نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۳۵۸-۳۵۱

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 6, No. 4, Winter 2015, p. 351-358

اثر ۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلسیتریول) و عصاره هیدروالکلی میوه پنیرباد (*Withania Coagulans*) بر عملکرد، بافت شناسی استخوان درشت نی و پارامتر های خونی در جوجه های نر گوشتی

سید جواد حسینی[1*]- حسن کرمانشاهی[2]- حسن نصیری مقدم[2]- ابولقاسم نبی پور[3]- احمد حسن آبادی[4]

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۲/۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۶/۲۶

چکیده

آزمایشی با استفاده از ۶۰۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه راس ۳۰۸ به منظور بررسی اثر ۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلسیتریول) و عصاره هیدروالکلی میوه پنیرباد بر بافت شناسی استخوان درشت نی و پارامتر های خونی انجام گرفت. جوجه ها از سن یک روزگی به ۱۲ تیمار غذایی در یک طرح فاکتوریل با ساختار ۲×۳×۲ توزیع شدند. تیمارهای غذایی شامل جیره کنترل مثبت با کلسیم در سطح توصیه شده سویه راس ۳۰۸(۱۰/۴گرم کلسیم در کیلوگرم جیره) و کنترل منفی با۳۰ درصد کلسیم کمتر از احتیاجات (۷/۳ گرم کلسیم در کیلوگرم جیره)، سه سطح عصاره پنیرباد(صفر، ۱۰۰ و۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم جیره) و دو سطح کلسیتریول (صفر و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم جیره) بود. قابلیت هضم کلسیم و فسفر با کاهش سطح کلسیم جیره بطور معنی دار افزایش یافت($P<0/01$). بر همکنش بین جیره کنترل و سطوح عصاره پنیرباد موجب افزایش قابلیت هضم کلسیم در جیره های حاوی ۲۰۰ میلی گرم عصاره پنیرباد در گروه کنترل مثبت گردید. در ۴۲ روزگی، مکمل سازی کلسیتریول موجب افزایش غلظت کلسیم سرم گردید ($P<0/01$). در ۲۱ روزگی جیره حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره پنیرباد در مقایسه با دو جیره حاوی صفر و ۲۰۰ میلی گرم عصاره بطور معنی دار موجب افزایش ضخامت قشر ناحیه دیافیز استخوان درشت نی گردید($P<0/05$). جیره حاوی کلسیتریول در گروه کنترل منفی منجر به افزایش معنی دار ضخامت ناحیه معدنی شده ی صفحه رشد استخوان درشت نی در مقایسه با جیره فاقد کلسیتریول شد($P<0/05$). در ۴۲ روزگی کلسیتریول موجب افزایش ضخامت ناحیه معدنی شده استخوان درشت نیشد ($P<0/05$). نتایج این مطالعه نشان دهنده ی اثرات مثبت عصاره هیدروالکلی میوه پنیرباد بر بافت استخوان (افزایش قشر ناحیه میانی و معدنی شدن صفحه رشد) بدون اثرات منفی بر عملکرد می باشد.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی، کلسیتریول، پنیرباد، بافت شناسی استخوان، فرآسنجه های خونی.

مقدمه

گیاه"پنیرباد" (*Withania coagulans*) از خانواده سیب زمینی (*Solanaceae*)، بوته ای و همیشه سبز است که خواص درمانی متعددی برای آن ذکر شده است (۱). اغلب خواص درمانی پنیرباد را مرتبط با گروه خاصی از لاکتون های استروئیدی به نام ویتانولیدها (*Withanolids*) می‌دانند (۴). تحقیقات بیوشیمیایی انجام شده بر روی میوه پنیرباد منجر به شناسایی ترکیبات شبه استروژنی متعددی در این گیاه دارویی شده است (۳، ۱۴ و ۱۶). ترکیبات استروژنی بعنوان یک تنظیم گر هورمونی قوی متابولیسم کلسیم، جذب این عنصر را در روده بوسیله فعالسازی آنزیم کلیوی ۲۵-هیدروکسی کوله کلسیفرول۱-آلفا هیدرواکسیلاز(۲۴)، آنزیم مسئولتبدیل ۲۵-هیدرکسی کوله کلسیفرول به ۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول (کلسیتریول) افزایش می دهند. این فرم ویتامین فعالترین شکل ویتامین D_3به شمار می رود (۸، ۱۷ و ۲۲). در بررسی اثرات شبه استروژنی ویتانولیدها، گروهی از محققین گزارش کردندکه مکمل سازی ۱۳۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره ریشه گیاه دارویی بوزیدان (*Withania Somnifera*) در جیره مرحله پایانی تولید مرغ های

۱- دانشجوی دکتری تغذیه طیورگروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد،
۳- استاد گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*-نویسنده مسئول: Email:h.seyedjavad@yahoo.com)

تخمگذار، موجب افزایش ابقاء کلسیم و فسفر در استخوان درشت نـی می گردد (۲۳). آنها مکانیسم این تغییرات را مـرتبط بـا ویتانولیـدهای شبه استروژنی دانستند کـه احتمـالاً بـا تحریـک آنـزیم کلیـوی ۲۵-هیدروکسی کوله کلسـیفرول ۱-آلفـا هیدرواکسـیلاز موجـب افـزایش تولید کلسیتریول گردیده است. بهبود معدنی شدن استخوان در جوجـه های گوشتی با کمک مکمل کلسیتریول یا سایر متابولیت های فعـال ویتامین D_3 در جیره هایی با کلسـیمناکافی و فسـفر بـالا و یـا فقـط کلسیم ناکافی گزارش شده است (۵ و ۹).

