تولیدات دامی
دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶
صفحه‌های ۵۱۹-۵۰۷

اثر تزریق زردهٔ تخم‌مرغ بومی خزک به زردهٔ تخم‌مرغ سویهٔ راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4

فرزانه بازماندگان شمیلی[۱]، مهدی وفای واله[۲]*، غلامرضا داشاب[۲]، فرزاد باقرزاده کاسمانی[۳]

۱. کارشناس‌ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

چکیده

به‌منظور ارزیابی آثار مادری بر تکوین سیستم ایمنی نتاج، اثر تزریق زردهٔ تخم‌مرغ‌های بومی خزک به زردهٔ تخم‌مرغ‌های سویهٔ تجاری راس بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4 در مرغ‌های سویهٔ تجاری راس تعیین شد. بدین منظور، تعداد ۱۵۰ عدد تخم‌مرغ سویهٔ راس به‌طور تصادفی به دو گروه آزمایشی ۷۵تایی شامل گروه I (گروه شاهد- تزریق زردهٔ سویهٔ راس) و گروه II (تزریق زردهٔ نژاد خزک) تقسیم و برای مدت سه هفته در در دستگاه جوجه‌کشی خوابانده و پس از هچ با جیرهٔ متوازن به‌مدت شش هفته پرورش داده شد. سه پرنده به‌طور تصادفی در روزهای ۲۷ و ۴۲ انتخاب و کشتار شد. وزن اندام‌های مؤثر در ایمنی (کبد، بورس و تیموس) اندازه‌گیری و تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و بیان نسبی ژن TLR4 در کبد نمونه‌های آزمایشی بررسی شد. تزریق زردهٔ خزک به تخم‌مرغ‌های سویهٔ راس سبب بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و نیز سبب کاهش بیان ژن TLR4 در کبد جوجه‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج این پژوهش ممکن است تزریق زردهٔ تخم‌مرغهای بومی خزک به تخم‌مرغ‌های سویهٔ تجاری راس در روز اول جنینی، سبب بهبود کارایی سیستم ایمنی مرغان سویهٔ راس در سنین بالاتر بشود.

کلیدواژه‌ها: آثار مادری، زردهٔ تخم‌مرغ، مرغ بومی خزک، TLR4.

* نویسنده مسئول: Email: Mehdi.Valleh@uoz.ac.ir

مقدمه

پیشرفت‌های ژنتیکی در صفات رشد عمدتاً به افزایش حساسیت مرغ‌های اصلاح‌شده در برابر تنش‌های محیطی و پاتوژن‌ها می‌انجامد. با این حال، علی‌رغم پیشرفت‌های گسترده در زمینهٔ اصلاح نژاد، سازوکارهای مؤثر در توجیه تفاوت‌های فیزیولوژیکی نظیر تفاوت کارایی فعالیت سیستم ایمنی در نژادهای مختلف تا حدود زیادی ناشناخته مانده است [۳]. درگذشته تفاوت خصوصیات فیزیولوژیکی پرندگان و عملکرد آن‌ها عمدتاً به تفاوت‌های ژنتیکی نسبت داده می‌شد، ولی نتایج مطالعات انجام‌شده طی سال‌های اخیر دلالت بر تأثیر شگرف محیط مادری بر فرایند تکوین دوران جنینی و حتی رشدونمو در دوران پس از تولد دارد [۱۳].

هر چند اطلاعات اندکی در خصوص اهمیت آثار مادری طیور بر فرایند تکوین در دوران جنینی یا دوران پس از تولد وجود دارد، نتایج حاصل از مطالعات اخیر در پرندگان نشان‌دهندهٔ تأثیر مادر بر خصوصیات تخم مانند وزن تخم‌مرغ، ترکیبات زرده، ترکیب و غلظت هورمون‌ها و نیز آنتی‌بادی‌هاست. این عوامل متعاقباً بر وزن تولد، قابلیت بقا و نرخ رشد به‌خصوص در مراحل آغازین زندگی جوجه تأثیر زیادی دارد [۱۳، ۱۶]. به‌علاوه، شواهد حاصل از مشاهدات تجربی حاکی از اهمیت ترکیبات تخم‌مرغ در توارث اطلاعات اپی‌ژنتیکی در پرندگان است [۵، ۱۶].

کارایی پاسخ‌های سیستم ایمنی در مقابل پاتوژن‌ها، نقشی کلیدی در قابلیت زنده‌مانی و عملکرد حیوان دارد. گزارش شده است که اعضای خانوادهٔ گیرنده‌های شبه‌تول (TLRs) نقش مهمی در تنظیم فعالیت سیستم ایمنی دارد. این گیرنده‌ها در طیف گسترده‌ای از بافت‌ها و انواع سلول‌ها و به‌طور خاص در سلول‌های ایمنی بدن مانند ماکروفاژها، سلول‌های دندریت، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها بیان می‌شود [۹، ۲۴]. این گیرنده‌ها غالباً الگوهای مولکولی وابسته به پاتوژن (PAMPs) و نیز الگوهای مولکولی حاصل از آسیب‌های سلولی (DAMPs) را شناسایی می‌کند و متعاقباً سبب فعال‌شدن مسیرهای سیگنال آبشاری در بروز پاسخ متناسب می‌شود. روی‌هم‌رفته تاکنون ده عضو عملکردی از این گیرنده‌ها در طیور شناسایی شده است که قابلیت شناسایی و اتصال با تعداد وسیعی از لیگاندها نظیر ساختارهای پروتئینی، لیپیدی، پلی‌ساکاریدی و نوکلئوتیدی را دارند [۲۴]. یکی از شناخته‌شده‌ترین اعضای خانوادهٔ TLRs، گیرندهٔ TLR4 است که به‌طور عمده در بافت‌های غنی از ماکروفاژ مانند طحال، لوزه و کبد بیان می‌شود و در شناسایی لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی و نیز اندوتوکسین‌ها نقش کلیدی دارد [۲۱، ۲۴].

