نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۱، زمستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۲۷~۳۸

# بررسی تاثیر عصاره گیاه آنیسون(*Pimpinella anisum L.*) و گلپر(*Heracleum persicum*) در مقایسه با اکسی‌تتراسایکلین و پروبیوتیک پریمالاک بر پاسخ ایمنی، جمعیت میکروبی ایلئوم و خصوصیات مورفولوژیکی تهی‌روده جوجه‌های گوشتی

- **مجید همتی**
  دانشجوی دکتری تغذیه دام دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک
- **جعفر فخرائی** (نویسنده مسئول)
  استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک.
- **اکبر یعقوبفر**
  استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **حسین منصوری‌یاراحمدی**
  استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

تاریخ دریافت : مهر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۳۶۰۷۱۵۷
Email: j-fakhraei@iau-arak.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.115546.1538

**چکیده**

**هدف از این آزمایش تعیین اثرات عصاره‌های گیاهان آنیسون و گلپر(۲۰۰ mg/kg) در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین(۲۰۰ mg/kg) و پروبیوتیک پریمالاک(۱۰۰ mg/kg) بر پاسخ ایمنی، جمعیت میکروبی ایلئوم و خصوصیات مورفولوژیکی تهی‌روده جوجه‌های گوشتی بود. تعداد ٤۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به پنج تیمار آزمایشی اختصاص داده شدند. هر تیمار شامل ٤ تکرار و هر تکرار دارای ۲۰ قطعه جوجه یک روزه بود. ارزیابی پاسخ ایمنی جوجه‌ها به کمک تزریق سوسپانسیون ۵ درصد گلبول قرمز گوسفند(SRBC)، بررسی جمعیت میکروبی روده با برداشتن محتویات ایلئوم پرنده‌ها و بررسی خصوصیات مورفولوژیکی روده با بریدن قسمت میانی تهی‌روده پس از کشتار صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان دادند که تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر عیار آنتی‌بادی علیه SRBC نداشتند. فراوانی هتروفیل‌ها و نسبت هتروفیل به لنفوسیت، تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی عصاره گیاهان آنیسون و گلپر کاهش معنی‌داری نشان دادند(P<۰/۰۵). جمعیت کل باکتری‌های هوازی، اشریشیاکلی و کلی‌فرم‌ها تحت تاثیر عصاره گیاه گلپر کاهش معنی‌داری داشتند(P<۰/۰۵). کلیه تیمارهای حاوی افزودنی در مقایسه با تیمار شاهد سبب افزایش معنی‌داری در ارتفاع پرزهای تهی‌روده شدند(P<۰/۰۵). نسبت طول پرز به عمق کریپت در پرزهای تهی‌روده توسط تیمارهای حاوی عصاره گیاه آنیسون و گلپر به طور معنی‌داری افزایش یافت(P<۰/۰۵). به طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان دادند که استفاده از عصاره گیاه آنیسون و گلپر به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره ممکن است باعث بهبود پاسخ ایمنی، کاهش جمعیت میکروبی مضر ایلئوم و بهبود خصوصیات مورفولوژیکی تهی‌روده جوجه های گوشتی شود.**

**واژه‌های کلیدی:** عصاره آنیسون، عصاره گلپر، آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک، جوجه‌های گوشتی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 121 pp: 27-38

**Evaluation the effect of anise (Pimpinella anisum L.) and angelica (Heracleum persicum) extracts in comparison with oxytetracycline and probiotice Primalac® on immune response, ileum microflora and jejunal morphological characteristics of broilers.**

By: M. Hemati[1], J. Fakhraei[2], A. Yaghobfar[3] & H. Mansouri Yarahmadi[2]
1:PhD student of animal nutrition, College of Agriculture and Natural Resource, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
2: Assistant Professor of Animal Science Department, College of Agriculture and Natural Resource, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
3: Research Professor of Animal Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj Iran

**Received: October 2017** **Accepted: February 2018**

The aim of this experiment was to determine the effects of anise and angelica extracts (200 mg/kg) in comparison with antibiotics oxytetracycline (200 mg/kg) and probiotic Primalace® (100 mg/kg) on immune response, ileal microflora and jejunal morphological characteristics of broilers. A total of 400 Ross 308 broiler chicks were assigned in a completely randomized design to five experimental treatments. Each treatment consisted of 4 replicates and 20 one-day old chicks per replication. The evaluation of immune response of chicks was conducted by injecting 5% SRBC suspension, assessment of ileal microflora by removing the ileum contents of the birds and examination of jejunal morphological characteristics by cutting the middle part of the jejunum after slaughter. The results of this study showed that experimental treatments had no significant effect on antibody titer against SRBC. The frequency of heterophils and heterophile to lymphocyte ratio decreased significantly affected by anise and angelica extracts ($P<0.05$). The total population of aerobic bacteria, Escherichia coli and Coliform bacteria decreased significantly by angelica extract ($P<0.05$). All treatments containing additive caused significant increase in jejunal villus height when compared to control treatment ($P<0.05$). The villus height to crypt depth ratio in jejunal was significantly increased by anise and angelica extracts ($P<0.05$). Generally, the results of this experiment showed that the use of anise and angelica extracts by amount of 200 mg/kg diet may improve immune response, reduce the harmful ileal microflora and improve jejunal morphological characteristics of broiler chickens.

**Key words:** Anise extract, Angelica extract, Antibiotic, Probiotic, Broilers.

**مقدمه**

امروزه صنعت پرورش طیور نقش قابل توجهی در زنجیره غذایی و تامین نیاز پروتئینی جوامع انسانی به عهده دارد. بنابراین افزایش تولید و در عین حال حفظ سلامتی طیور از اهداف اصلی پرورش‌دهندگان می‌باشد. یکی از معضلات صنعت پرورش طیور در دنیای امروز، عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی بیماریزای روده‌ای(Entropathogenes) نظیر اشریشیاکلی در گله‌های گوشتی است(Heres و همکاران، ۲۰۰۳). مصرف آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در گله‌ها موجب ایجاد مقاومت باکتریایی می‌گردد که برخی از این باکتری‌ها در دسته عوامل بیماری‌زای انسانی هستند(Langhout، ۲۰۰۰). بنابراین صنعت پرورش طیور باید به استفاده از آن دسته مواد افزودنی که مورد پسند مصرف‌کنندگان بوده و جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند، توجه نماید. امروزه مواد زیادی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در دسترس می‌باشند که از جمله آنها می‌توان فیتوبیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها را نام برد.