با توجه به اهمیت کلسیتریول در معدنی شـدن اسـتخوان و تـأثیر احتمالی ویتانولید ها در سوخت و ساز کلسیم و فسفر، در ایـن مطالعـه اثرات رقابتی و تجمعی کلسیتریول و عصاره هیدروالکلی میوه پنیربـاد بر هیستولوژی صفحه رشد درشت نی، درصد ابقاء کلسـیم و فسـفر و همچنین غلظت برخی متابولیت های مرتبط با ایـن عناصـر در سـرم خون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

پرندگان و تیمارهای آزمایشی

این آزمـایش در قالـب طـرح کـاملا تصـادفی بـا آرایشـفاکتوریل ۲×۳×۲ شامل دو نوع جیره پایه (جیره کنترل مثبت و کنترل منفـی)، سه سطح عصاره میوه پنیرباد (صفر، ۱۰۰ و۲۰۰ میلـی گـرم بـر کیلـو گرم جیـره) و دو سـطح کلسـیتریول (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) (صـفر و ۰/۵ میکـرو گـرم بـر کیلـو گـرم جیـره) اجـرا شـد.تعداد ۶۰۰ جوجـه خـروس یـک روزه از سـویه راس ۳۰۸ بطـور تصادفی به ۱۲ تیمار آزمایشیبا ۵ تکرار (هر تکرار ۱۰ پرنده)، اختصاص یافتند. کلسیتریول بشکل مایع با بکار گیری روغن ذرت بعنوان حامل (۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مورد استفاده قرار گرفـت. هـر دو جیـره کنترل بر پایه ذرت و کنجاله سویا و تمامی اجزاء جیره بجز کلسیم بـر اساس احتیاجات توصیه شده سـویه راس ۳۰۸ محاسـبه گردیـد (۱۹) (جدول ۱). جیره کنترل منفی با کاهش ۳۰ درصد کلسیم جیره فـراهم شد که با برداشت سنگ آهک و افزودن ماسه تهیه شد. آب و غـذا در طول ۶ هفته آزمایش بطور آزاد در اختیار تمامی پرندگان قرار گرفت.

جدول ۱-ترکیب مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی در جیره های پایه (٪)

اجزاء خوراک و مواد مغذی	دوره آغازین (۱۰-۱ روزگی)		دوره رشد (۲۴-۱۱ روزگی)		دوره پایانی (۴۲-۲۵ روزگی)	
	−	+	−	+	−	+
ذرت	۵۲	۵۲	۵۳/۲۰	۵۳/۲۰	۵۳	۵۳
کنجاله سویا (۴۸٪ پروتئین)	۳۵	۳۵	۳۷	۳۷	۳۶/۹۰	۳۶/۹۰
گلوتن ذرت	۵	۵	−	−	−	−
روغن آفتابگردان	۳/۲۷	۳/۲۷	۵/۸	۵/۸	۶/۵۶	۶/۵۶
سنگ آهک	۰/۵۳	۱/۳۱	۰/۴۰	۱/۰۷	۰/۳۷	۱/۰۳
دی کلسیم فسفات	۱/۷۵	۱/۷۵	۱/۵۵	۱/۵۵	۱/۴۰	۱/۴۰
نمک طعام	۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۴۱	۰/۴۱
دی ال _متیونین	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۰	۰/۲۰
ال_لیزین	۰/۴	۰/۴	۰/۱۳	۰/۱۳	−	−
ال_ترئونین	۰/۱	۰/۱	−	−	−	−
مکمل ویتامینی۱	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی۲	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
ماسه	۰/۷۸	−	۰/۶۷	−	۰/۶۶	−
انرژی و مواد مغذی محاسبه شده						
انرژی قابل متابولیسم (کیلو کالری/کیلوگرم)	۳۰۱۱/۴۷	۳۰۱۱/۴۷	۳۱۳۰/۹۷	۳۱۳۰/۹۷	۳۱۷۸/۷۷	۳۱۷۸/۷۷
پروتئین خام (٪)	۲۳/۵۲	۲۳/۵۲	۲۱/۱۵	۲۱/۱۵	۲۰/۹۱	۲۰/۹۱
لیزین (٪)	۱/۴۴	۱/۴۴	۱/۲۴	۱/۲۴	۱/۱۳	۱/۱۳
متیونین (٪)	۰/۷	۰/۷	۰/۶۱	۰/۶۱	۰/۵۲	۰/۵۲
کل اسیدهای آمینه گوگرد دار (٪)	۱/۰۷	۱/۰۷	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۸۶	۰/۸۶
کلسیم (٪)	۰/۷۳	۱/۰۴	۰/۶۳	۰/۹۰	۰/۵۹	۰/۸۵
فسفر غیر فیتاته (٪)	۰/۵	۰/۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۴۲
فسفر کل (٪)	۰/۷	۰/۷	۰/۶۸	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۶۵
غلظت مواد مغذی آنالیز شده						
کلسیم (٪)	۰/۷۵	۱/۰۷	۰/۶۵	۰/۹۳	۰/۶۱	۰/۸۸
فسفر کل (٪)	۰/۷۴	۰/۷۴	۰/۷۱	۰/۷۱	۰/۶۷	۰/۶۷

[۱] پیش مخلوط ویتامینی در هر کیلوگرم جیره ۱۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۸۰۰ واحد بین المللی ویتامین D، ۱۱ میلی گرم ویتامین A، ۲ میلی گرم ویتامین K_3، ۵/۷ میلی گرم ویتامین B_2، ۲ میلی گرم ویتامین B_6، ۰/۰۲۴ میلی گرم ویتامین B_{12}، ۲۸ میلی گرم نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی گرم اسید فولیک، ۱۲ میلی گرم پانتوتینیک اسید، ۲۵۰ میلی گرم کولین کلراید تامین میکرد.

[۲] پیش مخلوط معدنی در هر کیلوگرم جیره ۱۰۰ میلی گرم منگنز، ۶۵ میلی گرم روی، ۵ میلی گرم مس، ۰/۲۲ میلی گرم سلنیوم، ۰/۵ میلی گرم ید و ۰/۵ میلی گرم کبالت تامین میکرد.

عصاره گیری

میوه پنیرباد پس از خریداری از یک فروشگاه محلی در شهرستان سراوان توسط کارشناسان دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت. میوه ها پس از خشک و آسیاب شدن، در اتانول ۵۰٪ قوطه ور شدند. بعد از گذشت سه روز، مواد محلول در اتانول و آب در دو مرحله و با استفاده از پارچه صافی و سپس با کاغذ صافی و پمپ خلاء جدا و در دستگاه روتاری (Laborota 4000, Heidolph German) تغلیظ و سپس در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. عصاره خشک بصورت پودر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا شروع آزمایش نگهداری شد.

