC2 در گروه جوجه‌هایی که با جیره پایه حاوی آویشن تغذیه شدند به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود($P<0.05$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که استفاده از اسانس آویشن شیرازی می‌تواند اثرات تعدیلی بر سیستم ایمنی داشته باشد. همچنین اسانس آویشن توسط افزایش بیان ژن MUC2 می‌تواند بر بهبود عملکرد سیستم گوارشی جوجه‌های گوشتی مؤثر باشد.

**کلمات کلیدی:** آویشن شیرازی، ژن موسین، جوجه گوشتی، سیستم ایمنی.

## مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن 5 قبل از میلاد تا تقریبا قرن 7 میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al. 2010). در اواخر دهه 80 میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده نشان دادند که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی هستند (Mohammadabadi & Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[1] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016). امروزه استفاده از افزودنی های خوراکی فیتوژنیک[2] در تولیدات دام و طیور به دلیل تأثیر مثبت بر بهبود وزن بدن، افزایش وزن بدن، میزان تبدیل خوراک، پاسخ ایمنی، وضعیت آنتی اکسیدانی، صفات لاشه و کیفیت همراه با کاهش مرگ و میر مورد استقبال گسترده قرار گرفته است (Farag et al. 2014; Alagawany et al. 2015a, b). استفاده از

1. DNA
2. Phytogenic feed additives

مکمل‌های داروئی مانند آنتی بیوتیک‌ها، پروبیوتیک ها و گیاهان دارویی در جیره‌های جوجه‌های گوشتی سبب بهبود وضعیت سیستم ایمنی (Hoffman-Pennesi & Wu 2010) و افزایش هضم و جذب مواد مغذی از طریق تحریک آنزیم‌های اندوژن مانند پروتئازها، آمیلاز و لیپازها (Al-Khdri 2013) می شود. علاوه بر این، گیاهان دارویی از طریق تغییر اکولوژی میکروبی روده کوچک باعث از بین رفتن باکتریهای مضر و تحریک فعالیت باکتری های مفید برای بدن می شوند بعبارتی دارای خواص پروبیوتیکی می‌با شند و اثرات مثبتی بر سلامت دستگاه گوارش و ایمنی بدن دارند(Gibson & Roberfroid 1995). دستگاه گوارش توسط لایه مخاطی که عمدتاً از گلیکوپروتئین‌های موسین[1] که به وسیله سلول‌های گابلت ترشح می شود، پوشیده شده است. گیاهان دارویی ممکن است از طریق تأثیر بر مورفولوژی روده از قبیل ضخامت دیواره روده، سطح ویلوس، ارتفاع و عمق کریپت ها، تراکم و اندازه سلول‌های گابلت نیز بر ساخت و ترشح موسین مؤثر باشند. MUC2 به عنوان یکی از مهمترین ژن‌های تولید کننده گلیکوپروتئین‌های موسین می‌باشد (Horn et al. 2009) که اختلال در بیان این ژن، روده را در برابر اسید معده، آنزیم‌های گوارشی و پاتوژن‌ها آسیب‌پذیر می‌کند (Montagne et al. 2004; Mountzouris et al. 2007). از این رو ارزیابی بیان سطوح این ژن می تواند به بعنوان یکی از اهداف تحقیقاتی در جهت بررسی بهبود وضعیت سیستم ایمنی در مواجه با عوامل پاتوژن و غیرپاتوژن قرار گیرد. با توجه به اینکه موسین بعنوان عامل حفاظتی مؤثر در جهت ورود پاتوژن‌ها به بخش‌های داخلی دستگاه گوارش عمل می‌کند، افزایش ترشح آنها در نتیجه مکمل‌سازی گیاهان دارویی به جیره می‌تواند از طریق بهبود وضعیت ایمنی بدن و بهبود جذب مواد مغذی در جوجه‌های دارای پتانسیل بالای رشد شرایط مناسبی برای سرعت رشد بالا و جلوگیری از بیماریها از جمله آسیت داشته باشد(Lee et al. 2004) و می‌تواند سبب بهبود وظایف روده از قبیل سرعت عبور محتویات دستگاه گوارش شود (Jamroz et al. 2005). گیاه آویشن با نام علمی تیموس ولگاریس[2] از تیره‌ی نعناع می‌باشد. فرآورده‌های حاصل از این گیاه در پیشگیری و درمان برخی از بیماری‌های دستگاه گوارش و عفونت های مجاری تنفسی استفاده می‌گردد (Hertrampf 2001 ; Sajad et al. 2013). کاراکرول و تیمول از عمده‌ترین ترکیب‌های آویشن به شمار می‌روند که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند (Wenk 2000). اثرات ضدکوکسیدیوزی، ضدقارچی، سانس آویشن که به دلیل ترکیبات فنولی موجود در آویشن می‌باشد اثبات شده است (Aeschbach et al. 1994; Hertrampf 2001). همچنین آویشن، غنی از فلاونوئید و ترپن می‌باشد که از طریق افزایش فعالیت ویتامین C باعث تقویت سیستم ایمنی می‌شود. آویشن با اثرات ضدباکتریایی خود به طور غیر مستقیم موجب تقویت سیستم ایمنی می شود (Fan & Chen 2001 ; Lee et al. 2003). تاکنون مطالعات اندکی در رابطه با مکمل سازی جیره جوجه های گوشتی با آویشن شیرازی بر عملکرد سیستم ایمنی آنها انجام گرفته است که نتایج متفاوتی از این مطالعات گزارش شده است. لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر مکمل‌سازی جیره جوجه‌های گوشتی با