فعال‌شدن گیرندهٔ TLR4 در زمان اتصال به لیگاندهای اختصاصی سبب بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی و متعاقباً ایمنی اکتسابی به‌واسطهٔ فعال‌شدن دو مسیر سیگنال درون سلولی می‌شود که یکی وابسته به پروتئین آدابتور MYD88 و دیگری وابسته به پروتئین TRIF است. گزارش شده است که فعال‌شدن این دو مسیر در نهایت سبب القای بیان ژن‌های التهابی نظیر TNFα، سیتوکین‌های التهابی، اینترفرون‌های نوع I و نیز آنزیم iNOS در سلول می‌شود [۹، ۲۴]. این فاکتورها سبب فعال‌شدن مسیرهای دخیل در آپوپتوزیس هپاتوسیت‌های کبدی می‌شود [۱۴]. بنابراین، پیشنهاد شده است که بخشی از تفاوت کارایی پاسخ سیستم ایمنی بین لاین‌های مختلف طیور به‌واسطهٔ تفاوت در عملکرد مسیر سیگنال TLR4 باشد [۱].

بر این اساس، بخشی از تفاوت‌های نژادی در عملکرد سیستم ایمنی ممکن است به‌واسطهٔ تأثیر نژاد مادر روی ترکیبات زردهٔ تخم‌مرغ باشد. لذا، با توجه به نقش کلیدی ژن TLR4 در تنظیم پاسخ متناسب سیستم ایمنی و نیز اهمیت بافت کبد در مقابله با پاتوژن‌ها، در این مطالعه به‌منظور شناخت اهمیت آثار مادری بر تکوین و تکامل نتاج، زردهٔ نژاد مرغ بومی خزک (مرغ بومی منطقهٔ سیستان)، به‌دلیل مقاومت بسیار بالای آن نسبت به تنش‌های مختلف محیطی نظیر محدودیت‌های غذایی،

استرس حاد گرمایی و بیماری‌ها، به کیسهٔ زردهٔ تخم‌مرغ‌های سویهٔ راس، سویهٔ بسیار حساس به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها، تزریق و تأثیر پیامدهای تزریق بر عملکرد، ایمنی و بیان ژن TLR4 در سلول‌های کبدی جوجه‌های حاصل از انکوباسیون بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۵۰ عدد تخم‌مرغ بارور سویهٔ راس ۳۰۸، تهیه‌شده از گلهٔ مادر با سن ۳۵ هفته، در قالب طرحی کاملاً تصادفی به دو گروه آزمایشی شاهد و گروه تیمارشده با زردهٔ تخم‌مرغ نژاد خزک اختصاص داده شد. تخم‌مرغ نژاد خزک از پژوهشکدهٔ دام‌های خاص دانشگاه زابل تهیه شد. به‌منظور تعدیل آثار سن، جیره و سایر عوامل محیطی از تخم‌مرغ‌های با متوسط سن ۳۴–۳۸ هفتهٔ تغذیه شده با جیرهٔ استاندارد مرغان تخم‌گذار [۲۳] پرورش یافته در شرایط توصیه‌شده استفاده شد.

برای بررسی تأثیر زردهٔ نژاد خزک روی فرایند تکوین جنین و پاسخ ایمنی سویهٔ راس به‌ترتیب تعداد پنج زردهٔ تخم‌مرغ خزک و نیز پنج زردهٔ تخم‌مرغ راس با یکدیگر مخلوط شد. در نهایت، مخلوط زرده‌های حاصل برای تسهیل پروسهٔ تزریق به نسبت چهار به یک با آب مقطر رقیق‌سازی شد. برای تزریق مادهٔ آزمایشی (زردهٔ تخم خزک)، قبل از انکوبه‌کردن تخم‌مرغ‌ها، نخست دیوارهٔ تخم‌مرغ‌ها با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس با استفاده از سوزن ضدعفونی‌شده، در پوستهٔ تخم‌مرغ‌ها سوراخ ایجاد شد. سپس، با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری با سر سوزن درجهٔ ۱۸ مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از زردهٔ رقیق‌شدهٔ خزک (۴۰۰ میکرولیتر زرده + ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) به کیسهٔ زردهٔ هر یک از تخم‌مرغ‌های گروه تیمار تزریق شد. برای تعدیل آثار تنش ناشی از تزریق و نیز نسبت زرده به سفیده بر فرایند تکوین جنین‌ها، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از ترکیب زردهٔ راس رقیق‌شده در آب مقطر (۴۰۰ میکرولیتر زردهٔ سویهٔ راس + ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر) به کیسهٔ زردهٔ تخم‌مرغ‌های گروه شاهد تزریق شد. منفذ ایجادشده با پارافین مذاب مسدود و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی منتقل شد.

پس از پایان دورهٔ جوجه‌کشی، جوجه‌های تفریخ‌شده یک روزه و متعلق به هر گروه آزمایشی نخست به‌صورت انفرادی توزین و سپس به سالن پرورش منتقل شد و تا شش هفتگی پرورش یافت. درجهٔ حرارت سالن نگهداری در روز ورود جوجه‌ها به سالن در ۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد بود. پس از آن، به‌تدریج بر اساس اصول پیشنهادی پرورشی به‌صورت هفتگی (۲ درجهٔ سانتی‌گراد در هفته) کاهش یافت. برنامهٔ نوری برای سه روز نخست پس از هچ به‌صورت روشنایی دائمی و برای باقی دورهٔ پرورش به‌صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت خاموشی تنظیم و اجرا شد. جیرهٔ پایه برای دورهٔ آغازین (یک تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲–۴۲) بر تأمین مواد مغذی توصیه شده [۲۳] تنظیم شد (جدول ۱). غذا و آب به‌صورت آزادانه طی دوره در اختیار پرندگان بود.