دستور العمل کلی

برای ارزیابی راندمان رشد، مصرف خوراک و اضافه وزن پرنده ها در روز ۴۲ اندازه گیری شد. به منظور سنجش قابلیت هضم خاکستر، کلسیم و فسفر خوراک، در روز ۱۵ آزمایش به جوجه ها ۱۶ساعت گرسنگی و سپس جیره حاوی ۰/۳٪ اکسید کروم داده شد. پس از ۲۴ ساعت دوره سازش پذیری، فضولات هر پن بطور مجزا و به مدت ۷۲ ساعت جمع آوری، مخلوط و در دمای ۱۰۴ درجه خشک گردید. در روزهای ۲۱ و ۴۲ آزمایش از هر پن یک پرنده با میانگین وزن پن کشتار و درشت نی پای راست برای بررسی بافت شناسی صفحه رشد جدا گردید. بافت ها و اجزاء اضافی متصل به درشت نی جدا و قطعاتی به ضخامت ۰/۵ سانتی متر از اپی فیز و ناحیه میانی دیافیز درشت نی جدا و به مدت ۱۲ ساعت در فرمالین ۱۰٪، آبگیری شد. سپس قطعات جدا شده در اسید نیتریک ۱۰٪ به مدت مورد نیاز (برای استخوان جوجه ۲۱ روزه ۴۸ و جوجه ۴۲ روزه تا ۷۲ ساعت) کلسیم گیری و در پارافین مایع قرار گرفت. پس از سرد شدن پارافین قطعاتی با ضخامت ۵ میکرومتر ازکورتکس استخوان جدا و با روش هماتوکسیلین و ائوزین (H & A) رنگ آمیزی شد. نمونه های رنگ آمیزی شده با دوربین متصلبه میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۴۰۰۰ برابر عکسبرداری و ضخامت نواحی مختلف صفحه رشد و کورتکس ناحیه میانی دیافیز اندازه گیری شد. سنجش غلظت متابولیت ها و تعیین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز خون با خونگیری از ورید زیر بال انجام شد. سرم ها با سانتریفیوژ نمونه های خون (۱۵۰۰× g) به مدت ۱۵ دقیقه، جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان تجزیه در آزمایشگاه ذخیره گردید.

تجزیه شیمیایی

غلظت کلسیم، فسفر غیرآلی و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه های سرم با دستگاه آنالیزور شیمیایی خون (Random Access Analyser A15, Biosystem Corp, Spain) اندازه گیری شد. مقدار کلسیم در نمونه های خوراک و مدفوع با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Varian SpectrAA 50B Atomic Absorption Spectrometer: Varian Ltd, USA) (۲) و مقدار فسفر کل در نمونه های ذکر شده با رنگ سنجی به روش مولیبدووانادات تعیین شد. غلظت اکسید کروم در نمونه های خوراک و مدفوع با دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی داده های جمع آوری شدبا استفاده از دستور العمل GLMدر نرم افزارSAS (۲۰) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. اختلاف معنی دار بین میانگین ها با استفاده از آزمون مقایسه‌ی دانکن و با سطح احتمال P<۰/۰۵ تعیین گردید.

نتایج و بحث

عملکرد و قابلیت هضم

تأثیر سطوح کلسیم، مکمل سازی عصاره پنیرباد و کلسیتریول بر عملکرد و قابلیت هضم کلسیم، فسفر و خاکستر در جدول ۲ نشان داده شده است. عملکردو قابلیت هضم خاکستر تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. کاهش کلسیم خوراک موجب افزایش قابلیت هضم کلسیم و فسفر گردید (P<۰/۰۰۱). افزایش جذب کلسیم در پرندگان تغذیه شده با جیره هایی با کلسیم ناکافی در مقایسه با جیره حاوی کلسیم کافی در مطالعات قبلی مشخص شده است (۱۲و ۱۵). همچنین تأثیر سطوح کلسیم جیره بر قابلیت دسترسی فسفر فیتاته در جیره هایی بر پایه ذرت و کنجاله سویا و بهبود در ابقاء فسفر فیتاته با کاهش سطح کلسیم جیره در مرغ های تخمگذار گزارش شده است (۲۱ و ۲۶). برهمکنش بین سطوح کلسیم و پنیرباد در مصرف خوراک، اضافه وزن و ضریب تبدیل غذاییمشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین مصرف خوراک تحت تأثیر برهمکنش سه عاملی سطوح کلسیم، عصاره پنیرباد و کلسیتریول قرار گرفت (P<۰/۰۵). در حالیکه افزودن ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم عصاره پنیرباد در جیره کنترل مثبت منجر به کاهش مصرف خوراک شد، این کاهش مصرف خوراک با اضافه شدن ۰/۵ میکروگرم کلسیتریول مشاهده نشد. مصرف خوراک در پرندگان تغذیه شده با جیره کنترل منفی در سطوح ثابت ۰/۵ میکروگرم کلسیتریول و بدون عصاره پنیرباد، نسبت به گروه تغذیه شده با جیره کنترل مثبت کاهش یافت (P<۰/۰۵). بیشترین مصرف خوراک در پرندگان تغذیه شده با جیره های کنترل مثبت و دارای ۰/۵ میکرو گرم کلسیتریول و فاقد عصاره پنیرباد مشاهده شد. اضافه وزن در پرندگان تغذیه شده با جیره های کنترل منفی و فاقد عصاره پنیرباد در مقایسه با گروه تغذیه شده با جیره های کنترل مثبت و فاقد عصاره

پنیرباد بطور معنی داری کاهش یافت (۲۵۱۱/۱۸ در مقابل۲۲۱۵/۴۶). در سطح ثابت عصاره پنیرباد (۲۰۰ میلی گرم) پرندگان تغذیه شده با جیره کنترل منفی ضریب تبدیل غذایی بهتری نسبت به گروه کنترل مثبت داشتند (۱/۶۱ در مقابل ۱/۷۳). برهمکنش سه عامله موجب افزایش مصرف خوراک در پرندگان تغذیه شده با ۲۰۰ میلی گرم عصاره پنیرباد و ۰/۵ میکروگرم کلسیتریول در گروه کنترل مثبت گردید. در گروه کنترل مثبت، برهمکنش بین کنترل و عصاره پنیرباد موجب افزایش قابلیت هضم کلسیم با مکمل سازی ۲۰۰ میلی گرم عصاره پنیرباد گردید(P<۰/۰۱).

