

نشریه علمی-پژوهشی پژوهشهای علوم دامی ایران



جلد ۱۰ شماره ۲
سال ۱۳۹۷



Vol. 10 No. 2
2018

Iranian Journal of Animal Science Research

ISSN:2008-3106

۳۱۰۶-۲۰۰۸:شاپا

(شماره پیاپی: ۳۴)

عنوان مقالات

تغذیه نشخوارکنندگان

- تعیین ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی فرآوری‌شده با سطوح مختلف تقاله خشک
چغندرقد به روش کیه‌های نایلونی و تولید گاز ۱۵۳
عباسعلی ناصریان- رضا خداوردی - رضا ولی زاده- عبدالمنصور طهماسبی
- بررسی تاثیر pH و اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی ۱۶۳
سیدعلیرضا وکیلی- سارا ساکی- محسن دانش مسگران- فرشته علی‌پور
- اثر افزودنی‌های باکتریایی و پری‌بیوتیکی بر ترکیب شیمیایی، تولید گاز و پایداری هوازی سیلاژ ذرت ۱۷۹
سیما علایی باهر- حمید محمدزاده- اکبر تقی زاده- علی حسین خانی
- تعیین ارزش تغذیه‌ای هفت گونه از علف‌های هرز مؤثر با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی ۱۹۵
ملیحه داداشی- علی حسین خانی- حمید محمدزاده

تغذیه طیور

- اثرات اسید چرب لینولئیک کوژوگه (CLA) در جیره مرغان تخم‌گذار بر عملکرد تولید و صفات کیفی
تخم‌مرغ در دما و زمان‌های مختلف نگهداری آن ۲۰۹
سیدعلی میرقلنج- لیا فتح الله زاده- روح الله کیانفر- مجید علیایی
- ارزیابی صفات عملکردی، کیفی و کسترول تخم‌مرغ، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و تعادل آنژی‌اکسیدانی مرغ‌های
تخم‌گذار تغذیه شده با تقاله هسته اثار و مولتی آنزیم ۲۲۵
سید جواد حسینی واشان- طاهره غزنوی

ژنتیک و اصلاح

- برآورد اندازه مؤثر جمعیت موسفند نژاد سنگسری با استفاده از روش‌های مختلف مبتنی بر تجزیه و تحلیل شجره ۲۳۷
محمدرضا شیخلو- عین الله عبدی قزلجه- رشید صفری- ذبیح الله نعمتی
- مطالعه شبکه زنی آنزیم‌ها در جوجه‌های مرغ آرین حساس به آسیب با استفاده از داده‌های RNA-Seq ۲۴۹
وحید تقی زاده- محمدرضا نصیری- مجتبی طهمورث پور- محمدرضا بختیاری زاده- علی جوادمنش
- شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (Map) در گاوهاي شیری استان کرمان با استفاده از
روش‌های کشت میکروبی، PCR و nested PCR ۲۶۳
مهدی سلطانی
- تجزیه فیلوژنی و تکاملی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لیتین در شترهای منطقه سیستان و بلوچستان ۲۷۵
مجتبی پیری- غلامرضا داشاب- بتول اصغری

فیزیولوژی

- اثر آنژی‌اکسیدانی ملاتونین بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی ۲۸۷
صدیقه محمدی- مرتضی ممویی- صالح طباطبایی وکیلی- جمال فیاضی

ادامه فهرست داخل جلد

Contents

Ruminant nutrition

- Determining Chemical Composition and Nutritional Value of Tomato Shoot Silage Supplemented with Different levels of Beet Pulp by Using Nylon Bag and in vitro Gas Production Method 162
A. Naserian- R. Khodaverdi- R. Valizadeh- A. Tahmasbi

The Effect of pH and Fennel, Pine and Eucalyptus Essential Oils on Rumen Fermentation Properties (in vitro) 177

A. Vakili- S. Saki- M. Danesh Mesgaran- F. Alipour

The Effects of Bacterial Inoculant and Prebiotic Additive on Chemical Composition, Gas Production and Aerobic Stability of Corn Silage 192

S. Alaei Baheer- H. Mohammadzadeh- A. Taghizadeh- A. Hoseinkhani

Determination of Nutritive Value of Seven Species of Alfalfa Weeds Using in vitro Techniques 207