در پایان هر هفته، وزن پرندگان اندازه‌گیری و ثبت شد. واکسن نیوکاسل B1 در هفت روزگی از طریق قطرهٔ چشمی تجویز شد. دو هفته بعد از واکسیناسیون از سه قطعه پرنده از هر گروه آزمایشی از طریق ورید بال خون‌گیری انجام شد. پس از جداشدن سرم از لختهٔ خون، به‌منظور تعیین عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس واکسن نیوکاسل از روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) استفاده شد [۱۵]. در روزهای ۲۷ و ۴۲ دورهٔ پرورش، از هر تیمار سه جوجه با وزن نزدیک به میانگین گروه انتخاب و پس از اعمال سه ساعت گرسنگی، کشتار و وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی شامل طحال، بورس و کبد بر اساس وزن زنده اندازه‌گیری شد. پس از وزن‌کشی، نمونه‌های کبد جمع‌آوری و برای جلوگیری از تجزیهٔ RNA به‌سرعت در ازت مایع فریز و تا زمان آنالیز بیان ژن به فریزر دمای ۸۰– منتقل و نگهداری شد.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب جیرهٔ پایه

مادهٔ خوراکی (درصد)	جیرهٔ آغازین (یک تا ۲۱ روزگی)	جیرهٔ رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی)
ذرت	۵۳/۴۷	۴۳/۸۰
کنجالهٔ سویا (٪۴۴ پروتئین خام)	۳۵/۰۰	۲۸/۰۳
گندم	--	۱۵/۰۰
گلوتن ذرت	۲/۸۹	۳/۰۱
روغن آفتاب‌گردان	۳/۲۸	۵/۰۰
دی‌کلسیم فسفات	۱/۴۷	۱/۳۷
پودر صدف	۱/۵۱	۱/۳۴
ماسه	۱/۰۰	۱/۰۰
بی‌کربنات سدیم	۰/۲۹	۰/۳۴
مکمل ویتامینی[1]	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل مواد معدنی[2]	۰/۲۵	۰/۲۵
DL- متیونین	۰/۲۹	۰/۲۲
L- لیزین هیدروکلراید	۰/۱۲	۰/۱۹
L- ترئونین	۰/۱۲	۰/۱۳
نمک	۰/۰۶	۰/۰۴
ویتامین E	--	۰/۰۳
جمع	۱۰۰	۱۰۰
مواد مغذی محاسبه‌شده		
انرژی قابل سوخت‌وساز (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۳۰۰۰	۳۱۰۰
پروتئین خام (%)	۲۲/۰۰	۲۰/۲۱
کلسیم (%)	۱/۰۰	۰/۹۰
فسفر غیرفیتاته (%)	۰/۴۵	۰/۴۲
لیزین (%)	۱/۱۰	۱/۰۰
متیونین + سیستئین (%)	۰/۹۰	۰/۷۸
ترئونین (%)	۰/۸۲	۰/۷۵
تریپتوفان (%)	۰/۲۲	۰/۲۰
تعادل آنیون-کاتیون (میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم)	۲۵۰	۲۵۰

۱. ویتامین‌های تأمین‌شده به‌ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A (از Vitamin A acetate) IU ۱۱۵۰۰، کولـه‌کلسـیفرول IU۲۰۰۰، ویتـامین E (از DL- α-tocopheryl acetate) IU۲۲، ویتامین B12 ۰/۶۰mg، ریبوفلاوین ۴/۴mg، نیکوتین آمیـد ۴۰mg، کلسـیم پنتونـات ۳۵ mg، منـادیون (منـادیون دی‌متیـل پیریمیدینول) ۱/۵۰ mg، فولیک اسید ۰/۸۰mg، تیامین ۳mg، پیریدوکسین ۱۰ mg، بیوتین ۱mg،کولین کلراید ۵۶۰ mg، اتوکسی کوئین ۱۲۵ mg

۲. مکمل معدنی تأمین‌شده به‌ازای هر کیلوگرم جیره: منگنز (از MnSo4.H2O)۶۵mg، روی (از ZnO)۵۵mg، آهـن (از FeSo4.7H2O) ۵۰mg، مـس (از CuSO4.5H20)۸mg، ید (از Ca(IO3)2.H2O)۱/۸mg، سلنیم ۰/۳۰ mg، کبالت (Co2O3) ۰/۲۰ mg، مولیبدن۰/۱۶ mg

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های TLR4 و β-actin

ژن	پرایمر (5′→3′)	شمارهٔ ثبت در بانک ژن	اندازهٔ قطعه (جفت باز)
TLR4	CTGACCTACCCATCGGACAC GCCTGAGAGAGGTCAGGTTG	KP410249.1	۱۱۱
β-actin	AGACATCAGGGTGTGATGGTTGGT TCCCAGTTGGTGACAATACCGTGT	NM_205518.1	۱۲۵

جدول ۳. جدول دمایی و زمانی واکنش Real time PCR برای تکثیر ژن‌های TLR4 و β-actin

مراحل چرخه	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
فعال‌سازی اولیهٔ آنزیم	۹۵	۶۰۰	۱
واسرشت ثانویه	۹۵	۱۵	۴۵
اتصال آغازگرها به الگو	۵۶	۲۰	
طویل‌سازی	۷۲	۲۰	
ترسیم منحنی ذوب	افزایش دما از ۵۵ درجه تا ۹۹ درجه، هر پنج ثانیه یک درجه		

برای بررسی تأثیر تزریق زرده بر الگوی بیان نسبی TLR4، نخست RNA تام بافت کبدی نمونه‌های آزمایشی با استفاده از محلول ترایزول طبق دستورالعمل انجام و به‌دنبال آن سنتز cDNA از نمونه‌های RNA حاصل از نمونه‌های کبدی، با استفاده از کیت HyperScriptTM Reverse Transcriptase (GeneAll, Seoul, Korea) انجام شد. برای مقایسهٔ میزان بیان نسبی ژن TLR4 در گروه‌های آزمایشی از پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های TLR4 و β-actin، پس از مقایسه با توالی ثبت‌شده در NCBI استفاده شد (جدول ۲).