بافت شناسی استخوان

جیره حاوی ۱۰۰ میلی گرم عصاره پنیرباد در مقایسه با دو جیره حاوی صفر و ۲۰۰ میلی گرم عصاره بطور معنی‌داری موجب افزایش ضخامت قشر ناحیه میانی استخوان درشت نی در ۲۱ روزگی گردید (P<۰/۰۵). در ۲۱ روزگی برهمکنش دو عامله بین کلسیتریول با پنیرباد منجر به بیشترین افزایش ضخامت ناحیه معدنی شده‌ی صفحه رشد در پرندگان دریافت کننده ۱۰۰ میلی گرم عصاره گردید (P<۰/۰۱). در ۴۲ روزگی کلسیتریول (P<۰/۰۵) و عصاره پنیرباد (P=۰/۰۶۵) موجب افزایش ضخامت ناحیه معدنی شده در صفحه رشد شدند.

جدول ۲-اثر پنیرباد،۱ و ۲۵ دی هیدرواکسی کوله کلسیفرول و دو نوع جیره کنترل بر افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک جوجه های گوشتی در سن ۴۲ روزگی و ابقای مواد معدنی در سن ۱۹ تا ۲۱ روزگی.

تیمار						قابلیت هضم (درصد)		
کنترل	پنیرباد (میلی گرم)	کلسیتریول (میکروگرم)	مصرف خوراک (گرم)	اضافه وزن (گرم)	ضریب تبدیل خوراک (گرم بر گرم)	خاکستر	کلسیم	فسفر
-	صفر	صفر	۳۹۰۵/۱۵ abcd	۲۲۲۵/۲۰ c	۱/۷۵ a	۶۲/۳۶	۸۲/۸۷ ab	۷۵/۸۲
-	صفر	۰/۵	۳۷۸۷/۱۷ cd	۲۲۱۵/۴۶ c	۱/۷۱ ab	۶۲/۸۳	۸۲/۲۱ ab	۷۶/۷۶
-	۱۰۰	صفر	۴۰۱۹/۵۵ abc	۲۳۵۷/۶۴ abc	۱/۷۰ ab	۶۴/۴۰	۸۲/۶۴ ab	۷۸/۱۶
-	۱۰۰	۰/۵	۳۸۱۲/۱۴ bcd	۲۲۹۱/۶۹ bc	۱/۶۶ ab	۵۷/۹۰	۸۴/۶۷ a	۷۶/۱۷
-	۲۰۰	صفر	۳۸۲۸/۳۰ bcd	۲۲۸۴/۹۴ bc	۱/۶۷ ab	۶۲/۴۶	۸۱/۳۹ ab	۷۶/۸۷
-	۲۰۰	۰/۵	۳۹۲۳/۲۸ abcd	۲۴۲۸/۶۰ ab	۱/۶۱ b	۶۳/۰۳	۸۲/۳۰ ab	۷۷/۶۵
+	صفر	صفر	۴۰۱۲/۸۰ abc	۲۴۰۷/۳۹ abc	۱/۶۶ ab	۵۹/۰۵	۷۰/۰۰ c	۷۱/۹۳
+	صفر	۰/۵	۴۱۶۸/۲۸ a	۲۵۱۱/۱۸ a	۱/۶۶ ab	۶۱/۵۷	۶۸/۵۶ c	۷۳/۷۱
+	۱۰۰	صفر	۳۸۲۰/۷۳ bcd	۲۲۴۰/۹۶ bc	۱/۷۰ ab	۶۶/۳۹	۷۱/۳۳ c	۷۴/۶۹
+	۱۰۰	۰/۵	۳۸۹۴/۳۰ bcd	۲۲۶۸/۹۴ bc	۱/۷۲ ab	۶۶/۶۹	۷۱/۰۳ c	۷۴/۷۹
+	۲۰۰	صفر	۳۶۹۹/۹۶ d	۲۲۳۷/۵۲ bc	۱/۶۵ ab	۶۳/۴۶	۷۵/۵۲ bc	۷۴/۹۷
+	۲۰۰	۰/۵	۴۰۷۲/۶۶ ab	۲۳۴۸/۲۶ abc	۱/۷۳ a	۶۵/۷۷	۸۱/۶۳ ab	۷۳/۶۶
خطای استاندارد			۸۲/۳۶۰	۶۰/۷۱۳	۰/۰۳۳	۰/۰۷۷	۲/۳۱۰	۱/۷۲۶
کنترل	-		۳۸۷۹/۲۷	۲۳۰۰/۵۹	۱/۶۸	۶۲/۰۳	۸۲/۷۰ a	۷۶/۸۸ a
	+		۳۹۴۴/۷۹	۲۳۳۵/۷۱	۱/۶۹	۶۳/۷۴	۷۲/۹۳ b	۷۳/۹۲ b
پنیرباد	صفر		۳۹۶۸/۳۵	۲۳۳۹/۸۱	۱/۷۰	۶۱/۴۱	۷۵/۹۱	۷۵/۹۱
	۱۰۰		۳۸۸۶/۶۸	۲۲۸۹/۸۱	۱/۶۹	۶۳/۶۷	۷۷/۴۲	۷۵/۹۵
	۲۰۰		۳۸۸۱/۰۵	۲۳۲۴/۸۳	۱/۶۷	۶۳/۸۰	۸۰/۳۵	۷۵/۷۳
کلسیتریول	صفر		۳۸۸۱/۰۹	۲۲۹۲/۲۸	۱/۶۹	۶۲/۸۶	۷۷/۳۵	۷۵/۴۲
	۰/۵		۳۹۴۲/۹۷	۲۳۴۴/۰۲	۱/۶۸	۶۲/۹۶	۷۸/۲۷	۷۵/۳۸
					P-value			
کنترل			۰/۱۷۴	۰/۳۲۱	۰/۸۸۳	۰/۲۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
پنیرباد			۰/۲۵۴	۰/۴۹۴	۰/۳۶۹	۰/۲۳۲	۰/۱۳۵	۰/۵۹۴
کلسیتریول			۰/۱۹۹	۰/۱۴۶	۰/۶۲۵	۰/۹۶۴	۰/۶۲۰	۰/۹۸۰
کنترل × پنیرباد			۰/۰۳۱	۰/۰۰۱	۰/۰۴۱	۰/۰۵۳	۰/۰۰۷	۰/۶۸۳
کنترل × کلسیتریول			۰/۰۰۵	۰/۴۱۰	۰/۰۴۴	۰/۱۷۲	۰/۶۸۴	۰/۶۱۶
پنیرباد × کلسیتریول			۰/۰۳۶	۰/۲۴۳	۰/۷۳۸	۰/۲۴۹	۰/۲۴۹	۰/۸۰۷
کنترل × پنیرباد × کلسیتریول			۰/۹۹۹	۰/۶۵۳	۰/۵۱۶	۰/۶۶۴	۰/۶۶۴	۰/۵۸۱

میانگین های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<۰/۰۵).