M. Dadashi- A. Hosseinkhani- H. Mohammadzadeh

Poultry nutrition

- Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Post- molting Diet of Laying Hens on Egg Production Performance and Egg Quality during Different Storage Times 222
S. A. Mirghelanj- L. Fathollahzadeh- R. Kianfar- M. Olyae

The Performance and Egg Quality Parameters Effect of Pomegranate Pulp on of Laying Hens in Peak Production 235

S. J. Hosseini-Vashan- T. Ghaznavi

Genetic and breeding

- Estimating the Effective Population Size of Sangsari Sheep Using Different Methods Based on Pedigree Analysis 246
M. R. Sheikhlou- E. Abdi Ghezleji- R. Safari- Z. Nemati

Gene Expression Network Analysis on Angiogenesis Pathway in Low Temperature-Induced Ascites Susceptible Chickens in B-line Pedigree of Iranian Meat-Type Strain, Arian 261

V. Taghizadeh- M. R. Nassiri- M. Tahmoerespur- M. R. Bakhtiarizadeh- A. Javadmanesh

Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Kerman Province's Dairy Cows using Microbial Culture, PCR and Nested PCR Methods 272

M. Soltani

Nucleotide Sequence Analysis of Phylogenetic and Evolutionary Status of Leptin

- Gene in Camel 284
M. Piri- Gh. R. Dashab- B. Asghari

Physiology

- Antioxidant Effect of Melatonin on Arabic Ram Semen Parameters after Freeze - Thawing Process 295
S. Mohamadi- M. Mamouei- S. Tabatabaei Vakily- J. Fayazi

Continue Content in cover

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Iranian Journal of Animal Science Research

جلد ۱۰

شماره ۲

سال ۱۳۹۷

نشریه علمی - پژوهشی
پژوهشهای علوم دامی ایران

با شماره پروانه 3655 در تاریخ 87/8/19 از وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی و درجه علمی-پژوهشی به شماره 3/3149 در تاریخ 89/4/30 از وزارت علوم تحقیقات و فناوری (از جلد 1 سال 1388)

جلد 10 شماره 2 تابستان 1397

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد
مدیر مسئول: دکتر حسن نصیری مقدم
سردبیر: دکتر رضا ولی زاده
اعضای هیئت تحریریه:

دکتر رضا ولی زاده	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محسن دانش مسگران	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر غلامرضا قربانی	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر سید محمد مهدی طباطبایی	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه بوعلی سینا همدان
دکتر حسن نصیری مقدم	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر ابوالقاسم گلپای	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر جواد پور رضا	استاد تغذیه طیور	دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر فتح الله بلداجی	استاد تغذیه طیور	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر جواد ضمیری	استاد فیزیولوژی حیوانی	دانشگاه شیراز
دکتر محمدرضا نصیری	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر اردشیر نجاتی جوارمی	دانشیار ژنتیک و اصلاح دام	دانشگاه تهران
دکتر احسان خافی پور	استادیار میکروبیولوژی	دانشگاه مانیتوبا، کانادا
دکتر مهدی سرگلزایی	دانشیار ژنتیک	دانشگاه گوئلف، کانادا

ناشر: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد
چاپ: چاپخانه دانشگاه فردوسی مشهد
شمارگان: 10 نسخه

نشانی: مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، دبیرخانه نشریات علمی، دفتر نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران، صندوق پستی 91775 - 1163
نمابر: 051-38787430

پست الکترونیکی: ijasr@ferdowsi.um.ac.ir

مقالات این شماره در سایت <https://ijasr.um.ac.ir> به صورت مقاله کامل نمایه شده است.

این نشریه در پایگاه های زیر نمایه می شود:
پایگاه استنادی جهان اسلام (ISC) پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)

این نشریه به صورت فصلنامه (چهار شماره در سال) منتشر می شود.