1. Mucin
2. Thymus vulgaris

سطوح مختلف آویشن شیرازی بر عملکرد سیستم ایمنی و سطوح بیان ژن MUC2 در مقایسه با مکمل سازی جیره با آویلامایسین و پربیوتیک بر پایه باسیلوس سوبتلیس در جوجه‌های گوشتی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

**حیوانات:** در این مطالعه از جوجه‌های گوشتی سویه تجاری آرین استفاده شد. طول دوره آزمایشی 42 روز بود. در طول مدت پرورش از 3 نوع جیره غذایی (جدول 1) استفاده شد. احتیاجات غذایی جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف پرورش: آغازین (0-2 هفتگی)، رشد (2-4 هفتگی) و پایانی (4-6 هفتگی) از جداول راهنمای پرورش جوجه‌های گوشتی آرین استخراج شد. با استفاده از مواد خوراکی موجود و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری جیره نویسی UFFDA جیره های آزمایشی تنظیم گردیدند (جدول 1 و 2). جوجه‌های گوشتی دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

**آنالیز اسانس آویشن شیرازی:** اسانس آویشن شیرازی توسط گروه فیتوشیمی در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی با استفاده از دستگاه GCMAS آنالیز شد(جدول 3).

**گروه‌های آزمایشی:** انجام این مطالعه در سالن مرغداری مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در کرج صورت گرفت. قبل از ورود جوجه‌ها آماده‌سازی سالن و مراحل شستشو، ضد عفونی و گازدهی انجام گرفت. جوجه‌ها به 5 گروه آزمایشی مشتمل بر 4 تکرار و هر تکرار شامل 25 قطعه جوجه گروه‌بندی شدند. گروه‌ها شامل موارد زیر بودند: گروه1: جیره پایه (گروه شاهد)؛ گروه2: جیره پایه + 100 میلی گرم در کیلوگرم پروبیوتیک بر پایه باسیلوس سوبیتلیس گروه 3: جیره پایه + 150 میلی گرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک آویلامایسین ؛ گروه 4: جیره پایه + 200 میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس آویشن شیرازی؛ گروه 5: جیره پایه + 400 میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس آویشن شیرازی. طول دوره آزمایشی ۴۲ روز بود.

**تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند:** به منظور ارزیابی سیستم ایمنی در روزهای 21 و 35 از دوره پرورش به سه قطعه از هر گروه آزمایشی از طریق عضله سینه مقدار 0/1 میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند[1] (0/5 درصد) تهیه شده در بافر فسفات استریل تزریق شد و یک هفته بعد از هر تزریق از همان جوجه‌های گوشتی یک میلی‌لیتر خون از ورید بال گرفته شد. سرم خون با قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت 3000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه جداسازی شد. نمونه‌های سرم خون جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند به مدت 30 دقیقه در 55 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند و در ادامه برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند (IgG + IgM) از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر توسط روش آزمایشگاهی که توسط Wegmann & Smithies (1996) شرح داده شده است، انجام شد.

1. Sheep Red Blood Cells

**جدول 1. ترکیب مواد مغذی جیره پایه در سنین مختلف جوجه‌های گوشتی**

**Table 1. The nutrient composition of basal diet in different ages of broiler chicks**

| 42-28 روزگی<br>28-42 days | 28-14 روزگی<br>14-28 days | 14- 0 روزگی<br>0-14 days | اجزای جیره (درصد)<br>Diet ingredients (%) |
|---|---|---|---|
| 45.55 | 45.7 | 48.6 | ذرت Corn |
| 20 | 15 | 6.78 | گندم Wheat |
| 27.9 | 32 | 36.5 | کنجاله سویا Soybean meal |
| 0.5 | 1.4 | 1.2 | پودر ماهی Fish powder |
| 2 | 1.2 | 1.6 | چربی Fat |
| 0.15 | 0.15 | 0.2 | جوش شیرین Sodium bicarbonate |
| 1.8 | 1.68 | 1.9 | دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate |
| 1.1 | 1.05 | 1.25 | پوسته صدف Oysters shell |
| 0.25 | 0.25 | 0.25 | نمک NaCl |
| 0.18 | 0.17 | 0.27 | دی ال- متیونین DL-Methionine |
| 0.07 | 0 | 0.05 | ال- لایزین L-Lysine |
| 0.5 | 0.5 | 0.5 | مکمل ویتامینی و معدنی Vitamin and mineral supplement |

مکمل ویتامینی و معدنی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تأمین کرده بود.

ویتامین A، 9000 واحد بین المللی. ویتامین $B_1$، 1/8 میلی‌گرم. ویتامین $B_2$، 6/6 میلی‌گرم. نیاسین، 30 میلی‌گرم. کلسیم پانتوتنات، 10 میلی گرم. ویتامین $B_6$، 3 میلی‌گرم. فولیک اسید 1 میلی‌گرم. ویتامین $B_{12}$، 0/015 میلی گرم. بیوتین 0/1 میلی‌گرم. ویتامین $D_3$، 2000 واحد بین المللی. ویتامین E، 18 واحد بین المللی. ویتامین $K_3$، 2 میلی گرم. کولین کلراید 500 میلی گرم است.