جدول ۳–اثر پنیرباد، کلسیتریول و دو نوع جیره کنترل بر ضخامت نواحی مختلف صفحه رشد و قشر دیافیز استخوان درشت نی (میکرومتر) جوجه های گوشتی در روزهای ۲۱ و ۴۲.

تیمار			۲۱ روزگی				۴۲ روزگی			
کنترل	پنیرباد (میلی گرم)	کلسیتریول (میکروگرم)	ناحیه تکثیر	ناحیه هایپرتروفی	ناحیه معدنی شده	قشر دیافیز	ناحیه تکثیر	ناحیه هایپرتروفی	ناحیه معدنی شده	قشر دیافیز
-	صفر	صفر	۸۰۶/۶۰	۳۰۶/۷۶	۱۷۸۲/۳۲ ^{c}	۱۲۶۰/ ۲۱ ^{ab}	۹۸۶/۶۸	۲۶۶/۸۲	۱۹۱۹/۹۶^{abc}	۱۶۲۵/۴۴^{ab}
-	صفر	۰/۵	۷۴۳/۶۹	۳۰۷/۸۹	۲۰۹۲/۹۸ ^{abc}	۱۲۶۹/۵۲ ^{ab}	۱۰۵۶/۴۲	۲۶۶/۹۶	۲۳۲۲/۱۰^{a}	۱۴۲۵/۷۸ ^{b}
-	۱۰۰	صفر	۸۹۳/۹۱	۳۲۲/۸۴	۲۴۴۸/۱۴ ^{a}	۱۵۷۰/۸۲ ^{a}	۱۰۱۱/۷۲	۲۷۶/۹۴	۱۷۶۲/۸۴^{bc}	۱۷۰۳/۴۱^{ab}
-	۱۰۰	۰/۵	۷۵۳/۰۷	۲۹۹/۹۴	۱۹۵۲/۳۰ ^{abc}	۱۴۰۱/۴۱ ^{ab}	۹۴۷/۹۲	۲۸۹/۳۶	۲۰۳۲/۱۲^{ab}	۱۶۵۷/۲۶ ^{ab}
-	۲۰۰	صفر	۷۲۵/۲۶	۲۷۹/۳۱	۱۸۸۰/۵۶ ^{bc}	۱۳۲۳/۵۸ ^{ab}	۱۰۰۷/۰۲	۲۵۷/۸۴	۱۵۹۵/۶۰^{c}	۱۵۱۵/۵۲ ^{ab}
-	۲۰۰	۰/۵	۷۴۰/۹۷	۳۲۰/۸۷	۲۰۹۴/۳۳ ^{abc}	۱۱۹۰/۶۷ ^{b}	۸۹۱/۲۱	۲۶۱/۹۸	۱۹۶۳/۸۸^{abc}	۱۶۳۲/۰۶ ^{ab}
+	صفر	صفر	۷۹۹/۹۷	۳۴۴/۹۱	۲۰۳۱/۴۹ ^{abc}	۱۳۲۹/۹۵ ^{ab}	۹۴۸/۲۶	۲۹۵/۴۶	۱۹۳۵/۷۸^{abc}	۱۶۳۴/۳۶ ^{ab}
+	صفر	۰/۵	۷۷۵/۵۰	۲۵۵/۲۱	۲۲۲۶/۶۰ ^{abc}	۱۴۳۳/۶۹ ^{ab}	۹۱۱/۳۴	۲۶۴/۷۲	۱۹۳۴/۵۴^{abc}	۱۵۶۰/۰۷ ^{ab}
+	۱۰۰	صفر	۷۶۰/۶۸	۳۲۷/۴۰	۲۳۱۱/۸۶ ^{ab}	۱۳۶۹/۴۳ ^{ab}	۸۷۱/۷۰	۲۸۵/۶۱	۱۸۹۷/۵۲^{abc}	۱۶۴۸/۶۹ ^{ab}
+	۱۰۰	۰/۵	۷۲۱/۳۱	۲۷۳/۰۱	۱۷۶۸/۸۰ ^{c}	۱۵۷۷/۶۵ ^{a}	۹۱۱/۲۵	۲۲۴/۳۴	۱۷۴۸/۱۰^{bc}	۱۷۸۲/۰۳ ^{a}
+	۲۰۰	صفر	۷۲۴/۶۴	۲۵۹/۳۹	۲۰۹۰/۵۱ ^{abc}	۱۲۶۸/۷۵ ^{ab}	۹۲۴/۴۴	۲۳۵/۴۲	۱۹۵۹/۰۴^{abc}	۱۴۳۱/۳۸ ^{b}
+	۲۰۰	۰/۵	۸۲۸/۹۰	۲۷۸/۹۶	۱۹۲۷/۸۹ ^{bc}	۱۳۸۰/۳۰ ^{ab}	۹۱۰/۵۶	۲۶۲/۲۴	۱۹۶۹/۴۶^{abc}	۱۷۵۲/ ۷۰^{a}
خطای استاندارد			۴۷/۸۵۱	۳۱/۶۵۹	۱۴۵/۲۸۲	۱۰۶/۰۳۳	۶۱/۲۶۶	۲۱/۹۸۷	۱۲۸/۵۲۶	۸۴/۵۰۸
کنترل	-		۷۷۴/۹۴	۳۰۷/۲۰	۲۰۴۲/۷۷	۱۳۳۶/۰۴	۹۸۳/۴۸	۲۶۹/۹۸	۱۹۳۲/۷۴	۱۵۹۱/۰۴
	+		۷۶۹/۷۱	۲۸۷/۶۵	۲۰۵۱/۶۰	۱۴۰۱/۱۴	۹۱۲/۹۸	۲۶۱/۲۲	۱۹۰۷/۴۱	۱۶۳۴/۸۷
پنیرباد	صفر		۷۸۰/۴۷	۳۰۳/۶۵	۲۰۳۴/۸۴	۱۳۲۲/۹۹ ^{b}	۹۷۵/۶۸	۲۷۳/۴۹	۲۰۲۸/۱۰	۱۵۶۱/۴۱
	۱۰۰		۷۸۱/۷۷	۳۰۵/۶۹	۲۱۱۸/۴۱	۱۴۸۵/۶۴ ^{a}	۹۳۶/۹۳	۲۶۸/۹۵	۱۸۶۰/۱۵	۱۶۹۹/۹۸
	۲۰۰		۷۵۶/۵۱	۲۸۴/۹۱	۱۹۹۸/۳۲	۱۲۹۱/۹۹ ^{b}	۹۳۳/۲۹	۲۵۴/۳۷	۱۸۷۱/۹۹	۱۵۸۲/۹۲
کلسیتریول	صفر		۷۸۴/۵۹	۳۰۶/۲۶	۲۰۷۶/۱۰	۱۳۵۷/۲۴	۹۵۸/۳۰	۲۶۹/۶۱	۱۸۴۵/۱۲ ^{b}	۱۵۹۳/۱۳
	۰/۵		۷۶۱/۹۳	۲۸۹/۸۸	۲۰۱۸/۸۲	۱۳۷۵/۵۴	۹۳۹/۰۳	۲۶۱/۶۰	۱۹۹۵/۰۳ ^{a}	۱۶۳۴/۲۲
			P-value							
کنترل			۰/۷۶۸	۰/۰۶۴	۰/۸۴۸	۰/۲۵۵	۰/۰۵۴	۰/۴۹۳	۰/۷۳۴	۰/۴۰۲
پنیرباد			۰/۶۸۴	۰/۳۷۳	۰/۵۲۵	۰/۰۴۳	۰/۵۵۳	۰/۴۴۴	۰/۱۳۰	۰/۰۶۵
کلسیتریول			۰/۴۰۸	۰/۴۶۲	۰/۳۵۵	۰/۵۱۹	۰/۵۷۴	۰/۵۳۱	۰/۰۴۹	۰/۴۰۰
کنترل × پنیرباد			۰/۲۲۱	۰/۷۷۸	۰/۲۸۵	۰/۴۸۱	۰/۷۴۰	۰/۴۱۲	۰/۱۲۳	۰/۹۰۱
کنترل × کلسیتریول			۰/۲۰۳	۰/۴۷۲	۰/۳۱۲	۰/۰۳۰	۰/۶۴۷	۰/۲۹۰	۰/۰۱۰	۰/۰۹۱
پنیرباد × کلسیتریول			۰/۱۱۶	۰/۰۹۹	۰/۰۰۳	۰/۷۰۷	۰/۶۳۸	۰/۴۱۴	۰/۶۹۳	۰/۰۱۷
کنترل × پنیرباد × کلسیتریول			۰/۸۹۸	۰/۹۳۷	۰/۷۱۲	۰/۸۳۲	۰/۳۸۹	۰/۳۱۱	۰/۹۸۵	۰/۹۴۴