مندرجات

- تغذیه نشخوار کنندگان
- صفحه
- 153 تعیین ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی سیلاژ بوته گوجه فرنگی فرآوری شده با سطوح مختلف تفاله خشک چغندر قند به روش کیسه های نایلونی و تولید گاز
- عباسعلی ناصریان - رضا خداوردی - رضا ولی زاده - عبدالمنصور طهماسبی
- 163 بررسی تاثیر pH و اسانس های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر ویژگی های تخمیر شکمبه ای در شرایط برون تنی
- سیدعلیرضا وکیلی - سارا ساکی - محسن دانش مسگران - فرشته علی پور
- 179 اثر افزودنی های باکتریایی و پری بیوتیکی بر ترکیب شیمیایی، تولید گاز و پایداری هوازی سیلاژ ذرت
- سیما علایی باهر - حمید محمدزاده - اکبر تقی زاده - علی حسین خانی
- 195 تعیین ارزش تغذیه ای هفت گونه از علف های هرز مزارع یونجه با استفاده از روش های آزمایشگاهی
- ملیحه داداشی - علی حسین خانی - حمید محمدزاده
- تغذیه طیور
- 209 اثرات اسید چرب لینولئیک کونژوگه (CLA) در جیره مرغان تخم گذار بر عملکرد تولید و صفات کیفی تخم مرغ در دما و زمان های مختلف نگهداری آن
- سیدعلی میرقلنج - لیلا فتح الله زاده - روح الله کیانفر - مجید علیایی
- 225 ارزیابی صفات عملکردی، کیفی و کلسترو ل تخم مرغ، فراسنجه های بیوشیمیایی خون و تعادل آنتی اکسیدانی مرغ های تخم گذار
- تغذیه شده با تفاله هسته انار و مولتی آنزیم
- سید جواد حسینی و اشان - طاهره غزنوی
- ژنتیک و اصلاح
- 237 برآورد اندازه مؤثر جمعیت گوسفند نژاد سنگسری با استفاده از روش های مختلف مبتنی بر تجزیه و تحلیل شجره
- محمدرضا شیخلو - عین الله عبدی قزljه - رشید صفری - ذبیح الله نعمتی
- 249 مطالعه شبکه ژنی آنژیوژنز در جوجه های مرغ آرین حساس به آسپت با استفاده از داده های RNA-Seq
- وحید تقی زاده - محمدرضا نصیری - مجتبی طهمورث پور - محمدرضا بختیاری زاده - علی جوادمنش
- 263 شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه پاراتوبرکلوزیس (Map) در گاوهای شیری استان کرمان با استفاده از روش های کشت میکروبی، PCR و nested PCR
- مهدی سلطانی
- 275 تجزیه فیلوژنی و تکاملی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در شترهای منطقه سیستان و بلوچستان
- مجتبی پیری - غلامرضا داشاب - بتول اصغری
- فیزیولوژی
- 287 اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین بر فراسنجه های کیفی منی قوچ عربی بعد از فرآیند انجماد - یخ گشایی
- صدیقه محمدی - مرتضی ممویی - صالح طباطبایی وکیلی - جمال فیاضی

سایر

مقایسه تأثیر استفاده از پودر کرم توپیفکس (*Tubifex tubifex*) پرورشی و تجاری در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و ایمنی 297

ماهی آنجل (*Pterophylum scalare*) قبل و بعد از تنش هوا

محسن برخوردار - رضا ولی‌زاده - امید صفری - محمدرضا احمدی - عباسعلی ناصریان

راهنمای تهیه و نگارش مقاله جهت چاپ در نشریه پژوهش های علوم دامی ایران

نشریه پژوهش های علوم دامی ایران، وابسته به دانشگاه فردوسی مشهد مقالات تحقیقی نویسندگان داخلی و خارجی را در زمینه های علوم دامی که به زبان فارسی با چکیده مبسوط به زبان انگلیسی و بر اساس دستورالعمل زیر تهیه شده باشند، جهت چاپ در نشریه می پذیرد. این مقالات باید برای اولین بار ارایه شده باشند و یا بطور همزمان به نشریه دیگری برای چاپ ارسال نگردیده باشند. ارایه نتایج در گردهمائی های علمی یا چاپ بصورت چکیده در مجلات علمی بلامانع است. **توجه به شیوه نامه ذیل کاملاً ضروری است:**