بررسی بیان نسبی ژن TLR4 به‌روش RT-PCR و با استفاده از رنگ سایبرگرین (SYBR Green) انجام شد. در انجام واکنش‌های Real Time PCR از دستگاه Corbett Rotor-Gene 3000 و SYBR Green Master Mix استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت مربوط، اجزای واکنش عبارت بود از نسبت معینی از کیت SYBR Green Master Mix و پرایمرهای رفت‌وبرگشت و cDNA و آب مقطر دوبار تقطیر (Master mix: 4µl, cDNA: 1µl, Primer mix: 1µl, ddH20:14µl). مخلوط و در نهایت واکنش Real Time PCRبر اساس برنامهٔ دمایی بهینه‌شده مطابق جدول ۳ انجام شد.

پس از انجام واکنش Real-time PCR، الگوی منحنی‌های ذوب نیز بررسی و به‌منظور تأیید نتایج از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز استفاده شد. پس از پایان واکنش‌ها، C_Tهای خام مربوط به بیان ژن‌های رفرنس و هدف در نمونه‌های شاهد و کنترل جمع‌آوری و مقایسهٔ بیان نسبی داده‌های حاصل از گروه‌های آزمایشی به روش ΔΔCt و با استفاده از الگوریتم نرم‌افزار REST® program (http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html) انجام شد [۲۵]. در نهایت، داده‌ها با رویهٔ GLM نرم‌افزار JMP برمبنای مدل آماری ۱ آنالیز شد. میانگین گروه‌های آزمایشی به‌کمک آزمون تی استیودنت در سطح احتمال p<۰/۰۵ مقایسه شد.

$$Y_{ij}=\mu+T_i+e_{ijk} \quad (۱)$$

در این رابطه Y_{ij} مقدار رکورد اندازه‌گیری‌شده در تکرار jام از تیمار iام (نرخ جوجه‌درآوری، میزان افزایش وزن جوجه‌ها در فواصل زمانی معین تولد تا ۱۴ روزگی، ۱۴–۲۸ روزگی، ۲۸–۴۲ روزگی و وزن نهایی در ۴۲ روزگی)، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار تزریق زرده، و e_{ij} خطای تصادفی باقی‌مانده است.

نتایج و بحث

تزریق زردهٔ مرغ بومی خزک به تخم‌مرغ‌های سویهٔ راس بر میزان جوجه‌درآوری و میزان افزایش وزن در سنین ۱۴–۲۸ روزگی تأثیر نداشت (p>۰/۰۵؛ جدول ۴). در مقابل، تزریق زردهٔ مرغ بومی خزک نه‌تنها سبب افزایش وزن جوجه‌ها در دوره‌های سنی تولد تا ۱۴ روزگی و ۲۸–۴۲ روزگی شد، بلکه سبب افزایش میزان وزن نهایی (۴۲ روزگی) این گروه از پرندگان در مقایسه با پرندگان گروه شاهد شد (p<۰/۰۵؛ جدول ۴).

زردهٔ تخم‌مرغ منبع اصلی مواد مغذی برای جنین‌های در حال رشد است، به‌طوری که لیپیدها، ویتامین‌های محلول در چربی و کارتنوئیدها منحصراً در زرده یافت می‌شود [۲]. در این راستا، نتایج مطالعات مختلف در رابطه با تأثیر تزریق اسیدهای آمینه و کربوهیدرات‌ها به داخل تخم‌مرغ، حاکی از تأثیر مثبت تزریق این دسته از مواد بر عملکرد، ایمنی و کیفیت لاشهٔ جوجه‌های حاصل است [۶، ۷]. در عین حال، گزارش شده است که مادر در پاسخ به تغییرات محیطی نظیر تغییرات درجهٔ حرارت محیط، تغییر ترکیبات جیره و یا تنش‌های محیطی قادر به تعدیل میزان انباشت سطوح هورمون‌هایی از قبیل تستوسترون، استروژن، پروژسترون، کورتیکوسترون و یا هورمون‌های تیروئیدی در تخم‌مرغ است [۱۶]. لذا، سازوکارهای مؤثر در فرایند تکوین، رشد و حتی الگوهای رفتاری نتاج را برنامه‌ریزی و تعیین می‌کند. اعتقاد بر این است که این آثار بلندمدت احتمالاً به‌واسطهٔ تأثیر ترکیبات تخم‌مرغ بر شکل‌گیری الگوهای اپی‌ژنتیکی DNA نتاج در مراحل اولیهٔ دوران جنینی است. گزارش شده است که الگوهای اپی‌ژنتیکی که در اوایل دورهٔ جنینی شکل می‌گیرد، الگوهای بیان ژن را در مراحل بعدی تکامل به‌صورت معناداری تحت تأثیر قرارمی‌دهد [۱۰، ۱۱]. بر این اساس، از آنجا که در این مطالعه مرغان مادر برای مدت دو ماه در شرایط یکسان پرورش داده شدند، تأثیر تزریق زردهٔ خزک به راس روی عملکرد رشد ممکن است نه به‌واسطهٔ تأثیر عوامل محیطی، بلکه احتمالاً به‌واسطهٔ تأثیر نژاد از طریق ترکیبات زردهٔ تخم‌مرغ است.