منگنز (اکسید منگنز)، 100 میلی‌گرم. آهن (سولفات آهن)، 50 میلی‌گرم. روی (اکسید روی)، 100 میلی‌گرم. مس (سولفات مس)، 10میلی‌گرم. ید (یدات کلسیم)، 1 میلی‌گرم. سلنیوم (سدیم سلنیت)، 0/2 میلی‌گرم است.

Vitamin and mineral supplements per kilogram of feed supplied the following amounts.

Vitamin A, 9000 units international. Vitamin B1, 1.8 milligrams. Vitamin B2, 6.6 mg. Niacin, 30 milligrams. Calcium pantothenate, 10 mg. Vitamin B6, 3 milligrams. Folic acid 1 milligram. Vitamin B12, 0.015 mg. Biotin 0.1 mg. Vitamin D3, 2000 International units. Vitamin E, 18 units International. Vitamin K3, 2 mg. Choline chloride is 500 mg.

Manganese (manganese oxide), 100 milligrams. Iron (iron sulfate), 50 milligrams. Zinc (zinc oxide), 100 milligrams. Copper (copper sulfate), 10 milligrams. Iodine (calcium iodine), 1 milligram. Selenium (sodium selenite) is 0.2 milligrams.

**جدول 2. آنالیز مواد مغذی جیره‌های پایه**

**Table 2. Nutrient analysis of the basal diet**

| 28 -42روزگی<br>28-42 days | 14-28 روزگی<br>14-28 days | 0-14روزگی<br>0-14 days | ترکیب شیمیایی جیره<br>Diet chemical composition |
|---|---|---|---|
| 2965 | 2937 | 2851 | انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری)<br>Metabolism energy (kcal/kg) |
| 18.50 | 20.39 | 22.23 | پروتئین (درصد) Protein (%) |
| 0.69 | 0.77 | 0.85 | ترئونین (درصد) Threonine (%) |
| 0.78 | 0.83 | 0.99 | متیونین+سیستین (درصد) Methionine+ Methionine (%) |
| 1 | 1.10 | 1.28 | لایزین (درصد) Lysine (%) |
| 0.45 | 0.45 | 0.50 | فسفر قابل دسترس (درصد) Available phosphorous (%) |
| 0.90 | 0.90 | 1.06 | کلسیم (درصد) Calcium (%) |
| 0.91 | 0.16 | 0.18 | سدیم (درصد) Sodium (%) |
| 1.06 | 234 | 258 | تعادل آنیون – کاتیون Anion-Cation Equilibrium |

**شمارش تفریقی گلبول های سفید:** شمارش افتراقی گلبول‌های سفید به طریق تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا[1] و شمارش زیر میکروسکوپ نوری انجام شد. به این ترتیب که قطره خون در یک سانتیمتری انتهای لام هموسایتومر قرار داده شد. لبه لام دیگر بر روی قطره خون قرار گرفت. بعد از خشک شدن گسترش خونی، خون خشک شده روی لام توسط متانول ثابت شد. بعد از خشک کردن مجدد، لام هموسایتومر برای رنگ‌آمیزی آماده شد. رنگ گیمسا به نسبت 1:10 رقیق (یک میکرولیتر رنگ + نه میکرولیتر آب) شد و سپس لام هموسایتومر داخل آن قرار گرفت. شمارش گلبول‌های سفید (هتروفیل و لنفوسیت) زیر میکروسکوب نوری و به روش شمارش با چشم انجام شد(Grass &Siegel 1993).

**تعیین درصـــد حجمی گلبول قرمز (هماتوکریت):** در این آزمایش در 35 روزگی از هر تکرار حداقل یک قطعه جوجه و مجموعاً از هر تیمار 4 قطعه جوجه به طور تصادفی انتخاب گردید. تعیین میزان هماتوکریت نیز توسط روش آزمایشگاهی که توسط NafisiBahabadi et al. (2016)شرح داده شده است، انجام شد.

1. Giemsa stine

**جدول3. اجزای تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در جیره مورد مطالعه**

**Table 3. The ingredients of *Zataria multiflora* essence used in in the studied diet**

| نام ترکیب<br>Compound name | درصد<br>(%) | نام ترکیب<br>Compound name | درصد<br>(%) |
|---|---|---|---|
| Tricyclene | 0.36 | 1-Borneol | 1.14 |
| α-Pinene | 1.81 | 4-Terpineol | 1.24 |
| Camphene | 3.15 | α-Terpineol | 1.17 |
| Sabinene | 0.04 | γ-Terpineol | 0.39 |
| β-Pinene | 3.29 | cis-Geraniol | 0.20 |
| β-Myrcene | 1.84 | Cumin aldehyde | 0.25 |
| δ-3-Carene | 0.68 | Linalyl acetate | 0.68 |
| α-Terpinene | 2.96 | trans-Geraniol | 0.42 |
| m-Cymene | 0.38 | trans-Ascaridol glycol | 0.12 |
| p-Cymene | 14.20 | Thymol | 22.31 |
| Limonene | 1.55 | Carvacrol | 3.10 |
| 1,8-Cineol | 5.30 | Neryl acetate | 0.60 |
| E-β-Ocimene | 0.12 | α-Copaene | 0.15 |
| γ-Terpinene | 6.41 | trans Caryophyllene | 2.97 |
| trans-Linalool oxide | 0.23 | α-Humulene | 0.30 |
| α-Terpinolene | 0.91 | Caryophyllene oxide | 0.91 |
| Linalool | 6.20 | Myristic acid | 0.31 |
| trans-β-Terpineol | 0.21 | Hexadecanal | 0.22 |
| Borneol | 0.74 | Pentadecanoic acid | 0.55 |
| Hexadecanamide | 0.53 | Palmitic acid | 7.15 |