میانگین های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<۰/۰۵).

در مطالعات آزمایشگاهی (In vitro) اثرات تنظیمی کلسیتریول بر فعالیت پروتئین هایی به نام *c-myc* مشاهده شده است (۱۱). این پروتئین ها با افزایش مرگ سلولی (۷ و۱۰) که پیش نیازیست برای توسعه ی رگهای خونی صفحه رشد، موجب افزایش معدنی شدن این ناحیه می گردند.

بنابراین احتمال دارد کلسیتریول با افزایش پروتئین های *c-myc* در صفحه رشد و افزایش مرگ سلولی موجب توسعه رگهای خونی در صفحه رشد شده و توسعه رگهای خونی در صفحه رشد ابقاء مواد معدنی را در این ناحیه افزایش داده و در نتیجه موجب افزایش ضخامت ناحیه معدنی شده صفحه رشد گردیده است.

فرآسنجه های خونی

غلظت کلسیم، فسفر و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در جدول ۴ آورده شده است. در ۲۱ روزگی غلظت فسفر در پاسخ به کاهش کلسیم در جیره کنترل منفی کاهش یافت. در حالیکه نتایج در ۴۲ روزگی کاملاً معکوس بود. همچنین در ۴۲ روزگی غلظت کلسیم سرم در پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی کلسیتریول بطور معنی داری(P<۰/۰۱) افزایش یافت (۱۰/۲۸ در مقابل ۸/۶۵ میلی گرم بر دسی لیتر). افزایش خطی غلظت کلسیم خون با مکمل سازی سطوح بالاتر از ۵ میکروگرم کلسیتریول در کیلوگرم جیره توسط میکائیل و همکاران گزارش شده است (۱۳). همچنین نتایج برخی مطالعات حاکی از عدم ۵ و ۱۰ میکروگرم کلسیتریول در هر کیلوگرم جیره بر

غلظت کلسیم سرم جوجه های گوشتی می باشد(۶ ، ۱۳ و۱۸). به هرحال مشخص شده که کلسیتریول موجب افزایش جذب روده ای کلسیم و فسفر می گردد (۲۵). در این مطالعه با بررسی نتایج آزمایشات قابلیت هضم، ارتباطی بین مکمل سازی کلسیتریول و جذب کلسیم جیره مشاهده نشد. تأثیراستفاده ازپنیرباد بر غلظت کلسیم سرم نزدیک به معنی داری بود (P=۰/۰۵۳). در ۲۱ روزگی، بر همکنش دو عامله بین کلسیتریول با کنترل و کلسیتریول با پنیرباد بترتیب بر غلظت کلسیم و فسفر سرم مشاهده شد(P<۰/۰۵). در سطح صفر کلسیتریول، کلسیم سرم در پرندگان تغذیه شده با کنترل منفی در مقایسه با کنترل مثبت کاهش یافت. همچنین در سطح ۰/۵ میکروگرم کلسیتریول، بیشترین غلظت فسفر در سرم پرندگان تغذیه شده با ۲۰۰ میلی گرمپنیرباد در مقایسه با گروه تغذیه شده با جیره فاقد پنیرباد مشاهده شد (۷/۰۴ در مقابل ۴/۸۶).