جدول ۴. اثر تزریق زردهٔ مرغ بومی خزک به زردهٔ تخم‌مرغ سویهٔ راس بر جوجه‌درآوری و افزایش وزن (گرم) نتاج حاصل در هفته‌های مختلف پرورش (میانگین ± انحراف استاندارد)

تیمار / هفته	تفریخ (درصد)	تولد–۱۴ روزگی	۱۴–۲۸ روزگی	۲۸–۴۲ روزگی	۴۲ روزگی
تزریق	۵۰/۶۶ ± ۰/۷۹	۳۷۶/۰۷ ± ۹/۹۶^{a}	۸۱۸/۹۶ ± ۳۰/۹۸	۱۰۹۶/۵۶ ± ۳۶/۸۰^{a}	۲۳۳۵/۸۸ ± ۶۳/۳۸^{a}
شاهد	۴۹/۵۰ ± ۱/۱۷	۳۱۶/۷۹ ± ۱۵/۵۷^{b}	۶۹۷/۲۰± ۵۵/۱۱	۸۷۱/۶۵ ± ۶۱/۹۶^{b}	۱۹۲۷/۵۰± ۱۰۶/۶۸^{b}
P-value	۰/۴۱۹	۰/۰۰۳	۰/۰۵۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳

a-b تفاوت میانگین‌ها در هرستون معنادار است (p<۰/۰۵).

بر اساس نتایج این پژوهش، تزریق زردهٔ مرغ خزک به کیسهٔ زردهٔ تخم‌مرغ‌های سویهٔ راس اثر معناداری بر وزن نسبی کبد، طحال و بورس فابرسیوس در بازه‌های زمانی مورد بررسی نداشت (جدول ۵). هر چند عیار آنتی‌بادی تولیدشده بر علیه ویروس نیوکاسل حاکی از تأثیر مثبت تزریق زرده بر میانگین تیتر آنتی‌بادی تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل (ایمنی هومورال) بود، به‌طوری که عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل در جوجه‌های حاصل از تزریق زردهٔ مرغ بومی خزک در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود (p<۰/۰۵؛ جدول ۶).

گزارش‌های محققان نشان داد که تیموس، طحال، کبد و بورس فابرسیوس اندام‌های اصلی دخیل در تنظیم فعالیت سیستم ایمنی طیور به‌واسطهٔ ایفای نقش کلیدی در فاگوسیتوز مؤثر اریتروسیت‌ها، شناسایی پاتوژن‌ها یا تولید آنتی‌بادی‌هاست [۱۲، ۱۷]. از آنجا که در برخی مواقع افزایش وزن این اندام‌ها، بیانگر بهبود وضعیت ایمنی است، وزن نسبی اندام‌های لنفوییدی معمولاً شاخصه‌ای برای بررسی تأثیر افزودنی‌های غذایی، سموم یا تنش‌های محیطی بر عملکرد سیستم ایمنی طیور بررسی می‌شود [۱۷، ۲۲]. با وجود این، گزارش‌های متناقضی در خصوص تأثیر ترکیبات خوراک، مواد افزودنی، سموم یا تنش‌های محیطی بر هم‌بستگی وزن نسبی اندام‌های مذبور و کارایی سیستم ایمنی منتشر شده است [۱۷، ۲۲]. تناقض در گزارش‌ها ممکن است به‌دلیل عواملی چون نوع تیمار یا تنش، ترکیب مادهٔ غذایی، پایین‌بودن نمونه‌های آزمایشی یا به‌واسطهٔ خطای اندازه‌گیری باشد. هر چند علت تأثیر تزریق زرده بر کارایی ایمنی نتاج نامشخص است، گزارش شده است که ایمنی مادری حاصل از انتقال آنتی‌بادی‌های مادری، لکتین، لیزوزوم‌ها و سایر پپتیدهای ضدمیکروبی عامل اصلی مصونیت جوجه‌ها در مقابله با پاتوژن‌ها به‌خصوص در دوران اولیه زندگی است [۸، ۱۸].

جدول ۵. اثر تزریق زردهٔ تخم‌مرغ خزک به زردهٔ تخم‌مرغ سویهٔ راس بر وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی (درصد) در سنین ۲۷ و ۴۲ روزگی

	۲۷ روزگی			۴۲ روزگی		
تیمار	بورس	طحال	کبد	بورس	طحال	کبد
تزریق	۰/۲۷ ± ۰/۰۴	۰/۰۸ ± ۰/۰۲	۲/۹۸ ± ۰/۳۰	۰/۱۵ ±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۴	۲/۵۱±۰/۳۷
شاهد	۰/۳۵ ± ۰/۰۷	۰/۱۰ ± ۰/۰۲	۲/۶۰ ± ۰/۱۷	۰/۱۷ ± ۰/۰۵	۰/۱۵±۰/۰۳	۲/۴۲±۰/۱۳

جدول ۶. اثر تزریق زردهٔ خزک به زردهٔ تخم‌مرغ سویهٔ راس بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل

گروه آزمایشی	عیار پادتن تولیدشده علیه ویروس نیوکاسل [۱]
شاهد	۴ ± ۰/۲۱[a]
تزریق زرده	۴/۸۰ ± ۰/۶۳[b]
P-value	۰/۰۲۴