**بیان ژن:** به منظور بررسی بیان نسبی ژن MUC2 در سن 42 روزگی دوره پرورش تعداد 3 قطعه پرنده از هر تیمار آزمایشی انتخاب شده و بعد از کشتار، نمونه‌هایی از بافت روده (ژئوژنوم) جدا و نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای 80- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در ادامه، استخراج RNA کل از بافت روده طبق دستورالعمل کیت استخراج GeneJET RNA Purification Kit (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و نانودراپ صورت گرفت. در ادامه، RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI عاری از RNase از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA پاک سازی شد. برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid$^{TM}$ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. از هر نمونه 2 میکروگرم از RNA کل جهت سنتز cDNA استفاده شد. طراحی آغازگرها به منظور بررسی بیان ژن MUC2 در جوجه‌های گوشتی با استفاده از نرم‌افزار Primer primer نسخه 5 انجام شد. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن MUC2 در جدول 4 نشان داده شده است.

**جدول4. توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای بیان ژن MUC2**

**Table 4. Sequence of specific primers used for MUC2 gene expression**

| ژن<br>Gene | توالی آغازگر<br>Primers sequences | شماره بانک ژن<br>Gene Bank accession no | طول محصول<br>Product size (bp) |
|---|---|---|---|
| **MUC2** | F 5´- TGAAGGGTGGTGCTAAGCGTG-3´<br>R 5´- GGATGATGTTCTGGGCAGCAC-3´ | XM_421035.2 | 157bp |
| **GAPDH** | F 5´-CTGTTGTGGATGGGCGGATTG-3´<br>R 5´- CCAAACTTGCTGTCCAGCTCC-3´ | NM_204305.1 | 288bp |

جهت انجام واکنش Real Time PCR از کیت SYBER Green qPCR Master Mixes ساخت شرکت فرمنتاز استفاده شد. واکنش در حجم 25 میکرولیتر شامل 12/5 میکرولیتر Maxima® SYBER Green'ROX qPCR Master Mix (2x)، 0/75 میکرولیتر از هر یک از آغازگر های رفت و برگشت (10 پیکو مول)، 1 میکرولیتر cDNA الگو و 10/5 میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. هر واکنش به صورت 3 تکرار (Triplicate) صورت گرفت. به منظور تهیه نمونه کنترل منفی برای انجام واکنش Real Time PCR به تیوپ دیگر، به جای cDNA آب دو بار تقطیر اضافه گردید و در ادامه نمونه‌ها در دستگاه Lightcyclear96 (Roche) با برنامه حرارتی زیر جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن MUC2 قرار داده شدند. واسرشت سازی اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد برای 10 دقیقه، 40 سیکل واسرشت سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد برای 15 ثانیه، دمای

اتصال 60 درجه سانتی‌گراد برای 30 ثانیه و گسترش در 72 درجه سانتی‌گراد 30 برای ثانیه انجام شد. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها رسم شد. در ادامه بیان نسبی ژن MUC2 نسبت به GAPDH (ژن مرجع) به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Livak & Schmittgen 2001*) محاسبه شد.

**تحلیل آماری داده‌ها:** کل اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز گردید (SAS Institute 2003). برای مقایسه میانگین‌ها گروه‌های آزمایشی از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 5 درصد استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### اثر آویشن شیرازی بر عملکرد ایمنی هومورال و سلولی جوجه‌های گوشتی

یافته های مربوط به شاخص فراسنجه‌های ایمنی هومورال در جدول 5 ارائه شده است. طبق یافته ها پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمنوگلبولین G و ایمنوگلبولین M تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار نگرفت (P>0/05)، اما بالاترین پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی در گروه اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه شاهد، بالاترین ایمنوگلبولین G در گروه آویلامایسین و اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه شاهد، بالاترین ایمنوگلبولین M درگروه اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه اسانس آویشن در سطح 200 بود. یافته‌های مربوط به ایمنی سلولی در جدول 6 ارائه شده است.

طبق یافته‌ها تعداد گلبول‌های سفید تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار نگرفت (P<0/05) اما بالاترین تعداد گلبول‌های سفید در گروه اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه اسانس آویشن در سطح 200 بود. هتروفیل تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار گرفت (P<0/05) به طوریکه بالاترین هتروفیل در گروه اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه پروبیوتیک بود. لنفوسیت نیز تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرارگرفت (P<0/05). به طوریکه بالاترین لنفوسیت در گروه پروبیوتیک و کمترین در گروه اسانس آویشن در سطح 400 بود. نسبت هتروفیل به لنفوسیت تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرارگرفت (P<0/05) به طوریکه بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت در گروه اسانس آویشن در سطح 400 و کمترین در گروه پروبیوتیک بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سطوح مختلف آویشن در مقایسه با گروه های آویلامایسین، پروبیوتیک و شاهد نتوانست سبب اختلاف معنی داری در شاخص های ایمنی هومورال از جمله تعداد ایمنوگلبولین G و M و ایمنی سلولی گردد که مطابق با نتایج Aami .Azghadi et al (2010) می‌باشد.