نتیجه گیری و پیشنهادات

نتایج این مطالعه با تأیید نتایج دیگر محققین مبنی بر اهمیت کلسیتریول در معدنی شدن صفحه رشد استخوانشان دهندهی اثرات مفید عصاره میوه پنیرباد بر تغییرات هیستولوژیکی استخوان از جمله معدنی شدن ناحیه رشد می باشد. این مطالعه آزمایشات بیشتر و دقیقتر در مورد ترکیبات مؤثره میوه گیاه پنیرباد و مکانیزم های عمل این عصاره گیاهی بر متابولیسم کلسیم و فسفر و استخوان سازی راپیشنهاد می کند.

جدول ٤-اثر پنیرباد، کلسیتریول و دو نوع جیره کنترل بر فرآسنجه های خونی جوجه های گوشتی در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی.

تیمار			۲۱ روزگی			٤۲ روزگی		
کنترل	پنیرباد (میلی گرم)	کلسیتریول (میکروگرم)	کلسیم (دسی لیتر/ میلی گرم)	فسفر (دسی لیتر/ میلی گرم)	آلکالین فسفاتاز (لیتر/ واحد)	کلسیم (دسی لیتر/ میلی گرم)	فسفر (دسی لیتر/میلی گرم)	آلکالین فسفاتاز (لیتر/واحد)
-	صفر	صفر	۸/۹۴ ab	۶/۶۰ a	۹۷۷۲/۶۶	۸/۸۳	۶/۶۰	۳۰۴۷/۰۰
-	صفر	۰/۵	۹/۱۲ ab	۵/۱۸ ab	۹۹۰۱/۰۰	۹/۲۳	۵/۱۷	۲۵۲۲/۲۰
-	۱۰۰	صفر	۸/۷۹ ab	۶/۲۱ ab	۱۳۷۲۶/۵۰	۸/۱۹	۶/۸۱	۲۴۷۶/۷۵
-	۱۰۰	۰/۵	۹/۶۱ ab	۵/۹۴ ab	۱۳۷۲۶/۰۰	۹/۹۶	۶/۲۶	۲۹۲۹/۲۰
-	۲۰۰	صفر	۸/۱۹ b	۵/۶۰ ab	۱۲۰۳۷/۲۵	۹/۵۶	۵/۳۲	۲۲۶۰/۳۳
-	۲۰۰	۰/۵	۹/۸۹ ab	۷/۰۴ a	۱۰۱۹۹/۷۵	۱۰/۳۳	۶/۵۹	۲۰۴۵/۸۰
+	صفر	صفر	۹/۷۴ ab	۵/۹۵ ab	۸۶۲۷/۳۳	۹/۲۸	۷/۹۱	۲۶۸۶/۰۰
+	صفر	۰/۵	۹/۲۴ ab	۴/۸۶ b	۹۲۴۴/۰۰	۱۰/۰۶	۶/۵۶	۲۶۵۱/۲۵
+	۱۰۰	صفر	۹/۸۳ ab	۵/۰۴ ab	۸۶۲۴/۴۰	۹/۲۱	۸/۰۶	۲۷۰۶/۳۳
+	۱۰۰	۰/۵	۹/۹۵ ab	۵/۳۸ ab	۸۳۳۵/۴۰	۹/۶۹	۸/۳۹	۲۳۶۶/۰۰
+	۲۰۰	صفر	۱۰/۲۲ a	۵/۴۲ ab	۱۲۰۷۵/۲۵	۶/۸۳	۶/۵۱	۲۴۳۴/۵۰
+	۲۰۰	۰/۵	۸/۶۱ ab	۵/۶۵ ab	۱۰۷۰۳/۵۰	۱۲/۱۹	۶/۹۰	۲۳۹۱/۰۰
خطای استاندارد			۰/۶۵۱	۰/۶۳۸	۱۷۱۳/۵۳۳	۰/۸۵۹	۰/۸۲	۲۴۶/۳۳
کنترل	-		۹/۰۶	۶/۰۷ a	۱۱۵۷۵/۹۰	۹/۳۵	۶/۱۵ b	۲۵۱۱/۱۶
	+		۹/۶۰	۵/۴۰ b	۹۵۶۳/۶۶	۹/۵۳	۷/۳۶ a	۲۵۷۶/۴۷
پنیرباد	صفر		۹/۲۶	۵/۶۹	۹۳۸۶/۲۵	۹/۳۵	۶/۵۶	۲۶۷۱/۲۵
	۱۰۰		۹/۵۴	۵/۶۲	۱۰۵۸۲/۵۲	۹/۲۲	۷/۲۹	۲۶۹۷/۲۳
	۲۰۰		۹/۱۹	۵/۸۷	۱۱۲۵۳/۹۳	۹/۷۳	۶/۳۸	۲۲۴۷/۹۲
کلسیتریول	صفر		۹/۲۸	۵/۸۰	۱۰۸۱۲/۹۵	۸/۶۵ b	۶/۸۹	۲۵۸۹/۴۷
	۰/۵		۹/۳۹	۵/۶۴	۱۰۱۷۷/۴۰	۱۰/۲۸ a	۶/۵۸	۲۵۰۰/۸۷
				P-value				
کنترل			۰/۱۸۸	۰/۰۲۴	۰/۰۷۴	۰/۷۰۸	۰/۰۲۵	۰/۹۶۷
پنیرباد			۰/۷۵۶	۰/۴۱۶	۰/۳۲۲	۰/۷۳۰	۰/۰۵۳	۰/۱۲۲
کلسیتریول			۰/۷۵۴	۰/۷۷۸	۰/۶۹۰	۰/۰۰۳	۰/۶۲۲	۰/۵۳۷
کنترل × پنیرباد			۰/۹۲۴	۰/۹۳۵	۰/۰۸۰	۰/۶۶۰	۰/۳۲۸	۰/۵۹۵
کنترل × کلسیتریول			۰/۰۴۵	۰/۸۱۶	۰/۹۴۶	۰/۲۳۴	۰/۳۶۴	۰/۹۰۸
پنیرباد × کلسیتریول			۰/۷۸۵	۰/۰۴۳	۰/۷۱۱	۰/۱۱۳	۰/۱۰۷	۰/۷۷۶
کنترل × پنیرباد × کلسیتریول			۰/۲۸۶	۰/۶۶۰	۰/۹۷۲	۰/۰۶۲	۰/۴۱۴	۰/۳۹۶

میانگین های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<۰/۰۵).