آنیسون(*Pimpinella anisum L.*) و گلپر(*Heracleum persicum*) از گیاهان دارویی هستند که کاربردهای متفاوتی در صنایع دارویی و غذایی دارند. این گیاهان متعلق به خانواده چتریان(*Apiaceae*) هستند(Nazemi و همکاران، ۲۰۰۵). گیاه آنیسون بومی سواحل غربی دریای مدیترانه، مصر و آسیای صغیر

است(Abdollahi Fard and Shojaii، 2012) و گیاه گلپر به عنوان گیاه بومی ایران در نقاط مرتفع کوهستانی(Asgarpanah و همکاران، ۲۰۱۲) می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، بهبود عملکرد دستگاه گوارش، درمان مشکلات تنفسی و اشتهاآور فرآورده‌های دو گیاه آنیسون(AbdollahiFard and Shojaii، 2012) و گلپر (Hemati و همکاران، ۲۰۱۰) نشان داده شده است. ترانس آنتول به عنوان ترکیب اصلی عصاره دانه این دو گیاه است. گلپر حاوی ۸۲/۸ درصد(Asgarpanah و همکاران، ۲۰۱۲) و آنیسون حاوی ۷۵/۲ درصد ترانس آنتول(Abdollahi and Shojaii Fard، 2012) می‌باشد. ترانس آنتول از نظر فرمول شیمیایی شبیه کاتکول آمین‌ها(آدرنالین، نورآدرنالین و دوپامین) می‌باشد(Besharati-Seidani و همکاران، ۲۰۰۵). این گیاهان همچنین حاوی مقداری فلاونوئید، اسیدهای چرب، استیگماسترول، استیگماستریل استئارات، استیگماسترول پالمیتات و ترکیبات پالمیتات کومارینی از خانواده مواد فنولی گیاهی می‌باشند(Evance and Trase، 1996). بتاپینن یکی دیگر از ترکیبات مهم اسانس آنیسون و گلپر می‌باشد که خاصیت باکتریواستاتیک دارد(Bown, 1995) . گیاه گلپر تحریک کننده فعالیت هر دو سیستم ایمنی خونی و سلولی در بدن موش می‌باشد. این فعالیت به حضور فلاونوئیدها یا فورانوکومارین‌ها نسبت داده شده است(Jafarzadeh و همکاران، ۲۰۱۴). در مطالعه‌ای استفاده از دانه آنیسون در خوراک جوجه‌های گوشتی سبب افزایش عیار آنتی‌بادی علیه ویروس آنفلونزا شد( Fekri Yazdi و همکاران، ۲۰۱۴). با توجه به تاثیر باکتریواستاتیکی گیاهان آنیسون و گلپر بر میکروب‌ها، همچنین تاثیر بر سیستم دفاعی بدن و عملکرد دستگاه گوارش حیوانات، به دلیل داشتن آنتول، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی پتانسیل عصاره‌های این دو گیاه به عنوان افزودنی‌های با منشا طبیعی به عنوان جایگزین افزودنی‌هایی شامل آنتی‌بیوتیک اکسی‌تراسایکلین و پروبیوتیک پریمالاک در تغذیه جوجه‌های گوشتی بود.

## مواد و روشها

به منظور تهیه عصاره، یک کیلوگرم پودر دانه آنیسون و گلپر به صورت مجزا در چهار لیتر حلال اتانول ۷۰ درصد در داخل یک ارلن پنج لیتری خیسانده و سپس ارلن فوق داخل انکوباتوری مجهز به همزن در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت پنج ساعت تکان داده شد. محلول حاصل با استفاده از پمپ خلاء از چهار لایه دستمال کتانی مخصوص تنظیف، عبور داده شد. سپس اتانول موجود در عصاره به دست آمده با تبخیر کننده چرخان در فشار کم و حمام آب ۴۵ درجه سانتیگراد تبخیر و عصاره حاصل با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک و برای استفاده در جیره با هاون پودر شد(Kossah و همکاران، ۲۰۱۰). مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در هر یک از عصاره‌ها با استفاده از روش فولین سیوکالتچو(Folin Ciocalteu Method) اندازه‌گیری شد(Gillespie and Ainsworth، 2007). به طوری که عصاره گلپر و آنیسون به ترتیب حاوی ۳۵/۸ و ۴۲/۲۷ درصد ترکیبات فنولی بودند.

تعداد ۴۰۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به پنج تیمار، چهار تکرار و ۲۰ پرنده در هر تکرار اختصاص داده شدند. تیمار شاهد بر پایه ذرت-کنجاله سویا بدون افزودنی بر مبنای احتیاجات توصیه شده توسط راهنمای پرورش جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ برای سه دوره آغازین(سن صفر تا ۱۰ روزگی)، رشد(سن ۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی(سن ۲۵ تا ۴۲ روزگی) تنظیم شد(Ross، ۲۰۱۴). چهار تیمار دیگر با اضافه کردن مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره آنیسون، عصاره گلپر و آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین ۲۰ درصد و ۱۰۰ میلی‌گرم پروبیوتیک پریمالاک® (شرکت نیک اندیشان فرجاد، تهران، ایران) به هر کیلوگرم از تیمار شاهد تهیه شدند. پروبیوتیک پریمالاک حاوی نسبت مساوی از باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus casei*، *Enterococcus faecium* و *Bifidobacterium bifidium* بود. مقدار عصاره در تحقیق حاضر بر اساس سطح بهینه توصیه شده توسط محققان پیشین(Shirzadi، ۲۰۱۵) در زمینه استفاده از عصاره گیاهان دارویی در تغذیه طیور در نظر گرفته شد. همچنین سطح استفاده از آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک نیز بر اساس توصیه شرکت‌های سازنده بود(Nayebpor و همکاران، ۲۰۰۷) و در طول دوره آزمایش، پرندگان آزادانه به آب و خوراک دسترسی داشتند.

**جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی در دوره‌های آغازین(سن صفر تا ۱۰ روزگی)، رشد(سن ۱۱ تا ۲٤ روزگی) و پایانی(سن ۲۵ تا ٤۲ روزگی)**

| ماده خوراکی (درصد) | دوره‌های پرورش | | |
|---|---|---|---|
| | جیره آغازین (سن صفر تا ۱۰ روزگی) | جیره رشد (سن ۱۱ تا ۲۴ روزگی) | جیره پایانی (سن ۲۵ تا ۴۲ روزگی) |
| ذرت | ۵۴/۳۲ | ۵۸/۰۰ | ۶۶/۰۰ |
| کنجاله سویا، ۴۴ درصد | ۳۹/۸۰ | ۳۵/۲۲ | ۲۹/۰۰ |
| روغن سویا | ۲/۱۵ | ۳/۳۰ | ۲/۰۰ |
| صدف | ۰/۸ | ۰/۷۰ | ۰/۶۵ |
| دی کلسیم فسفات | ۱/۷۵ | ۱/۶۵ | ۱/۳۰ |
| مکمل مواد معدنی* | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ |
| مکمل ویتامینی* | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ |
| نمک | ۰/۲۳ | ۰/۲۳ | ۰/۲۰ |
| دی ال- متیونین | ۰/۲۸ | ۰/۲۰ | ۰/۲۰ |
| لیزین | ۰/۱۷ | ۰/۲۰ | ۰/۱۵ |
| عصاره آنیسون[1](جیره دوم) | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ |
| عصاره گلپر[2](جیره سوم) | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ |
| آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین[3](جیره چهارم) | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ | ۰/۰۲ |
| پروبیوتیک پریمالاک[4](جیره پنجم) | ۰/۰۱ | ۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| ترکیب مواد مغذی جیره | | | |
| انرژی قابل سوخت و ساز(کیلوکالری در کیلوگرم) | ۲۹۸۰ | ۳۱۰۰ | ۳۱۵۰ |
| پروتئین خام(درصد) | ۲۳/۰۰ | ۲۱/۲۴ | ۱۹/۰۸ |
| متیونین(درصد) | ۰/۵۱ | ۰/۵۰ | ۰/۴۷ |
| متیونین+ سیستئین(درصد) | ۰/۹۵ | ۰/۸۱ | ۰/۷۶ |
| لیزین(درصد) | ۱/۲۹ | ۱/۲۳ | ۱/۰۴ |
| ترئونین(درصد) | ۰/۸۰ | ۰/۷۱ | ۰/۶۳ |
| تریپتوفان(درصد) | ۰/۳۵ | ۰/۲۶ | ۰/۲۲ |
| کلسیم(درصد) | ۰/۹۸ | ۰/۹۰ | ۰/۷۶ |
| فسفر قابل دسترس(درصد) | ۰/۴۶ | ۰/۴۴ | ۰/۳۷ |
| سدیم(درصد) | ۰/۲۰ | ۰/۲۰ | ۰/۲۰ |

* مقدار مواد معدنی و ویتامین ها در هر کیلوگرم جیره شامل: ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۸۵ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن،۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۳ میلی‌گرم ید، ۴۴۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۴۴۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۴۰ میلی‌گرم ویتامین K، ۷۰ میلی‌گرم کوبالامین، ۶۵ میلی‌گرم تیامین، ۳۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۲۹۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۲۰ میلی‌گرم نیاسین ، ۶۵ میلی‌گرم پیریدوکسین ، ۲۲ میلی‌گرم بیوتین و ۲۷۰ میلی‌گرم کولین کلراید بود.

[1]عصاره آنیسون در کل دوره پرورش به جیره شاهد افزوده و به عنوان جیره دوم مورد آزمایش قرار گرفت.

[2]عصاره گلپر در کل دوره پرورش به جیره شاهد افزوده و به عنوان جیره سوم مورد آزمایش قرار گرفت.

[3]آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین ۲۰ درصد در کل دوره پرورش به جیره شاهد افزوده و به عنوان جیره چهارم مورد آزمایش قرار گرفت.

[4]پروبیوتیک پریمالاک در کل دوره پرورش به جیره شاهد افزوده و به عنوان جیره پنجم مورد آزمایش قرار گرفت.

به منظور بررسی سیستم ایمنی خونی جوجه‌ها، در سن ۲۸ روزگی سه پرنده از هر تکرار، به طور تصادفی انتخاب و پس از علامت‌گذاری، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۵ درصد گلبول قرمز گوسفند(SRBC) به ماهیچه سینه آنها تزریق شد. ۷ روز پس از تزریق، از این پرنده‌ها از طریق سیاهرگ بال دو میلی‌لیتر خونگیری شد(Schulten و همکاران، ۲۰۰۷). نمونه‌های سرم خون برای تعیین عیار آنتی‌بادی علیه SRBC به آزمایشگاه ارسال شدند. عیار پادتن تولید شده علیه SRBC با استفاده از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر اندازه‌گیری شد( Wegmann and Smithies, 1966). برای شمارش گلبولهای قرمز و سفید از روش دستی با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار، میکروسکوپ نوری و رقیق‌کننده نات و هریک( Natt and Herrick, 1952) و برای اندازه‌گیری حجم گلبولهای قرمز خون(هماتوکریت) از روش میکروهماتوکریت (Jain، ۱۹۸۶) استفاده شد. در نهایت برای محاسبه نسبت هتروفیل به لنفوسیت پس از تهیه گسترش خون و رنگ‌آمیزی با رنگ رایت در سن ۳۵ روزگی از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده و تعداد هتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها شمارش و نسبت مربوطه محاسبه شد.

برای تعیین جمعیت میکروبی روده، یک گرم مواد دفعی از محتویات ایلئوم در شرایط استریل خارج شده و به نسبت ۱:۱۰ با سرم فیزیولوژی حاوی گلیسیرین هموژنیزه شد. پس از ساختن سری رقیق‌سازی شده، از رقت‌های مناسب روی محیط کشت اختصاصی ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد(Shirzadi، ۲۰۱۵). برای شمارش کلونی‌های کلی‌فرمها، اشریشیاکلی و کل باکتریهای هوازی از محیط کشت‌های پلیت کانت آگار(PCA) و Mac Conkey آگار استفاده شد(Li، ۱۹۹۱). نتایج به صورت $\log_{10}$ واحد تشکیل کلونی به ازای هر گرم محتویات ایلئوم( $\log_{10}\frac{cfu}{g}$ $\frac{\text{cfu}}{\text{g}}$) گزارش شد. تعداد باکتری در هر گرم نمونه با در نظر گرفتن وزن نمونه، عامل رقت و حجم قطره کشت شده مطابق رابطه ۱ می‌باشد(Shirzadi، ۲۰۱۵).