**جدول5. اثر تیمارهای مختلف بر شاخص فراسنجه‌های ایمنی هومورال**

**Table 5. Impact of different treatments on humoral immune parameters**

| ایمنوگلبولین M<br>Immunoglobulin M | ایمنوگلبولین G<br>Immunoglobulin G | عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفند<br>Anti-carcinoma of the sheep's red blood cell | تیمار<br>Treatment |
|---|---|---|---|
| 3.33 | 2.50 | 5.83 | شاهد Control |
| 3.25 | 4.50 | 7.75 | آویلاماسین<br>Avilamycin |
| 3.50 | 4.17 | 7.67 | پروبیوتیک Probiotic |
| 2.58 | 3.67 | 6.25 | آویشن (200 میلی-گرم)<br>Thyme(200mg) |
| 3.80 | 4.40 | 8.20 | آویشن (400 میلی-گرم)<br>Thyme(400mg) |
| 0.15 | 0.35 | 0.35 | SE |
| 0.104 | 0.384 | 0.119 | P-Value |

**حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی دار آماری است (P<0/05)**

این محققین تأثیر سطوح مختلف عصاره آویشن و زیره سبز را بر پاسخ ایمنی هومورال در مرغ‌های نژاد هایلاین ارزیابی کردند و نشان دادند که پاسخ اولیه و ثانویه ایمنوگلوبولین کل، IgG و IgM تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره ی آویشن و زیره سبز قرار نگرفت. از طرفی Safamehr et al.(2017) نشان داد که استفاده از مخلوط آویشن با مرزه و مکمل مولتی آنزیم توانسته سبب بروز پاسخ های ایمنی گردد. این اختلاف نتایج می‌تواند ناشی از متفاوت بودن ترکیبات مورد مطالعه باشد که خود سبب بروز پاسخ های مختلفی شده است. علاوه براین، در مطالعه ای Ocak *et al.*(2008) گزارش کردند که استفاده از مکمل آویشن، میزان مرگ و میر در جوجه‌های گوشتی را در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. Griggs & Jacob(2005) نشان دادند که مصرف عصاره آویشن به صورت مکمل‌درمانی در جیره می‌تواند سبب کاهش تلفات در طول دوره پرورش گردد که احتمالاً این نتایج به علت نقش مهم این گیاه در مبارزه با عوامل پاتوژن در طیور باشد. نتایج حاصل از این مطالعه همچنین نشان داد که آویشن توسط یک پاسخ وابسته به دوز توانسته است اثرات تعدیلی خود را بر سیستم ایمنی اعمال کند،

بطوریکه در جداول 5 و 6 مشاهده می کنید که بیشترین پاسخ تعدیلی در سطوح بالای آویشن نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات فوق این احتمال وجود دارد که آویشن توسط اثرات ضد میکروبی و آنتی بیوتیکی خود توانسته است نقش قابل ملاحظه ای بر سیستم ایمنی داشته باشد.

**جدول 6. اثر گروه‌های مختلف بر ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی**

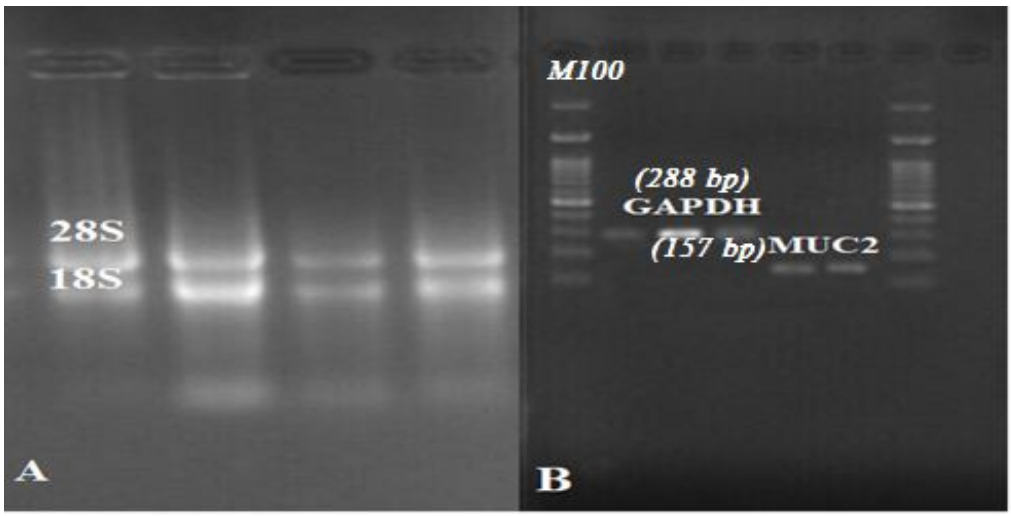
**Table 6. Impact of different treatments on cellular immune from broiler chickens**