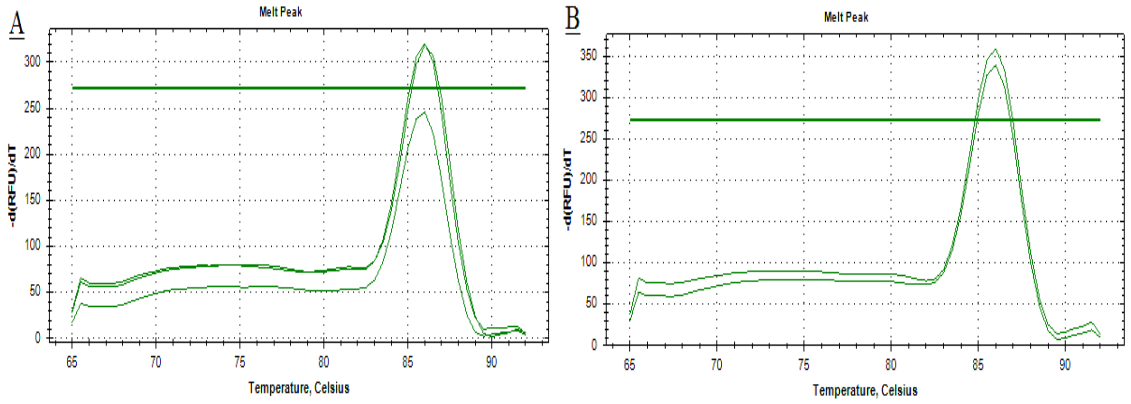
۱عکس لگاریتم در مبنای دو رقتی که از هموگلوتیناسیون جلوگیری کرده است

a-b تفاوت میانگین‌ها در هر ستون معنادار است (p<۰/۰۵).

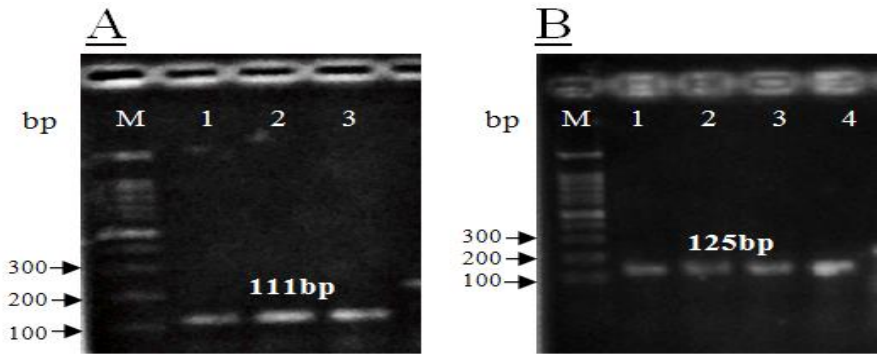
نتایج مطالعات گسترده در خصوص ارتباط بین تغییرات اقلیمی و پیامدهای اکولوژیکی و نیز پاسخ‌های تکاملی موجودات زنده نظیر پراکنش، فیزیولوژی و مورفولوژی دلالت بر اهمیت انعطاف‌پذیری فرایند تکوین در دوران جنینی در پاسخ به سیگنال‌های محیطی دارد. این مسئله تضمین‌کنندهٔ احتمال افزایش قابلیت بقا در مواجه با شرایط پیش‌بینی‌نشدهٔ آتی است. بر اساس مدل پاسخ پیش‌بینی آدابتاسیون به شرایط آتی (Predictive adaptive response) مادر قادر به کنترل فرایند تکوین جنین در مواجه با شرایط پیش‌بینی‌نشدهٔ آتی به‌واسطهٔ کنترل سطوح ترکیبات داخل تخم‌مرغ است، از قبیل هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها و مواد مغذی و ترکیبات ضد میکروبی تخم‌مرغ [۸، ۱۳].

از طرفی، گزارش شده است که انتقال تجارب مادر در مقابله با پاتوژن‌ها به نتاج (Trans-generational immune priming) آثار مثبتی بر ایمنی نتاج و مقاومت به بیماری‌ها دارد. در این خصوص گزارش شده است که چالش مادران با پاتوژن‌ها، سبب افزایش میزان انتقال آنتی‌بادی یا ترکیبات ضد میکروبی به نتاج می‌شود و افزایش مقاومت و زنده‌مانی نتاج در هنگام مواجهه با چالش‌های بعدی با پاتوژن‌ها را به‌دنبال دارد. به‌علاوه، آثار فرانسلی اپی‌ژنتیکی ناشی از شرایط محیطی مادر از قبیل وضعیت تغذیهٔ مادر، چالش مادر با پاتوژن‌ها و توکسین‌ها بر فرایند تکوین و نیز عملکرد سیستم ایمنی نتاج، به‌واسطهٔ تأثیر بر الگوی بیان ژن‌های مؤثر در فعالیت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی اثبات شده است [۱۰]. از دیدگاه تکاملی، توارث فرانسلی الگوهای اپی‌ژنتیکی (Transgenerational epigenetic inheritance) مربوط به کارایی سیستم ایمنی ممکن است راهبردی برای افزایش شانس زنده‌مانی در زمان مواجهه با تنش‌های آتی در پایداری ثبات جمعیت باشد [۸].

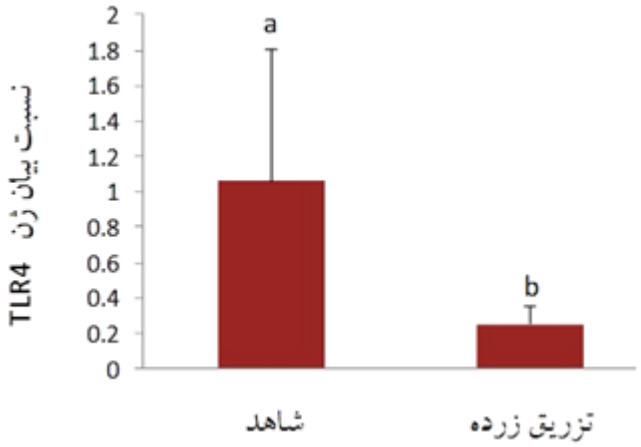
منحنی ذوب ژن‌های مورد بررسی (هدف و رفرنس) به‌صورت تک‌قله به‌دست آمد (شکل ۱)، که دلالت بر اختصاصی‌بودن واکنش‌های PCR دارد. علاوه‌بر این، الکتروفورز محصولات PCR بر ژل آگارز (درصد) نیز صحت اختصاصی‌بودن واکنش‌های PCR را تأیید کرد (شکل ۲).