باکتری تعداد=کلونی تعداد*رقت عکس*شده داده کشت حجم (۱)

برای مطالعه ساختار پرزهای بافت روده، نمونه‌هایی از تهی‌روده تهیه و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند. برای تهیه اسلایدهای بافتی با ضخامت کم، از روش واکس پارافین استفاده شد. برای برش‌گیری از قالب پارافینی، از دستگاه میکروتوم استفاده شد. اسلایدها پس از پارافین‌زدایی و آبگیری به مدت ۱۵ دقیقه در محلول حاوی ۵ گرم در لیتر پریودیک اسید - شیف نگهداری شدند و پس از شستشو با آب به مدت ۳۰ دقیقه در محلول شیف قرار گرفتند(Mc Manus، ۱۹۸۴) و از ائوزین برای رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم استفاده شد. برای اندازه‌گیری ارتفاع و عرض پرز از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ برابر و برای عمق کریپت از درشت نمایی ۱۰۰ برابر استفاده شد. به این منظور یکی از عدسی های چشمی میکروسکوپ به گراتیکول مجهز شد. ارتفاع پرز( از راس پرز تا قاعده آن)، عرض پرز(عرض پرز در پایین ترین مقطع در محل اتصال به کریپت) و عمق کریپت( از قاعده پرز تا انتهای غدد) با انطباق گراتیکول بر ناحیه مورد نظر اندازه‌گیری شد(Bradley و همکاران، ۱۹۹۴). در پایان مقادیر یادداشت شده بر اساس کالیبراسیون انجام شده با استفاده از اسلاید میلی‌متری، به میکرومتر تبدیل شدند. در هر نمونه تعداد ۱۰ پرز برای اندازه گیری ابعاد پرز استفاده گردید و متوسط آن‌ها برای تجزیه آماری استفاده شد. همچنین مساحت سطح پرز با استفاده از فرمول ۲ تعیین گردید(Sakamoto و همکاران، ۲۰۰۰).

پرز سطح مساحت=[(π۲)×( پرز پهنای ÷ ۲)×( ارتفاع)] (۲)

داده‌های حاصل با استفاده از رویه مدل‌های خطی عمومی نرم افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ (SAS، ۲۰۰۲)برای مدل آماری ۳ تجزیه و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (۳)$$

در این رابطه؛ $Y_{ij}$ مقدار مشاهده تیمار iام در تکرار jام، $\mu$ میانگین جامعه، $T_i$، اثر تیمارiام، و $e_{ij}$ اثر خطای آزمایش مربوط به تیمار iام در تکرار jام است.

## نتایج و بحث

### پاسخ ایمنی

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر عیار آنتی‌بادی علیه SRBC در جدول ۲ نشان داده شده است. هر چند که عیار آنتی‌بادی علیه SRBC تحت تاثیر معنی‌دار هیچ یک از تیمارها قرار نگرفت. تیمارهای حاوی عصاره آنیسون و گلپر در مقایسه با تیمار شاهد باعث افزایش کمی ایمنی خونی اولیه(سن ۳۵ روزگی) شدند. نتایج پژوهشهای افزودن ۰/۹ درصد پودر دانه آنیسون به جیره جوجه‌های گوشتی(Rezaei و همکاران، ۲۰۱۶) و افزودن ۰/۹ درصد پودر دانه گلپر به جیره جوجه‌های گوشتی(Hosseini و همکاران، ۲۰۱۶) افزایش معنی‌داری در عیار آنتی‌بادی علیه SRBC در سن ۳۵ روزگی در مقایسه با تیمار شاهد را نشان دادند. در پژوهشی، افزودن دانه آنیسون به جیره جوجه‌های گوشتی تاثیری بر تیتر آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل نداشت(Soltan و همکاران، ۲۰۰۸). اختلاف در سطوح به کار رفته دانه آنیسون و نوع آنتی‌ژن تزریق شده می‌تواند موجب پاسخ‌های متفاوت ایمنی در مطالعات شود. همچنین در مطالعه بر گیاه دارویی رازیانه، که خواص مشترکی با آنیسون و گلپر به دلیل وجود آنتول دارد، استفاده از رازیانه در جیره جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری بر عیار آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز گوسفند نداشت(Hosseini و همکاران، ۲۰۱۴).

**جدول ۲. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر عیار آنتی‌بادی علیه SRBC در جوجه‌های گوشتی**

| صفت | تیمارها | | | | | مولفه‌های آماری | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | عصاره آنیسون | عصاره گلپر | آنتی‌بیوتیک | پروبیوتیک | SEM | P - value |
| عیار آنتی‌بادی علیه هماگلوتیناسیون با SRBC ($Log_{10}$) | ۵/۶۷ | ۷/۳۳ | ۶/۰۱ | ۴/۶۷ | ۵/۰۰ | ۰/۷۸ | ۰/۳۹ |

SEM، اشتباه استاندارد میانگین‌ها

به طور کلی گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنها می‌توانند باعث افزایش قدرت سیستم ایمنی و بهبود رشد دام و طیور شوند. استفاده از عصاره‌های گیاهی مختلف موجب افزایش عیار آنتی‌بادی علیه SRBC در مقایسه با گروه شاهد شد(Mathivanan و Kalaiarasi، ۲۰۰۷). با تحریک سیستم ایمنی توسط پروتئین خارجی، می‌توان عکس‌العمل آنتی‌بادی بر ضد این پروتئین را مشاهده نمود. قدرت آنتی‌بادی به عنوان شاخصی از توانایی سیستم ایمنی خونی در تحقیقات ایمونولوژی دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد(Cheng و همکاران، ۱۹۹۱). میزان پاسخ ایمنی بر اساس تنوع ژنتیکی و محیطی که عامل تغذیه را نیز در بردارد، متغیر می‌باشد. پاسخ ایمنی قوی‌تر نشان دهنده قدرت بیشتر در مقابل عوامل بیماریزای خارجی است. بنابراین، پاسخ آنتی‌بادی بدست آمده دارای همبستگی مثبت با مقاومت عمومی حیوان در مقابل بیماری‌ها می‌باشد(Svensson و همکاران، ۲۰۰۲).