| نسبت هتروفیل به لنفوسیت<br>Heterophile/ Lymphocyte | لنفوسیت<br>Lymphocyte | هتروفیل<br>Heterophile | تعداد گلبول های سفید<br>White blood cell count | تیمار<br>Treatment |
|---|---|---|---|---|
| | درصد<br>(%) | | $10^6$ x تعداد در میکرولیتر<br>$10^{6*}$ Number in Microliter | |
| 0.4247 b | 68.50 ab | 28.66 b | 26866.66 | شاهد Control |
| 0.4713 ab | 65.83 bc | 30.83 ab | 28350.00 | آویلامایسین Avilamycin |
| 0.385 b | 70.66 a | 27.16 b | 28166.66 | پروبیوتیک Probiotic |
| 0.4591 ab | 67.00 abc | 30.66 ab | 26150.00 | آویشن (200 میلی-گرم) Thyme(200mg) |
| 0.5281 a | 64.33 c | 33.83 a | 28633.33 | آویشن (400 میلی-گرم) Thyme(400mg) |
| 0.014 | 0.677 | 0.707 | 644.57 | SE |
| 0.023 | 0.022 | 0.025 | 0.725 | P-Value |

**حروف متفاوت در هر ستون نشانه اختلاف معنی دار آماری است (P<0/05)**

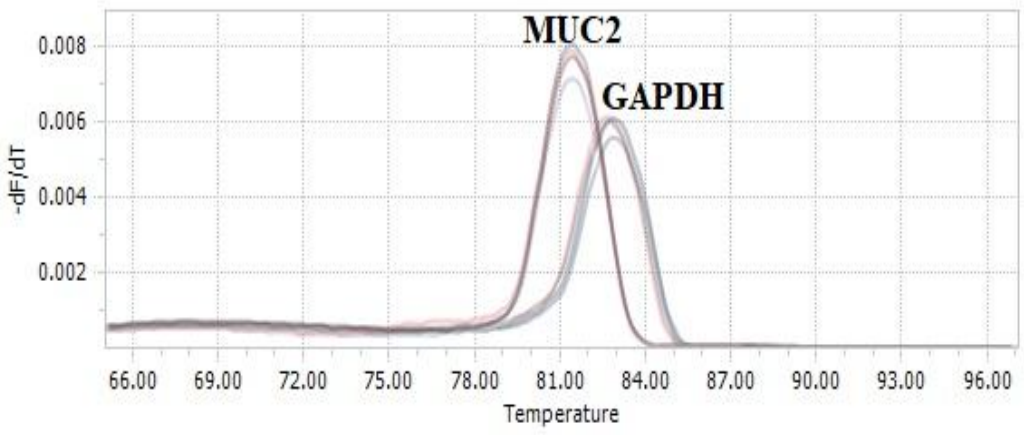
### بیان ژن MUC2

نتایج حا صل از اعداد جذب نمونه‌های ا ستخراج شده در طول موج‌های 260/280 در محدوه 1/9-1/8 بود که ن شان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده بود و حضور دو باند 18s و 28s در شکل 1A نشان دهنده سالم بودن RNA می‌باشد. نتایج منحنی Real Time PCR و محصولات PCR روی ژل آگارز نشان دادند که ژن MUC2 در بافت روده تکثیر شده است. صحت تکثیر قطعات ژنی MUC2 و GAPDH در شکل1B نشان داده شده است. منحی ذوب ژن‌های MUC2 و GAPDH که در شکل 2 نشان داده شده است اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR را نشان می‌دهد.




**شکل1. A کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های روده جوجه گوشتی روی ژل آگارز. B الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن MUC2 (157جفت باز) و GAPDH (288 جفت باز) روی ژل آگارز**

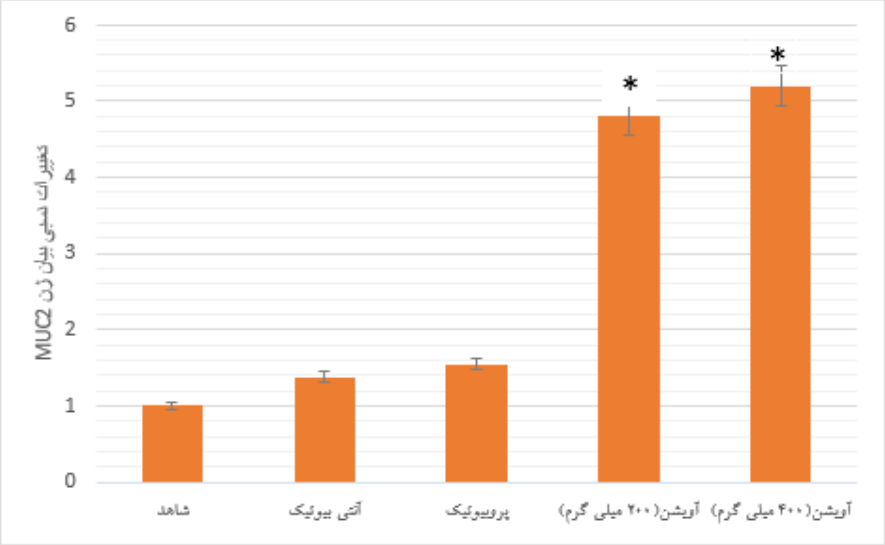
**Figure 1. (A) Quality of RNA extracted from intestinal tissues on agarose gel. (B) Electrophoresis of PCR products using MUC2 and GAPDH specific primers on agarose gel**