منابع

1- Abouzid, S. F., A. A. El-Basuony., A. Nasib., S. Khan.,J. Qureshi., and M. I. Choudhary. 2010. Withaferin A production by root cultures of Withania coagulans. IRNP. 3: 23-27.
2- AOAC International. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. (Gaithersburg, MD, AOAC Int.).
3- Budhiraja, R. D., S. Sudhir., and K. N. Garg. 1983. Cardiovascular effects of a withanolide from Withania coagulans. Indian J Physiol Pharmacol. 27(2):129–134.
4- Dewir, Y. H., D.Chakrabarty., S. H. Lee., E. J. Hahn., and K. Y. Paek. 2010. Indirect regeneration of Withania somnifera and comparative analysis of withanolides in in vitro and greenhouse grown plants. J. Plant. Biol. 54:357-360.
5- Edwards, H. M. 1989. The effect of dietary cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol and 1, 25-dihydroxycholecalciferol on the development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens in the absence and presence of disulfiram. J. Nutr. 119: 647-652.
6- Edwards, H. M. 1993. Dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases h ate phosphorus utilization in chickens. J. Nutr. 123:567-577.
7- Farquharson, C.,andD.Jefferies. 2000. Chondrocytes and longitudinal bone growth: The development of tibial dyschondroplasia. Poult. Sci.79:994–1004.
8- Kenney, A. D. 1976. Vitamin D metabolism: Physiological regulation in egg-laying Japanese quail. Am. J. Physiol. 230: 1606– 1616.
9- Ledwaba., M. F., and K. D. Roberson.2003. Effectiveness of twenty-five-hydroxycholecalciferol in the prevention of tibial dyschondroplasia in ross cockerels depends on dietary calcium level. Poult. Sci. 82:1769–1777.
10- Loveridge, N., C. Farquharson., J. E. Hesketh., S. B. Jakowlew., C. C. Whitehead., andB. H.Thorp.1993. The control of chondrocyte differentiation during endochondral bone growth invivo: changes in TGF-β and the proto-oncogene c-myc. J. Cell Sci. 105:949–956.
11- Minghetti, P. P.,and Norman, A. W. 1988. 1, 25-(OH) $_2$-vitamin D3 receptors: Gene regulation and genetic circuitry. FASEB J. 2:3043–3053.
12- Mitchell, R. D., and H. M. Edwards.1996. Additive effects of 1, 25-Dihydroxycholecalciferol and phytase on phytate phosphorus utilization and related parameters in broiler chickens. Poult. Sci. 75: 111-119.
13- Mitchell, R. D., H. M.Edwards., G. R. Mcdaniel.,and G. N.Rowland.1997. Dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol has variable effects on the incidences of leg abnormalities, plasma vitamin D metabolites, and vitamin D receptors in chickens divergently selected for tibial dyschondroplasia. Poult. Sci. 76: 338–345.
14- Nagareddy, P. R., and M.Lakshmana. 2006. Withania somnifera improves bone calcification in calciumdeficient ovarectomized rats. Pharm Pharmacol. 58: 1–7.
15- Plumstead, P. W., A. B. Leytem., R. O. Maguire., J. W. Spears., P. Kwanyuen., and J. Brake.2008. Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. Poult. Sci. 87: 449-458.
16- Prasad, S. K., R. Kumar., D. K. Patel., and S. Hemalatha.2010. Wound healing activity of Withania coagulans in streptozoto-cin-induced diabetic rats. Pharmaceutical Biol. 48:1397-1404.
17- Reddy, G. S., and K. Y.Tserng.1989. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 through C-24 oxidation pathway. Biochem.28: 1763–1769.
18- Roberson, K. D.,and H. M. Edwards.1994. Effects of ascorbic acid and 1,25-dihydroxycholecalciferol on alkaline phosphatase and tibial dyschondroplasia in broiler chickens. Br. Poult. Sci. 35:763–773.
19- Ross. 2007. Ross 308 Broiler: Nutrition Specification. Aviagen, Scotland, UK. Accessed May 25. 2009. http://www. aviagen. com/.
20- SAS (2003) SAS 9.1, (Cary, NC, SAS Institute Inc).
21- Scheideler, S. E., and J. L.Sell.1987. Utilization of phytate phosphorus in laying hens as influenced by dietary phosphorus and calcium. Nutr. Rep. Int. 35:1073–1081.
22- Soares, J. H. 1984. Calcium metabolism and its control-Areview. Poult. Sci. 63: 2075–2083.
23- Tahmasbi, A. M., M. T. Mirakzehi., S. J. Hosseini., M. J. Agah., and.M. Kazemi Fard. 2012. The effects of phytase and root hydroalcoholic extract of Withania somnifera on productive performance and bone mineralisation of laying hens in the late phase of production. Br. Poult. Sci. 53: 204-214.
24- Tanaka, Y., L. Castillo., M. J. Wineland., and H. F. DeLuca. 1978. Synergistic effect of progesterone, testosterone and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitaminD3 -1-hydroxylase. Endocrinol. 103: 2035–2039.43
25- Tanaka, Y., H. Frank., and H. F.Deluca. 1973. Biological activity of 1, 25-dihyroxyvitamin D3 in the rat.

Endocrinol. 92: 417-422.
26- Van Der Klis, J. D., H. A. J. Versteegh., and C. W.Scheele.1994. Pages 113–119 in: Proceedings of the Carolina Poultry Nutr. Conference, Charlotte, NC.
27- Williams, C. H., D. J. David.,and O. Iismaa. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. J. Agric. Sci. 59: 381–385.