شکل ۱. منحنی ذوب ژن‌های β-actin (A) و TLR4(B)



شکل ۲. الکتروفورز محصولات تکثیری ژن‌های TLR4(A) و β-actin (B) بر ژل آگارز ۱ درصد. طول قطعهٔ تکثیری در ژن‌های TLR4 و β-actin به‌ترتیب ۱۱۱و ۱۲۵ جفت باز بود. چاهک M نشانگر (Ladder) با اندازهٔ ۱۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد.



شکل ۳

[a-b] تفاوت میانگین‌ها در هر ستون معنادار است (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از آنالیز الگوی بیان ژن TLR4 در کبد نشان داد که تزریق زردهٔ خزک به تخم راس سبب کاهش معنادار بیان ژن TLR4 در بافت کبد گروه آزمایشی در مقابل گروه کنترل شد، به‌طوری که نسبت میزان بیان ژن TLR4 در کبد گروه تزریق زرده به گروه کنترل برابر با ۰/۲۳۵ بود (p<۰/۰۵).

محققان گزارش کرده‌اند که گیرنده‌های TLR4 موجود در سلول‌های کبدی قادر به شناسایی الگوهای مولکولی پاتوژن‌ها (PAMPs)، همچنین الگوهای مولکولی حاصل از آسیب‌های سلولی (DAMPs) نظیر پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) است [۹]. افزایش میزان تولید رادیکال‌های آزاد در پاسخ به شرایط استرس، جراحات و عفونت‌ها، سبب افزایش میزان اکسایش فسفولیپیدهای سلول می‌شود، که فرم اکسیدشدهٔ آن (OxPL) نقش آگونیست گیرنده‌های TLR4 را دارد [۲۱].

علاوه‌بر این، گزارش شده است که بروز سندرم‌های متابولیک نه‌تنها با بروز التهابات همراه است، بلکه سبب افزایش بیان TLR4 در مونوسیت‌ها می‌شود. افزایش

نفوذپذیری روده نسبت به باکتری‌های گرم منفی باعث فعال‌سازی گیرنده‌های TLR4 در خون و یا غدد لنفاوی می‌شود. تنش‌های سایکولوژیکی از دیگر عواملی است که سبب القای بیان TLR4 می‌شود؛ به‌عبارتی، گزارش‌شده است که TLRها در پاسخ‌های ایمنی- عصبی دخالت دارند [۴]. افزایش میزان بیان iNOS به‌واسطهٔ فعال‌شدن گیرندهٔ TLR4 به‌ترتیب با افزایش میزان آسیب DNA میتوکندری سلول‌های کبدی، افزایش فیبروز و نیز کاهش میزان ATP در سلول‌های کبدی همراه است [۱۴]. در مقابل گزارش شده است که مواجهه با ترکیبات لیپوپلی‌ساکاریدی دیوارهٔ باکتری‌ها سبب کاهش حساسیت ماکروفاژها به اندوتوکسین‌ها و سایر محرک‌های سیستم ایمنی می‌شود، که از آن با عنوان پدیدهٔ تحمل به اندوتوکسین‌ها (Endotoxin tolerance) یاد می‌شود [۱۹، ۲۰].

گزارش شده است که القای فعالیت ممانعت‌کننده‌های گیرندهٔ TLR4 و نیز ممانعت‌کننده‌های فعالیت فاکتورهای رونویسی NF-κB و AP-1 نظیر MAPK phosphatase-1 و SOCS-1 سبب کاهش بروز پاسخ‌های التهابی ناشی از لیپوپلی‌ساکاریدهای گرم منفی می‌شود [۱۹]. سازوکار عمل تزریق زرده بر کاهش میزان بیان ژن TLR4 کبدی مشخص نیست، ولی از آنجا که از جمله عوامل القای بیان TLR4، افزایش میزان انتشار الگوهای مولکولی مرتبط با تخریب (DAMPs) ناشی از فعالیت بیشینهٔ رادیکال‌های آزاد (ROS/RNS-induced DAMPs)، کاهش یا افزایش سطوح غلظت هورمون‌های استروییدی نظیر استروژن و تستوسترون است، بخشی از تفاوت الگوی بیان، ممکن است به‌دلیل تأثیر مادر بر الگوی بیان ژن‌های دخیل در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان‌ها، مسیرهای متابولیک و الگوهای رفتاری به‌واسطهٔ تأثیر بر فعالیت مدیفایرهای اپی‌ژنتیکی و یا غلظت هورمون‌های استروئیدی تخم‌مرغ باشد [۱۰، ۱۳].

روی‌هم‌رفته نتایج پژوهش حاضر مبین آن است که احتمالاً تزریق زردهٔ تخم‌مرغ‌های بومی خزک به تخم‌مرغ‌های سویهٔ تجاری راس در روز اول جنینی، سبب بهبود کارایی سیستم ایمنی و نیز عملکرد مرغان سویهٔ راس در سنین بالاتر می‌شود. بر این اساس، پیشنهاد می‌شود که بخشی از تفاوت‌های فنوتیپی نتاج نژادهای مختلف طیور ممکن است به‌دلیل تأثیر نژاد بری نسبت و ترکیب فاکتورهای مختلف زردهٔ تخم‌مرغ باشد که این عوامل احتمالاً بر روند شکل‌گیری الگوهای اپی‌ژنتیکی در دوران جنینی مؤثر است.

منابع

[1]. Abasht B, Kaiser MG, van der Poel J and Lamont SJ (2009) Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with Salmonella enterica serovar Enteritidis. Poultry Science 88: 744-9.