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تعداد و فراوانی گلبولهای سفید خون جوجه‌های گوشتی در سن ۳۵ روزگی در جدول ۳ ارائه شده است. تیمارهای آزمایشی اثر معنی‌داری بر تعداد کل گلبولهای سفید خون و همچنین فراوانی لنفوسیتها، مونوسیتها و ائوزینوفیل‌ها در سرم خون جوجه‌های گوشتی نداشتند در حالیکه فراوانی هتروفیل‌ها و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تحت تاثیر معنی‌دار تیمارها قرار گرفتند. با توجه به نتایج ارائه شده در جداول ۲ و ۳ افزایش درصد لنفوسیتها علی‌رغم غیر معنی‌دار بودن در تیمارهای گروه آنیسون و گلپر در مقایسه با تیمار شاهد این احتمال را

تقویت می کند که افزایش عیار آنتی‌بادی علیه SRBC ممکن است مربوط به افزایش این دسته از لوکوسیت‌ها باشد که در حقیقت مسئول تولید آنتی‌بادی‌ها هستند. افزایش هتروفیل‌ها اغلب نشانه التهاب است و هرچقدر درصد آنها بالاتر باشد، بیانگر کاهش مقاومت بدن در مقابل عوامل عفونت‌زا است. در صورتی که بالا بودن درصد لنفوسیتها، دلیل بر افزایش مقاومت بدن و تولید سلول‌های ایمنی‌زا می‌باشد که این افزایش توام با کاهش درصد هتروفیل‌ها را می‌توان نشانه‌ای از مقاومت بالای بدن در مقابل عوامل ایجاد کننده بیماری دانست(Arora و همکاران، ۲۰۰۵). در این مطالعه، افزودن عصاره‌های آنیسون و گلپر به جیره جوجه‌های گوشتی موجب کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مقایسه با تیمارهای دیگر شد که نشانه کاهش روند التهابی و بهبود پاسخ سیستم ایمنی سلولی می‌باشد. در پژوهشی، استفاده از آنیسون در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی موجب افزایش معنی‌داری از نظر درصد لنفوسیت‌های خون شد، اما تاثیر معنی‌داری بر درصد مونوسیت‌ها، ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها نداشت(Soltan و همکاران، ۲۰۰۸) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. شدت پاسخ ایمنی در جوجه‌ها همچنین به میزان تکامل سیستم ایمنی، وجود عوامل تضعیف کننده ایمنی، عفونت‌های موجود در گله، وضعیت تغذیه‌ای و وجود افزودنی‌های محرک سیستم ایمنی با منابع گوناگون گیاهی بستگی دارد. تحت شرایط ایجاد کننده استرس از قبیل گرما، سرمای شدید، تراکم زیاد گله، غلظت زیاد آمونیاک و نوسانات شدید جوی؛ پاسخ ایمنی کمتر از میزان مطلوب است. این موارد نیز ممکن است سبب تفاوت‌هایی در پاسخ ایمنی به دست آمده از مصرف افزودنی‌های گیاهی در جیره جوجه‌های گوشتی شود(Rezaei و همکاران، ۲۰۱۶).

**جدول ۳. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تعداد و فراوانی گلبول‌های سفید خون جوجه‌های گوشتی**

| صفات | تیمارها | | | | | مولفه‌های آماری | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | عصاره آنیسون | عصاره گلپر | آنتی‌بیوتیک | پروبیوتیک | SEM | P - value |
| گلبول سفید($\times 10^3/\mu L$) | ۲۳/۸۷ | ۲۷/۸۳ | ۲۵/۱۰ | ۲۰/۶۷ | ۲۵/۲۷ | ۰/۰۸ | ۰/۵۹ |
| هتروفیل(درصد) | ۴۰/۳۳$^{a}$ | ۳۳/۶۷$^{b}$ | ۳۴/۰۰$^{b}$ | ۳۸/۳۳$^{a}$ | ۴۰/۰۰$^{a}$ | ۷/۰۹ | ۰/۰۲ |
| لنفوسیت(درصد) | ۶۴/۶۶ | ۷۲/۶۷ | ۶۸/۳۳ | ۷۴/۳۳ | ۷۲/۳۳ | ۷/۳۸ | ۰/۷۶ |
| هتروفیل به لنفوسیت | ۰/۶۲$^{a}$ | ۰/۴۶$^{b}$ | ۰/۵۰$^{b}$ | ۰/۵۲$^{b}$ | ۰/۵۵$^{ab}$ | ۰/۰۵ | ۰/۰۳ |
| مونوسیت(درصد) | ۰/۳۳ | ۰/۶۷ | ۰/۳۳ | ۰/۶۷ | ۱/۰۰ | ۰/۸۱ | ۰/۶۳ |
| ائوزینوفیل(درصد) | ۱/۳۳ | ۱/۳۳ | ۱/۳۳ | ۰/۶۷ | ۱/۶۷ | ۰/۸۵ | ۰/۷۰ |

$^{a-c}$: در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0/05$).
SEM، اشتباه استاندارد میانگین‌ها

جمعیت میکروبی روده: تاثیر تیمارهای مختلف بر میکروبیولوژی ایلئوم روده کوچک جوجه های گوشتی در جدول ۴ نشان داده شده است. جمعیت کل باکتری‌های هوازی، اشریشیاکلی و کلی‌فرم‌ها در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشت($P<0/05$). تیمار حاوی عصاره گلپر به دلیل خاصیت باکتریواستاتیکی و توان ضد میکروبی بالای گلپر(Jafarzadeh و همکاران، ۲۰۱۴)، در مقایسه با بقیه تیمارها کمترین تعداد باکتری‌ها را داشت. در چندین تحقیق فعالیت ضد میکروبی گیاهان آنیسون و گلپر(AyferAtefi و Erdogrul، ۲۰۰۳؛ Al-Bayati، ۲۰۰۸؛ Hemati و همکاران، ۲۰۱۰) به اثبات رسده است.

در مطالعه‌ای(Mountzouris و همکاران، ۲۰۰۸) گزارش شد که افزودن ترکیب تجاری اسانس گیاهی تهیه شده از مرزنجوش و آنیسون به میزان ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره فاقد داروی کوکسیدیواستات باعث تغییر در ترکیب جمعیت میکروبی روده از طریق افزایش سطوح لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکترها شد. در تایید این مشاهدات جمعیت باکتری‌های بیماری‌زای روده کاهش

یافت در حالیکه تعداد زیادی از گونه‌های میکروبی مفید در برابر فیتوبیوتیکها مقاوم بوده و جمعیت آنها دچار تنزل نشد(Ouwehand و همکاران، ۲۰۱۰). در گزارش دیگری استفاده از اسانس‌های حاصل از گیاهان پونه کوهی، سیر و یک ترکیب تجاری حاوی اسانس‌های پونه کوهی، آنیسون و پوست مرکبات در جیره جوجه‌های گوشتی تاثیر معنی‌داری بر شمارش کلی‌فرم‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها، سالمونلا، انتروکوکوس‌ها، استرپتوکوکوس‌ها و کل باکتری‌های موجود در ایلئوم آنها نداشت(Hong و همکاران، ۲۰۱۲).