**شکل2. منحنی ذوب محصول ژن MUC2 و GAPDH حاصل از واکنش Real Time PCR برای جوجه‌های گوشتی**

**Figure 2. Melting curve of MUC2 and GAPDH gene production using Real Time PCR for broiler chickens**

در پژوهش حا ضر بیان ژن MUC2 در سطوح مختلف آویشن، پروبیوتیک و آویلامایسین مورد برر سی قرار گرفت. به منظور بررسی بیان نسبی ژن MUC2 نیاز به گروه کنترل بود، لذا جیره پایه (شاهد) به عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همان طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره پایه حاوی آویشن میزان بیان ژن MUC2 را به طور معنی‌داری در بافت روده در مقایسه با گروه تغذیه شده با جیره پایه ( شاهد) افزایش داد($P<0/05$). در گروه جوجه‌های گو شتی که به جیره پایه آن‌ها آویلامایسین و پربیوتیک ا ضافه شده بود، میزان بیان ژن MUC2 با بیان آن در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج همچنین نشان دادند که اثر افزایش دهندگی بیان ژن MUC2 در هر دو گروه جیره پایه حاوی 200 و 400 میلی‌گرم آویشن از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با هم ندارد (شکل 3).




**شکل3. میزان بیان ژن MCU2 در بافت روده گروه‌های آزمایشی مختلف**

**Figure 3. The expression level of MCU2 gene in the intestinal tissue of different experimental groups**

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سطوح مختلف آویشن در مقایسه با گروه های آویلامایسین، پروبیوتیک و شاهد توانست سبب افزایش معنی داری در بیان ژن MUC2 گردد که با نتایج Kamali Sangani et al. (2014) و Hassan et al. (2017) در یک راستا می‌باشد. در پژوهشی Kamali Sangani et al. (2014) نشان دادند که مکمل سازی جیره پایه با زردچوبه، آویشن و دارچین سبب افزایش بیان ژن MUC2 در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. نتایج مطالعه Hassan et al. (2017) نیز نشان داد که مکمل سازی جیره جوجه‌های گوشتی با پودر آویشن سبب افزایش بیان ژن MUC2 در ژئوژنوم آنها نیز می‌گردد. همچنین مطالعه Smirnov *et al.* (2004) نشان داد که 72 ساعت گرسنگی در جوجه‌های گوشتی 28 روزه و مطالعه Sepehri Moghadam(2010) نشان داد که استفاده از جیره های غنی از تریونین و ویتامین A سبب افزایش بیان ژن MUC2 در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه همچنین نشان دادکه افزودن اسانس آویشن در جیره پایه به صورت وابسته دوز در دو سطح 200 و 400 میلی‌گرم منجر به افزایش معنی‌داری در بیان ژن MUC2 نسبت به سایر گروه های مورد مطالعه گردید که می‌تواند نشان دهنده اثر محرک مواد مؤثر موجود در این گیاه از طریق تحریک تولید موسین توسط سلول های گابلت باشد. مطالعات انجام شده در جوندگان نشان داده اند که بیان ژن MUC2 در سلول های گابلت روده توسط فاکتورهای رونویسی از جمله GATA و FOX تنظیم می‌گردد(Van der Sluis et al. 2004). به نظر می رسد که تمایل به افزایش بیان

MUC2 در بافت ژئوژنوم روده در تیمارهای تغذیه شده با اسانس آویشن می‌تواند به علت تأثیر احتمالی مواد مؤثر موجود در این گیاه از طریق تغییر در تولید یا تغییر فعالیت این فاکتورهای رونویسی اعمال گردد.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که استفاده از اسانس آویشن می تواند به دلیل تغییر در بیان ژن MUC2 سبب حفاظت روده در برابر عوامل پاتوژن گردد و شاید بتوان گفت که نقش تعدیلی آویشن بر سیستم ایمنی به دلیل اثرات مثبت آن بر افزیش بیان این ژن می باشد. با توجه به این نتایج می توان این نتیجه گیری را داشته باشیم که استفاده از اسانس آویشن در دوره های پرورش طیور می تواند نقش بهبود دهندگی قابل ملاحظه ای در کاهش بار اقتصادی و ارتقاع وضعیت صنعت طیور داشته باشد.

## منابع

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدر ضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (1393) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 6(4)، 35-50.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (1395) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان 4(4)، 119-132.

صفامهر علیرضا، چاووشی فرزاد، نوبخت علی (1396) اثرات آویشن، مرزه با و بدون آنزیم بر عملکرد، فراسنجه های خونی و ایمنی در جوجه های گوشتی. پژوهشهای تولیدات دامی 8 (16)، 70-78

نفیسی بهابادی محمود، دادگر شهرام، لکزائی فرحناز و همکاران (1395). تأثیر غلظتهای تحت حاد علف‌کش بوتاکلر بر برخی پارامترهای خونی ماهی قزل آلای رنگین کمان(Oncorhynchusmykiss). مجله علمی شیلات ایران 25(2)، 160-151.

## References

Aami Azghadi M, Pilevar M, Arshami J, Mohamadkhani A (2010) Influence of various levels of thyme and cumin extracts on productive performance, egg quality and humoral immune responses of laying hens. The 4th Congress on Animal Science.