[2]. Anton M, Nau F and Nys Y (2006) Bioactive egg components and their potential uses. World's Poultry Science Journal 62: 429-38.

[3]. Bacon LD, Hunt HD and Cheng HH (2000) A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases. Poultry Science 79: 1082-93.

[4]. Bailey MT, Engler H, Powell ND, Padgett DA and Sheridan JF (2007) Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 293: R1180-90.

[5]. Berghof TV, Parmentier HK and Lammers A (2013) Transgenerational epigenetic effects on innate immunity in broilers: an underestimated field to be explored? Poultry Science 92: 2904-13.

[6]. Bhanja S, Sudhagar M, Goel A, Pandey N, Mehra M and Agarwal S (2014a) Differential expression of growth and immunity related genes influenced by in ovo supplementation of amino acids in broiler chickens. Czech Journal of Animal Science 59: 399-408.

[7]. Bhanja SK, Goel A, Pandey N, Mehra M, Majumdar S and Mandal AB (2015) In ovo carbohydrate supplementation modulates growth and immunity-related genes in broiler chickens. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 99(1): 163-173.

[8]. Broggi J, Soriguer RC and Figuerola J (2016) Transgenerational effects enhance specific immune response in a wild passerine. Peer J 4: e1766.

[9]. Chang WJ and Toledo-Pereyra LH (2012) Toll-like receptor signaling in liver ischemia and reperfusion. Journal of Investigative Surgery 25: 271-7.

[10]. Dixon LM, Sparks NH and Rutherford KM (2016) Early experiences matter: a review of the effects of prenatal environment on offspring characteristics in poultry. Poultry Science 95: 489-99.

[11]. Fresard L, Morisson M, Brun JM, Collin A, Pain B and Minvielle F (2013) Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. Genetics Selection Evolution 45: 16.

[12]. Gao B, Jeong WI and Tian Z (2008) Liver: An organ with predominant innate immunity. Hepatology 47: 729-36.

[13]. Groothuis TG and Schwabl H (2008) Hormone-mediated maternal effects in birds: mechanisms matter but what do we know of them? Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences 363: 1647-61.

[14]. Guo J and Friedman SL (2010) Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. Fibrogenesis Tissue Repair 3: 21.

[15]. Hossain KM, Ali MY and Yamato I (2010) Antibody levels against newcastle disease virus in chickens in Rajshahi and surrounding districts of Bangladesh. International Journal of Biology 2(2): 102-106.

[16]. Hsu BY, Dijkstra C, Darras VM, de Vries B and Groothuis TG (2016) Maternal adjustment or constraint: differential effects of food availability on maternal deposition of macro-nutrients, steroids and thyroid hormones in rock pigeon eggs. Ecology and Evolution 6: 397-411.

[17]. Kidd MT (2004) Nutritional modulation of immune function in broilers. Poultry Science 83: 650-7.

[18]. Lardinois A, van den Berg T, Lambrecht B and Steensels M (2014) A model for the transfer of passive immunity against Newcastle disease and avian influenza in specific pathogen free chickens. Avian Pathology: Journal of the WVPA 43: 118-24.

[19]. Liu ZJ, Liu XL, Zhao J, Shi YJ, Yan LN and Chen XF (2008) The effects of SOCS-1 on liver endotoxin tolerance development induced by a low dose of lipopolysaccharide are related to dampen NF-kappaB-mediated pathway. Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. 40: 568-77.

[20]. Lopez-Collazo E and del Fresno C (2013) Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. Critical Care 17: 242.

[21]. Lucas K and Maes M (2013) Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. Molecular Neurobiology 48: 190-204.

[22]. Manafi M, Pirany N, Noor Ali M, Hedayati M, Khalaji S and Yari M (2015) Experimental pathology of T-2 toxicosis and mycoplasma infection on performance and hepatic functions of broiler chickens. Poultry Science 94: 1483-92.

[23]. NRC (1994) Nutrient Requirements of Poultry. National Academy Press. Washington, DC.

[24]. O'Neill LA, Golenbock D and Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. Nature Reviews Immunology 13: 453-60.

[25]. Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 30: e36.

Journal of
Animal Production
(College of Abouraihan – University of Tehran)
Vol. 19 ■ No. 2 ■ Summer 2017

The effects of in-ovo injection of Native Khazak egg yolk into the Ross eggs yolk on performance, immunity and expression of TLR4 gene

Farzaneh Bazmandegan Shomeyli[1], Mehdi Vafaye Valleh[2], Gholamreza Dashab[2], Farzad Bagherzadeh Kasmani[3]*

1. M.Sc., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: December 3, 2016 **Accepted: January 15, 2017**

Abstract

To examine the possible role of maternal effect on progeny immune system development, the injection effects of the Khazak yolk into the yolk of the commercial Ross egg on the performance, immunity and expression of TLR4 was determined in a commercial Ross chicken. For this purpose, 150 Ross fertile eggs were randomly assigned to two experimental groups including group I (control in-ovo Ross yolk injection) and group II (in-ovo Khazak yolk injection) and were kept in incubator for three weeks. After incubation period, newly hatched chickens were fed with balanced ration for six weeks. Three chickens from each experimental group were killed at 27- and 42-d post hatch for analysis of immune organs weight (liver, burs and thymus), the HI anti-body titer levels and liver TLR4 mRNA expression levels. The results of statistical analysis demonstrated that the in-ovo injection of Khazak yolk into the Ross eggs not only significantly enhances growth rate and immune function but also decreases expression of TLR4 mRNA in the liver of treated group compared with the control group ($p<0.05$). Based on these results, it's possible that injection of Khazak yolk into the Ross eggs at the first day of embryonic development enhances the chicken immune response at older ages.

Keywords: egg yolk, Khazak native chickens, maternal effects, TLR4.

Email: Mehdi.Valleh@uoz.ac.ir