به طور کلی شیوه عمل فیتوبیوتیکها بر میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش شناخته شده نیست. با این حال تصور بر این است که سوراخ کردن غشای باکتری یا اتصال به آن شیوه اصلی فعالیت آنها می‌باشد(Stiles و همکاران، ۱۹۹۵( که منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و تراوش ترکیبات حیاتی درون سلولی به خارج باکتری(Juven و همکاران، ۱۹۹۴) و همچنین سبب اختلال در تعادل کاتیون-آنیون درون سلول میکروبی(Cabuk و همکاران، ۲۰۰۶( می‌شود، که این امر منجر به مهار فعالیت آنزیم‌های باکتریایی(Farag و همکاران، ۱۹۸۹) و تخریب دیواره سلولی باکتری می‌شود. در تحقیق حاضر کاهش در جمعیت باکتری‌های بیماریزای مستقر در ایلئوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره گیاه گلپر ممکن است به دلیل ترکیبات فنولی موجود در آن باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که آنتی‌بیوتیک اکسی‌تراسایکلین سبب کاهش معنی‌داری در جمعیت کل باکتری‌های هوازی و اشریشیاکلی در مقایسه با تیمار شاهد نشد. در تایید این نتایج گزارش شده است که استفاده از آنتی‌بیوتیک در تغذیه جوجه‌های گوشتی تاثیر معنی‌داری بر شمارش کل باکتری‌های هوازی و غیر هوازی، کلی‌فرم‌ها، گونه‌های باکترویید و کوکسی‌های گرم مثبت نداشت، اما سبب کاهش معنی‌دار گونه‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس شد(Mountzouris و همکاران، ۲۰۰۸).

مورفولوژی روده کوچک: تاثیر تیمارهای مختلف بر مورفولوژی تهی‌روده جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ نشان داده شده است. کلیه تیمارهای حاوی افزودنی در مقایسه با تیمار شاهد سبب افزایش معنی‌داری در ارتفاع پرزهای تهی‌روده شدند($P<0/05$). عرض پرز و عمق کریپت تحت تأثیر معنی‌دار هیچ یک از تیمارها قرار نگرفتند. افزون بر این، نسبت طول پرز به عمق کریپت در پرزهای تهی‌روده توسط تیمارهای حاوی عصاره آنیسون و گلپر به طور معنی‌داری افزایش یافت($P<0/05$)، هرچند که بین این تیمارها و تیمارهای حاوی پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.

**جدول ٤. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی ایلئوم جوجه‌های گوشتی**

| جمعیت میکروبی ایلئوم $\log_{10}\frac{cfu}{g}$ | تیمارها | | | | | مولفه‌های آماری | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | عصاره آنیسون | عصاره گلپر | آنتی‌بیوتیک | پروبیوتیک | SEM | P-value |
| کل باکتری‌های هوازی | ۱۰/۴۹$^{a}$ | ۸/۴۷$^{ab}$ | ۶/۲۱$^{c}$ | ۹/۴۳$^{a}$ | ۷/۹۵$^{b}$ | ۰/۳۷ | ۰/۰۴ |
| اشریشیاکلی | ۳/۵۳$^{a}$ | ۳/۶۳$^{a}$ | ۱/۸۷$^{b}$ | ۳/۷۳$^{a}$ | ۳/۴۳$^{a}$ | ۰/۱۴ | ۰/۰۳ |
| کلی‌فرم | ۶/۵۲$^{a}$ | ۴/۷۹$^{b}$ | ۲/۱۶$^{c}$ | ۲/۲۲$^{c}$ | ۴/۶۸$^{b}$ | ۰/۵۴ | ۰/۰۱ |

$^{a-c}$: در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0/05$).

SEM، اشتباه استاندارد میانگین‌ها

**جدول ۵. تاثیر تیمارهای آزمایشی بر مورفولوژی تهی‌روده جوجه‌های گوشتی**

| صفات | تیمارها | | | | | مولفه‌های آماری | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | شاهد | عصاره آنیسون | عصاره گلپر | آنتی‌بیوتیک | پروبیوتیک | SEM | P - value |
| طول پرز(µm) | ۱۰۴۶/۰۰$^{c}$ | ۱۲۲۴/۲$^{a}$ | ۱۱۹۳/۶$^{ab}$ | ۱۱۳۴/۶$^{b}$ | ۱۲۱۷/۴$^{ab}$ | ۲۶/۸۵ | ۰/۰۰۱ |
| عرض پرز(µm) | ۱۲۰/۲۰ | ۱۰۷/۲۰ | ۱۲۰/۴۰ | ۱۱۲/۶۰ | ۱۱۴/۸ | ۵/۰۹ | ۰/۳۴۷ |
| عمق کریپت(µm) | ۱۱۹/۰۰ | ۱۲۲/۴۰ | ۱۱۰/۰۰ | ۱۱۲/۶۰ | ۱۱۲/۲۰ | ۵/۶۰ | ۰/۵۳۲ |
| طول پرز : عمق کریپت | ۸/۷۹$^{b}$ | ۱۰/۰۰$^{a}$ | ۱۰/۸۵$^{a}$ | ۱۰/۰۸$^{a}$ | ۱۰/۸۵$^{a}$ | ۰/۳۷۶ | ۰/۰۱۱ |
| مساحت پرز($mm^2$) | ۰/۴۴۵$^{b}$ | ۰/۴۷۷$^{ab}$ | ۰/۵۰۰$^{a}$ | ۰/۴۶۰$^{ab}$ | ۰/۴۹۵$^{ab}$ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۲۴ |

$^{a-c}$: در هر ردیف میانگین‌های دارای حروف متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

SEM، اشتباه استاندارد میانگین‌ها

در تحقیقی گزارش شده است که ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در روده کوچک جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی سیر، افزایش یافت(Adibmoradi و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که افزودن عصاره برگ چای به جیره جوجه‌های گوشتی به طور معنی‌داری ارتفاع پرزها و عمق کریپت‌های ایلئوم را افزایش داد اما تاثیر معنی‌داری بر نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت نداشت(Khalaji و همکاران، ۲۰۱۱).

در مطالعه‌ای تغذیه خوک‌ها با جیره حاوی مواد غنی از فلاونوئیدها، بر ارتفاع پرزهای روده تاثیر مثبت داشت. (Sehm و همکاران، ۲۰۰۶). گزارش شده است که استفاده از فیتوبیوتیک‌ها در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی سبب تکثیر و رشد سلول‌های جذبی دستگاه گوارش می‌شود، که این امر منتجر به بلندتر شدن ارتفاع پرز و عمیق‌تر شدن کریپت می‌گردد(Jamroz و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین گزارش شده است که اگرچه تعداد باکتری‌های ایلئوم تحت تاثیر اسانس‌های گیاهی قرار نگرفت اما غلظت آمونیاک موجود در ایلئوم کاهش و ارتفاع پرزهای دوازدهه نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت(Hong و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین افزایش ارتفاع پرزها بواسطه تغذیه جیره‌های حاوی عصاره‌های آنیسون و گلپر ممکن است نتیجه کاهش تولید سم(نظیر آمونیاک) ناشی از باکتری‌های بیماریزا باشد که تعداد آنها توسط این افزودنی‌های خوراکی دچار کاهش شده است.