- ✓ مقاله ای که بر اساس دستورالعمل نشریه تهیه نشده باشد، در جلسه هیئت تحریریه مطرح نمی شود.
- ✓ مقاله ها توسط هیات تحریریه و داوران بررسی و در صورت پذیرش بر اساس تاریخ دریافت در نوبت چاپ قرار خواهند گرفت.
- ✓ مسئولیت صحت مطالب به عهده نویسنده (گان) به طور مشخص نویسنده مسئول می باشد.
- ✓ هیأت تحریریه در رد و ویرایش مقاله ها مجاز است.
- ✓ مقاله ها پس از پذیرش نهایی، از لحاظ ادبی ویرایش شده و جهت اعمال اصلاحات نهایی برای نویسنده مسئول ارسال می گردد. نویسنده مسئول باید اصلاحات خواسته شده را ظرف مدت ۳ روز با نرم افزار Microsoft Word 2007 اعمال و ارسال نماید. بدیهی است هرگونه تغییر پس از آن قابل قبول نخواهد بود.
- ✓ مدارک مربوط به داوری کلیه مقاله ها در دفتر نشریه محفوظ و محرمانه بوده و هیأت تحریریه نسبت به ارائه مدارک مربوط به مقالاتی که مورد پذیرش قرار نگرفته اند، متعهد نمی باشد.
- ✓ عدم رعایت شیوه نامه فوق موجب تأخیر در پذیرش و رفت و برگشت های مکرر و زمان بر مقاله خواهد شد.

نکات مهم:

جهت ارسال هر مقاله باید چهار فایل با این مشخصات آماده گردد. (۱) فایل اصلی مقاله به صورت Word، (۲) فایل اصلی مقاله به صورت PDF (فایلهای اصلی نباید دارای اسامی و مشخصات نویسندگان باشند)، (۳) فایل صفحه مشخصات نویسندگان مقاله و (۴) فایل تعهد نامه که باید از طریق سایت نشریه به آدرس <http://ijasr.um.ac.ir/index.php/animal> به صورت بارگذاری در سایت، ارسال گردد. فایلهای Word و PDF در قسمت فایلهای اصلی و فایلهای صفحه مشخصات نویسندگان و تعهدنامه در قسمت فایلهای مکمل بارگذاری شود. در هنگام ارسال مقاله عنوان مقاله به طور صحیح و اسامی کلیه نویسندگان مقاله به ترتیب باید در سایت وارد شود. توجه شود که کلیه مراحل (ارسال، ارزیابی، اصلاحات، پذیرش و یا عدم پذیرش) از طریق سایت نشریه انجام می گیرد، همچنین کلیه نویسندگان مقاله باید فرم ارسال مقاله را تأیید و فقط از طریق سایت روند پیشروی مقاله خود را پیگیری نمایند. نویسنده مسئول می تواند از طریق ایمیل نشریه به آدرس ijasr@um.ac.ir، ijasr@fum.ac یا ijasr@ferdowsi.um.ac.ir نیز از روند پیشرفت مقاله خود مطلع گردد.

الف) فرم صفحه مشخصات مقاله

صفحه مشخصات باید به هر دو زبان فارسی و انگلیسی حاوی عنوان کامل مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی و سمت نویسنده (گان)، نام گروه یا مؤسسه ای که نویسنده (گان) در آن شاغل هستند و محلی که تحقیق در آن انجام شده است، آدرس کامل نویسنده

(گان) شامل آدرس پستی، شماره تلفن، دورنگار و آدرس پست الکترونیکی باید در این صفحه قید شود. توجه شود که نام و محل خدمت نویسنده (گان) باید فقط در این صفحه نوشته شود و از تکرار آن در صفحات دیگر مقاله خودداری شود.

ب) فرم تعهد نامه

فرم تعهدنامه که در سایت بارگذاری شده است باید توسط نویسندگان تکمیل و پس از اینکه **به امضای تمام نویسندگان (گان) مقاله** رسید، اسکن شده و همراه فرم صفحه مشخصات نویسندگان به عنوان فایل مکمل در سایت بارگذاری گردد.