Aeschbach R, Loliger J, Scott BC et al. (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food Chem Toxicol 32, 31-36.

Alagawany MM, Farag MR, Dhama K (2015a) Nutritional and biological effects of turmeric (Curcuma longa) supplementation on performance, serum biochemical parameters and oxidative status of broiler chicks exposed to endosulfanin the diets. Asian J Anim Vet Adv 10, 86-96.

Alagawany MM, Farag MR, Dhama K et al.(2015b) Mechanisms and beneficial applications of resveratrol as feed additive in animal and poultry nutrition: a review. Int J Pharmacol Pharmacology 11:213-221.

Al-Khdri AMA (2013) Effect of ginger (Zingiber officinale) and thyme (Thymus vulgaris) dietary supplementation on productive and immunological performance of broiler. Master thesis, Faculty of Agriculture and Forestry School of Animal Production Kurdistan Regional Government, Iraq

Delhanty J, SolomonJB (1966) The nature of antibodies to goat erythrocytes in the developing chicken. J Immunol 11, 103–113.

Fan M, Chen J (2001) Studies on antimicrobial activity of axtracts from thyme. Wei Sheng Wu Xue Bao 41,499-504.

Farag MR, Alagawany MM, Dhama K (2014) Antidotal effect of turmeric (Curcuma longa) against endosulfan-induced cytogenotoxicity and immunotoxicity in broiler chicks. Int J Pharmacol 10, 429-439.

Gibson GR, Roberfroid BM (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr 125, 1401-1412.

Grass WB, Siegel HS (1983) Evaluation of the heterophile/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. Avian Disease 27, 927-979.

Griggs JP, Jacob JP (2005) Alternatives to antibiotics for organic poultry production. J Appl Poult Res 14, 750-756.

Hassan FA, Awad A (2017) Impact of thyme powder (Thymus vulgaris L.) supplementation on gene expression profiles of cytokines and economic efficiency of broiler diets. Environ Sci Pollut Res *24*, 15816-15826.

Hertrampf JW (2001) Alternative Antibacterial Performance Promoters. Int J Poult Sci. 40, 50-52.

Hoffman-Pennesi D, Wu C (2010) The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal Salmonella population in broilers. J Appl Poult Res 19, 432-443.

Horn NL, Donkin SS, Applegate TJ, Adeola O (2009) Intestinal mucin dynamics: response of broiler chicks and white pekin ducklings to dietary threonine. Poul Sci 88, 1906-1914.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Jamroz D, Wiliczkiewicz A, Wertelecki T et al. (2005) Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and domestic grains. Poult Sci 46, 485-493.

Kamali Sangani A, Masoudi AA (2014) The effects of herbal plants on Mucin 2 gene expression and performance in ascetic broilers. Iran J Vet Res *8*, 47-52

Lee KW, Everts H, Kappert HJ et al. (2003) Effects of dietary essential oli components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br Poult Sci 44, 450-457.

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Med Biol Res 50, e6177.

Mohammadabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaee HR et al. (2010) Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russ J Genet 46, 505-509.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim 7, 289-295.

Montagne L, Piel C, Lalles JP (2004) Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. Nutr Rev 62, 105-114

Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E et al. (2007) Evaluation of the efficacy of a probiotic containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poult Sci 86, 309-317.

NafisiBahabadi M, Dadgar S, Lakzaei F et al. (2016) The effect of subacute concentrations of Butachlor herbicide on some blood parameters in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).isfj 25,151-160.( in Persian)

Ocak N, Erener F, Burak AK et al. (2008) Performance of broilers feed diets supplemented with dry peppermint (Mentha Piperita L.) or thyme (thymus Vulgaris L.) leaves as growth promoter source. Czech J Anim Sci 53, 169-175.

Safamehr A, Chavooshi F, Nobakht A (2017) The effects of *Saturea* and *Thyme* medicinal plants with or without enzyme on performance, blood parameters in broiler chickens. rap 8, 70-78. (in Persian).

Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M (2013) Zataria multiflora Boiss. (Shirazi thyme) an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. J Ethnopharmacol 145, 686698.

Sepehri Moghadam H (2010) Effect of threonine and vitamin A on performance, histology characterization and gene expression of mussin 2 in broiler chickens. Master Thesis. Ferdowsi university of Mashhad. pp. 70-80.

Smirnov A, Sklan D, Uni Z (2004) Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. J Nutr 134, 736-742.

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K et al. (2009) Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Anim Sci Res19, 81-89.

Steiner T (2009) Application and benefits of phytogenics in egg production.In: Steiner T (ed) Essentialoils—biochemistry, production and utilization. Phytogenics in animal nutrition, Natural concepts to optimize gut health and performance. Nottingham University Press, Nottingham, pp 157-167.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50 (In Persian).

Van der Sluis M, Melis HM, Jonckheerec N et al. (2004) The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in the intestinal cells. Biochem Biophys Res Commun 325, 952-996.

Wegmann T, Smithies O (1966) A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion 6, 67-75.

Wenk C (2000) Why all the discussion about herbs Proc. Alltech's 16th Ann. Symp. Biotechnol. In the Feed Industry. Ed. Lyons, TP, Alltech Tech Publ, Nottingham, University Press, Nicholasvile, KY. pp: 79-96.