همانطور که بیان شد، جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش بواسطه تولید سم باعث افزایش تخریب و ساخت مجدد بافت روده و در نتیجه کاهش ارتفاع پرز و عمیق تر شدن کریپت می‌شود(Pluske و همکاران، ۱۹۹۷; Cook and Bird، 1973)، بهبود تعادل میکروبی به سمت باکتریهای مفید سبب کاهش تخریب و ساخت مجدد بافتی روده می‌گردد، که این عامل باعث می‌شود تا تفاوت ارتفاع پرز و درنتیجه نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در روده پرندگان تغذیه شده با عصاره های آنیسون و گلپر در مقایسه با گروه شاهد مشخص باشد.

در گزارشی، همگام با افزایش تعداد باکتری‌های بیماریزا در دستگاه گوارش، تغییراتی در ساختار موکوسی آن نظیر کوتاه شدن ارتفاع پرزها و عمیق شدن کریپت‌ها مشاهده گردید(Cook و همکاران، ۱۹۷۳). در این گزارش بیان شد که این عامل منجر به کاهش تعداد سلول‌های جذبی و افزایش تعداد سلول‌های ترشحی می‌گردد. علاوه بر این، در تحقیقی دیگر ضخیم شدن لایه لامیناپروپریا(دوّمین لایهٔ مخاطی پرز روده که درست در زیر بافت پوششی قرار گرفته است)، کوتاه شدن پرزها، عمیق شدن کریپت‌ها، کاهش فعالیت دی‌ساکاریدازها و بالا رفتن میزان تخریب و ساخت مجدد سلولهای موجود در دیواره روده حیوانات مرسوم در مقایسه با همتاهای جنوتوبیوتیک(حیوانی که فاقد جمعیت میکروبی یا دارای جمعیت میکروبی شناخته شده می‌باشد) گزارش شده است(Pluske و همکاران، ۱۹۹۷). این

تغییرات مورفولوژیکی با حضور سموم (Xu و همکاران، ۲۰۰۳) و شدت بیشتر تخریب و ساخت مجدد بافت در ارتباط می‌باشد(Miles و همکاران، ۲۰۰۶). گزارش شده است که آمونیاک تولید شده توسط باکتری‌های پروتئولایتیک نظیر باکتروئیدها، کلستریدیوم‌ها و انتروکوکوس‌ها تا حدی مسئول افزایش سمیت سلولی و اثرات فیزیولوژیکی جانبی آن می‌باشد(Ferket و همکاران، ۲۰۰۲). حتی مقادیر جزئی آمونیاک می‌تواند با کاهش زنده‌مانی سلول‌های مخاطی، مداخله در ساخت DNA و افزایش نرخ تخریب و ساخت مجدد سلولی، اثرات سمی شدیدی را بر سلول‌های مخاطی کولون میزبان تحمیل کند(Cummings و Macfarlane، ۱۹۹۷). علی‌رغم گزارش‌های متعدد حاکی از تاثیر مثبت فیتوبیوتیک‌ها بر مورفولوژی روده، در تحقیقی با استفاده از تغذیه اسانس گیاهی حاصل از پونه کوهی، آنیسون و پوست مرکبات (۱۰۰ mg/kg) و همین طور اکسی تتراسایکلین(۱۰۰mg/kg) در جیره جوجه‌های گوشتی، مشاهده گردید که ارتفاع پرز و عمق کریپت، دوازدهه، تهی‌روده و ایلئوم تحت تاثیر معنی‌دار تیمار قرار نگرفت(Hong و همکاران، ۲۰۱۲). علت مشاهده این تفاوت‌ها ممکن است مربوط به اختلاف از نظر ترکیبات فیتوبیوتیکی موجود در این گیاهان باشد.

## نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج حاصل از این آزمایش نشان دادند که استفاده از عصاره گیاهان آنیسون و گلپر به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره ممکن است باعث بهبود پاسخ ایمنی، کاهش جمعیت میکروبی مضر روده و بهبود خصوصیات مورفولوژیکی روده جوجه های گوشتی شود.

## منابع


Adibmoradi, M., Navidshad, B., Seifdavati, J. and Royan, M. (2006). Effect of dietary garlic meal on histological structure of small intestine in broiler chickens. *Journal of Poultry Science*. 43:378-383.

Ainsworth, E.A. and Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2:875-877.

Al-Bayati, F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 116:403-406.

Arora, R. Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N. and Sharma, R.K. (2005). Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytotherapy Research*. 19: 1-22.

Asgarpanah, J., Dadashzadeh Mehrabani, G., Ahmadi, S.M. and Safialdin-Ardebili, M. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Heracleum persicum Desf.* ex fischer: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6:1813-1820.

Ayfer-Atefi, D. and Erdogrul, Ö.T. (2003). Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turkish Journal of Biology*. 27:157-162.

Besharati-Seidani, A., Jabbari, A. and Yamini, Y. (2005). Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian *Pimpinella anisum* seed. *Analytica Chimica Acta*. 530:155-161.

Bown, D. (1995). The royal horticultural society new encyclopedia of herbs and their uses (rhs). Dunfermline: DK.

Bradley, G.L., Savage, T.F. and Timm, K.I. (1994). The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. boulardii on male poult performance and ileal morphology. *Poultry Science*. 73:1766-1770.

Cabuk, M., Bozkurt, M., Alçiçek, A., Akbaþ, Y. and Küçükyýlmaz, K. (2006). Effect of a herbal essential oil mixture on growth and internal organ weight of broilers from young and old breeder flocks. *South African Journal of Animal Science*. 36:135-141.

Cheng, S., Rotschild, M.F. and Lamont, S.J. (1991). Estimates of quantitative genetic parameters of immunological traits in the chicken. *Poultry Science*. 70:2023-2027.

Cook, R.H. and Bird, F.H. (1973). Duodenal villus area and epithelial cellular migration in conventional and germ-free chicks. *Poultry Science*. 52:2276-2280.

Kamel, C. (2006). Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 90:255-268.

Juven, B., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:626-631.