پ) دستورالعمل تهیه مقاله؛ روش تحریر

- ✓ کلیه قسمت‌های مقاله بایستی توسط Word 2007 و با فاصله خطوط ۱ و رعایت ۲/۵ سانتی متر حاشیه از هر طرف تهیه شده باشد.
- ✓ فونت B Mitra با اندازه فونت ۱۴ بکار رود.
- ✓ حداکثر تعداد صفحات مقاله ۱۵ صفحه باشد.
- ✓ از نشانه گذاری های متداول چون نقطه، ویرگول و ... به درستی استفاده شود.
- ✓ معادله‌ها در متن مقاله باید به ترتیب از ابتدا تا انتها شماره گذاری شوند.
- ✓ واحدهای مورد استفاده در متن مقاله باید بر اساس سیستم بین‌المللی متریک (SI) باشد.
- ✓ تعداد پاورقی ها به حداقل برسد و شماره پاورقی‌ها در هر صفحه از عدد یک آغاز شود.

ت) ترتیب بخش ها

بخش‌های ضروری هر مقاله شامل: عنوان، چکیده فارسی، واژه های کلیدی، مقدمه، مواد و روش ها، نتایج و بحث، نتیجه گیری کلی، منابع، عنوان انگلیسی و چکیده مبسوط انگلیسی می باشند. بخش‌های پیشنهادات و سپاسگزاری بصورت اختیاری و کاملاً خلاصه شده می توانند به متن مقاله پس از بخش نتیجه گیری کلی اضافه شوند.

۱- عنوان

عنوان مقاله در ابتدا و وسط صفحه اول و به صورت پررنگ نوشته شود. عنوان باید روان، بیانگر محتوای مقاله و مختصر (حداکثر حاوی ۱۵ کلمه) باشد. عنوان فارسی، چکیده فارسی و واژه‌های کلیدی (بدون ذکر نام نویسندگان) باید در صفحه نخست ذکر شوند.

۲- چکیده فارسی

چکیده فارسی باید حداکثر در ۲۵۰ کلمه تهیه شود. در این بخش مقاله اهداف عمده، مواد و روشها، نتایج و کاربردهای شاخص بصورت خلاصه و گویا ذکر شوند. از ذکر علائم آماری چون ($P < 0.05$) و منابع مورد استفاده در این قسمت مقاله خودداری شود.

۳- واژه های کلیدی

در انتهای متن چکیده فارسی حداکثر ۵ کلمه به عنوان واژه های کلیدی (به ترتیب حروف الفبا) نوشته شود.

۴- مقدمه

مقدمه باید به معرفی و توجیه موضوع و هدف مورد پژوهش بپردازد و در آن به تحقیقات انجام یافته در زمینه مورد نظر به طور مختصر و کافی اشاره شده باشد. مقدمه باید حداکثر در یک صفحه ارائه شده باشد.

۵- مواد و روش ها

شرح کامل مواد مورد استفاده و روش ها و طرح (طرحهای) آزمایشی بکار رفته در این بخش ذکر شوند. از بیان کامل روشهای اقتباس شده خودداری گردد و فقط به ارایه اصول و ذکر مأخذ اکتفا شود. مواد و روشهای ویژه، اصلاحی و ابداعات به نحوی که دیگران قادر به استفاده از آن در آزمایشهای خود باشند، می توانند به اختصار ذکر گردند. در صورت لزوم جهت معرفی تیمارها و یا روشهای خاص آزمایش می توان از جدول یا شکل استفاده کرد.

۶- نتایج و بحث

برای ارایه نتایج می توان از جدول، شکل، تصویر و منحنی استفاده کرد، اما باید از تکرار آنها به فرمتهای مختلف جدا خودداری شود. در هر قسمتی که نتایج ارائه می شوند باید مورد تجزیه و تحلیل هم قرار گیرند و با در نظر گرفتن هدف پژوهش، نتایج حاصله با نتایج پژوهشهای مشابه مقایسه و بحث شوند و نتیجه گیری از هر مبحث در انتهای آن ذکر گردد.

۶-۱- نحوه تهیه جدول ها و شکل ها

۶-۱-۱- جدول

- ✓ **الگوی جدول باید دقیقاً مشابه جدول نمونه ذیل باشد.**
- ✓ **عنوان و اطلاعات نوشتاری درون جدول به دو صورت فارسی و انگلیسی نوشته شوند، اما اعداد فقط به انگلیسی نوشته شوند.**
- ✓ **فونت عنوان و محتویات جدول برای فارسی B Mitra و برای انگلیسی Times New Roman با اندازه ۱۰ باشد. زیرنویس با اندازه فونت ۹ نوشته شود.**
- ✓ **عنوان جدول در بالا و با فرمت وسط چین نوشته و گویای نتایج مندرج در آن باشد. عنوان از شماره جدول با خط تیره جدا شود. در کل جدول فقط عبارت **جدول و شماره آن** پررنگ گردد و از ارائه پررنگ سایر قسمت‌های جدول خودداری شود. (جدول ۱- تأثیر)**
- ✓ **هر جدول با یک خط افقی از عنوان آن و سر جدول با یک خط افقی از متن جدول جدا و در زیر متن جدول نیز یک خط افقی کشیده شود. در صورت لزوم می‌توان برای تقسیم سر جدول از خطوط افقی در داخل کادر سر جدول استفاده کرد.**
- ✓ **تیمارها در ردیف اول، سر جدول و به صورت وسط چین، اما متغیرها در سمت چپ جدول و به صورت چپ چین ارائه گردد.**
- ✓ **از کشیدن هر گونه خط عمودی در جدول خودداری شود.**
- ✓ **توضیحات اضافی عنوان و متن جدول باید بصورت زیر نویس ارائه شوند و ارتباط آنها با جدول و عنوان با استفاده از علامت های عددی در بالا و سمت راست جمله ها، اعداد و غیره به صورت توان و اندازه کوچکتر مشخص شود. برای نوشتن زیر نویس یک سطر به جدول اضافه و آن سطر را Merge کرده و زیر نویس ها را در آن بنویسید تا خطوط شروع جدول و زیر نویس همراستا باشند.**
- ✓ **توضیحات زیرنویس در صورتی که به زبان فارسی است، راست چین و در صورتی که به زبان انگلیسی است، چپ چین باشند.**

✓ واحدهای مربوط به هر پارامتر جدول روبروی آن نوشته شود و اگر کل پارامترهای جدول یک واحد دارند در عنوان جدول نوشته شود. (مانند مثال زیر):

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف محصولات فرعی در جیره بر متابولیت‌های پلاسما (بر حسب میلی‌گرم بر دسی لیتر)

Table1- Effect of different levels of by-products in dietary on plasma metabolites (mg/dl)

Plasma metabolites	جیره های آزمایشی Experimental diets				P-value		
	Alfalfa	5% BP ¹	20% BP	SEM	treat	time	Treat × time
گلوکز Glucose (mg/dl)	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
نیترژن اوره ای خون BUN (%) ²	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
آسپاراتات آمینو ترانسفراز AST (U/L) ³	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
آلانین آمینو ترانسفراز ALT (U/L) ⁴	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
لیپوپروتئین با دانسیته پایین LDL (mol/L) ⁶	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002

میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

¹By-Products were used instead of alfalfa in 5 and 10 % based on dry matter intake.

²Blood urea nitrogen

³Aspartate Aminotransferase

⁴Alanine Aminotransferase

⁵Low density lipoprotein

۶-۱-۲- شکل

✓ **الگوی شکل باید دقیقاً مشابه با شکل های نمونه ذیل باشد.**

✓ **عنوان شکل، عنوان محورهای افقی و عمودی شکل به دو صورت فارسی و انگلیسی نوشته شوند. اما اعداد به انگلیسی باشند.**

✓ **هر محور افقی و عمودی باید حاوی توضیح کامل و واحد باشد. واحد پس از عنوان محور داخل پرانتز نوشته شود.**

✓ **عنوان شکل در پایین و با فرمت وسط چین نوشته و معرف محتوای آرایه شده در آن باشد.**

✓ **فونت عنوان و محتویات شکل برای فارسی B Mitra و برای انگلیسی Times New Roman با اندازه ۱۰ باشد. زیرنویس**

با اندازه فونت ۹ نوشته شود. در کل شکل فقط عبارت شکل و شماره آن پررنگ باشد و عنوان و توضیح شکل به صورت

پررنگ نباشد. (شکل ۱- تأثیر)