Khalaji, S., Zaghari, M., Hatami, K. H., Hedari-Dastjerdi, S., Lotfi, L. and Nazarian, H. (2011). *Black cumin* seeds, Artemisia leaves (*Artemisia sieberi*), and *Camellia L.* plant extract as phytogenic products in broiler diets and their effects on performance, blood constituents, immunity, and cecal microbial population. *Poultry Science.* 90: 2500-2510.

Kossah, R., Nsabimana, C., Zhang, H. and Chen, W. (2010). Optimization of extraction of polyphenols from Syrian sumac (*Rhus coriaria L.*) and Chinese sumac (*Rhus typhina L.*) fruits. *Research Journal of Phytochemistry*. 4:146-153.

Langhout, P. (2000). New additives for broiler chickens. *World Poultry.* 16:22-27.

Li, Y.L. (1991). Culture Medium Manual (Changchun, china, jilin science and technology Press).

Mathivanan, R. and Kalaiarasi, K. (2007). Panchagavya and andrographis panculata as alternatives to antibiotic growth promoters on hematological, serum biochemical parameters and immune status of broilers. *Poultry Science.* 44:198-204.

Mc-Manus, J.F.A. (1984). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. 23:99-108.

Miles, R.D., Butcher, G.D., Henry, P.R. and Littell, R.C. (2006). Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poultry Science.* 85:476-485.

Mountzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Paraskevas, V. and Fegeros, K. (2008). Evaluation of the effect of a phytogenic essential oil product on broiler performance and nutrient digestibility. *Brisbane Australia.*Pp. 444.

Natt, M.P. and Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science.*

Cummings, J.H. and Macfarlane, G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition.* 16:3-11.

Farag, R., Daw, Z., Hewedi, F. and El-Baroty, G. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection.* 52:665-667.

Fekri Yazdi, F., Ghalamkari G.R., Toghiani, M., Modaresi, M. and Landy, N. (2014). Anise seed (*Pimpinella anisum L.*) as an alternative to antibiotic growth promoters on performance, carcass traits and immune responses in broiler chicks. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 4:447-451.

Ferket, P., Parks, C. and Grimes, J. (2002). Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. *Multi-State Poultry Meeting.* May:14-16.

Hemati, A., Azarnia, M. and Angaji, S.A. (2010). Medicinal effects of *Heracleum persicum*(Golpar). *Middle East Journal of Scientific Research.* 5:174-176.

Heres, L., Wagenaar, J.A., Van Knapen, F. and Urlings, B.A. (2003). Passage of Salmonella through the crop and gizzard of broiler chickens fed with fermented liquid feed. *Avian Pathology*. 33:173-181.

Hong, J.C., Steiner, T., Aufy, A. and Lien, T.F. (2012). Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livestock Science.* 144:253-262.

Hosseini, S.A., Tabatabaei-Vakili, S., Mamouei, M., Sallary, S., and Zarei, M. (2016). Effect of different levels of *Heracleum Persicum* seed in diet on performance, immune system, antioxidant capacity, concentrations of estrogen and some blood parameters in broiler chickens. *Animal Sciences Journal.* 29:133-146.

Jafarzadeh, L., Sadeghi, M., Behzadian, M. and Rafieian-Kopaei, M. (2014). The Teratogenic and abortifacient effects of *Heracleum Persicum* hydroalcholic extract and its correlation with mothers' estrogen and progesterone in balb/c mice. *Journal Of Babol University Of Medical Sciences(JBUMS).* 16:26-32.

Jain, N. C. (1986). *Schalm's Veterinary Hematology.* 4th edition ed. pp. 240–255: Lea & Febiger. Philadelphia, USA.

Jamroz, D., Wertelecki, T., Houszka, M. and

Sehm, J., Lindermayer, H., Dummer, C., Treutter, D. and Pfaffl, M.W. (2006). The influence of polyphenol rich apple pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 91:289-296.

Shirzadi, H. (2015). Effects of Syrian mesquite (*Prosopis farcta*) and Sumac (*Rhuscoriaria L.*) extracts on intestinal microbial population and ascites syndrome in broiler chickens. A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph. D.) in Poultry Nutrition.*Tarbiat Modarres University.*

Shojaii, A. and Abdollahi-Fard, M. (2012). Review of pharmacological properties and chemical constituents of *Pimpinella anisum*. *International Scholarly Research Network.* 2012: 8.

Soltan, M., Shewita, R. and El-Katcha, M. (2008). Effect of dietary anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*. 7:1078-1088.

Stiles, J.C., Sparks, W. and Ronzio, R.A. (1995). The inhibition of *Candida albicans* by oregano. *Journal of Applied Nutrition.* 47:96-102.

Svensson, E., Sinervo, B. and Comendant, T. (2002). Mechanistic and experimental analysis of condition and reproduction in a polymorphic lizard. *Journal of Evolutionary Biology.* 15:1034-1047.

Trase, G. and Evance, W. (1996). *Pharmacognosy. 14th ed.*, Bailliere Tindall., London.

Wegmann, T.G. and Smithies, O. (1966). A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. *Transfusion.* 6:67-73.

Xu, Z.R., Hu, C.H., Xia, M.S., Zhan, X.A. and Wang, M.Q. (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science.* 82:1030-1036.

31:735-738.

Nayebpor, M., Farhomand, P. and Hashemi, A. (2007). Effects of different levels of direct fed microbial (*primalac*) on growth performance and humoral immune response in broiler chickens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6:1308-1313.

Nazemi, A., Hashemi, M., Khataminejad, M.R. and Pourshamsian, K. (2005). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Heracoleum persicum. *Medical Sciences.* 15:91-94.

Ouwehand, A.C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H. and Rautonen, N. (2010). *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Veterinarni Medicina.* 55:71-78.

Pluske, J.R., Hampson, D.J. and Williams, I.H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science.* 51:215-236.

Rezaei, E., Tabatabaei-Vakili, S., Mirzadeh, K., Salary, S. and Zarei, M. (2016). Effect of anise seed (*Pimpinella anisum L.*) on performance, immune system, antioxidant activity and blood estrogen level in broiler chickens. *Journal of Animal Production.* 18:151-160.

Ross 308 Broiler Performance Objectives. (2014). *Aviagen North America, Huntsville, AL.*

Sakamoto, K., Hirose, H., Onizuka, A., Hayashi, M., Futamura, N. and Kawamura, Y. (2000). Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *Journal of Surgical Research*. 94:99-106.

SAS, I. (2002). *SAS 9.1 Users Guide: Statistics.* SAS Institute Inc. Cary, NC.

Schulten, E.S., Yates, L.M. and Taylor, R.L. (2007). Antibody response against sheep red blood cells in lines congenic for major histocompatibility (B) complex recombinants. *International Journal of Poultry Science.* 6: 732-738.