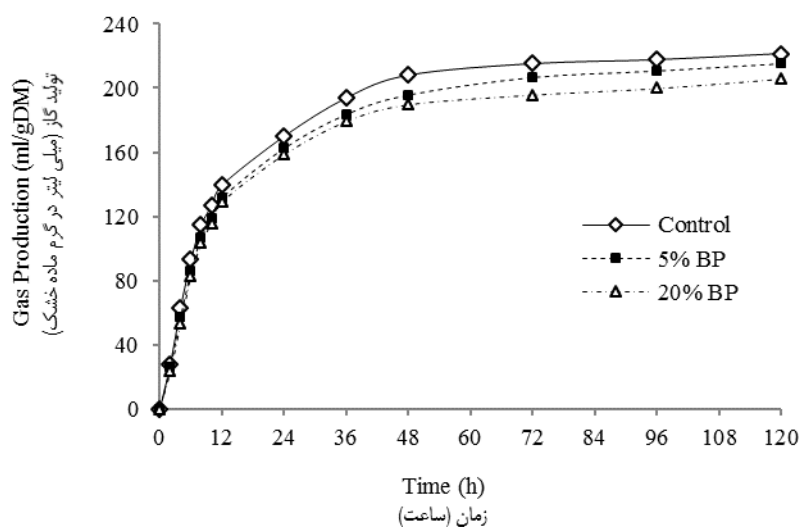
✓ **از اعداد انگلیسی در محورهای افقی و عمودی در شکل ها استفاده شود. توجه: در مورد شکل، از الگوهای سیاه و سفید استفاده**

شود و رنگ زمینه در کلیه شکلها بایستی سفید باشد.

✓ **در نمودارهای خطی می توان از علائمی نظیر (●, ○, ■, □, ◆, ◇, ▲, △, +) استفاده کرد.**

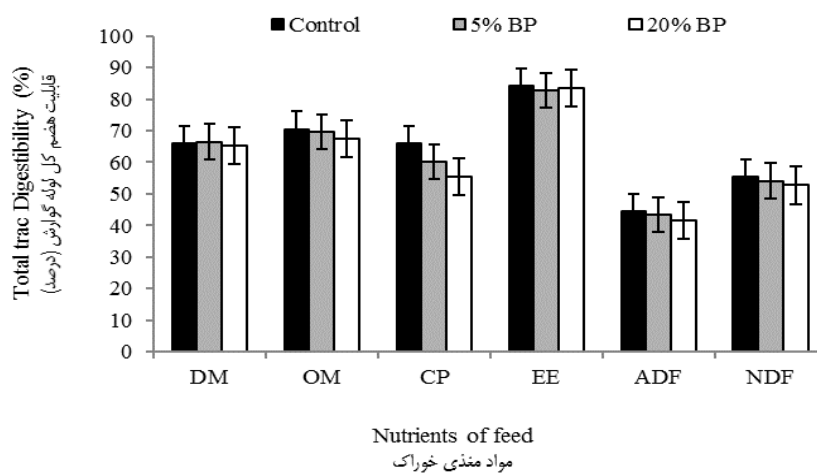
✓ **از آوردن کادر دور شکل و خطوط طولی در شکل خودداری شود.**

✓ **سعی شود با نرم افزار Excle روی شکلها به خوبی کار شود تا بالاترین کیفیت برای شکلها بدست آید.**



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف محصولات فرعی در جیره بر میزان تولید گاز در شرایط *in vitro*

Figure 1- Effects of different levels of by-products in dietary on extent of gas production *in vitro*



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف محصولات فرعی در جیره بر قابلیت هضم شکمبه ای مواد مغذی

Figure 1- Effects of different levels of by-products in dietary on rumen digestibility of nutrients

۷- نتیجه گیری کلی

استنتاج های کلی و شاخص حاصل از تحقیق باید در این بخش ذکر شوند. چنانچه نویسنده (گان) پیشنهاداتی بر آمده از تحقیق برای خوانندگان داشته باشند، می توانند در این قسمت ذکر نمایند.

۸- سپاسگزاری

بخشی اختیاری است و در ذیل آن نگارنده (گان) می توانند از تأمین کنندگان بودجه، امکانات و اشخاصی که در انجام تحقیق کمک کرده اند حداکثر در ۳ سطر پس از پذیرش در مرحله ویراستاری تشکر و قدردانی نمایند، بنابراین توصیه اکید می شود نویسنده (گان) در کلیه مراحل قبل از پذیرش نهایی از اضافه کردن این بخش به مقاله خودداری نمایند.

۹- منابع

الف- ارجاع به منابع

در متن مقاله ارجاع به منابع مقاله باید با استفاده از ذکر شماره هر منبع در آخر هر جمله یا پاراگراف صورت گیرد. در صورتی که یک جمله یا پاراگراف به چند منبع ارجاع می دهد، رعایت ترتیب اعداد از کوچک به بزرگ الزامی است.

همچنین مطالعات ژنتیکی محدودی روی ژنوم شتر در ایران صورت گرفته است (۲، ۴، ۱۸). خیبری و همکاران (۵)، توالی نوکلئوتیدی را در دو گونه شتر مورد بررسی قرار دادند.

ب- منابع مورد استفاده

منابع مورد استفاده باید شامل جدیدترین منابع در زمینه کار مورد نظر باشد. فهرست منابع به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده(گان) مقاله مرتب و شماره گذاری شود. وقتی از چند اثر مختلف یک نویسنده استفاده می شود، ترتیب شماره گذاری این مقاله ها بر حسب سال انتشار آنها (از قدیم به جدید) انجام گیرد **(توجه شود که تمام منابع فارسی و انگلیسی مورد استفاده در قسمت منابع باید به انگلیسی نوشته شوند. سال های شمسی به میلادی تبدیل شوند. در برگردان اسامی افراد اطمینان حاصل شود که املاء آن ها و سال انتشار درست باشد. ضروری است در انتهای منابع فارسی که به انگلیسی برگردان شده است عبارت In Persian داخل پرانتز ذکر شود).**

۹-۱- نکات مهم در مورد نوشتن منابع

- ✓ منابع بایستی بر اساس روش مورد استفاده **Journal of Dairy Science** تنظیم شود. اما توجه شود که **نام نشریه** و یا **همایش علمی** باید به صورت **کامل** نوشته شود و از نوشتن مخفف آنها جداً خودداری شود.
- ✓ نحوه نگارش منابع اتخاذ شده از نشریه های علمی، کتاب، همایش ها و یا درگاه الکترونیکی بایستی به صورت ذیل باشد.
- ✓ نام خانوادگی نویسنده اول، حرف اول اسم (اسامی) کوچک نویسنده اول، از نویسنده دوم به بعد حرف اول اسم (اسامی) کوچک و بعد نام خانوادگی. سال انتشار. عنوان. مشخصات ناشر. صفحه.
- ✓ به نقطه و ویرگولها در نوشتن منابع بسیار توجه شود.

به مثالها توجه نمایید:

۹-۱-۱- نشریه های علمی

1. Lane, M. A., R. L. Baldwin, and W. Jesse. 2011. Sheep rumen metabolic development in response to different dietary treatment. **Journal of Dairy Science**, 78(Supp1.1):310(Abstr).
2. Tyrrell, H. F., and P. W. Moe. 2008. Effect of intake on digestive efficiency. **Journal of Dairy Science**. 58:1151-1163.
3. Ansari-Renani, H., M. Salehi., Z. Ebadi, and S. Moradi. 2010. Identification of hair follicle characteristics and activity of one and two humped camels. **Small Ruminant Research**, 90(1):64-70.

4. Akbari, M, and H. R. Afshari. 2014. Mapping of transcription factor binding Region of kappa casein (CSN3) gene in Iranian Bacterianus and Dromedaries camels. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(4):57-65. (In Persian).
5. Karimi, M. A., M. C. Esfahan., G. Hisseini, and M. Rezaei. 2012. Effect of glutamic acid on broiler given sub marginal crude protein with adequate essential amino acids using feeds high and low in potassium. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 5(2):17-25. (In Persian).

۹-۱-۲- کتاب ها

6. AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
7. Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
8. Lengemann, F. W., R. A. Wentworth, and C. L. Comar. 1974. Physiological and biochemical aspects of the accumulation of contaminant radionuclides in milk. Pages 159–170 in Lactation: A Comprehensive Treatise. Nutrition and Biochemistry of Milk/Maintenance. Vol. 3. B. L. Larson and V. R. Smith, ed. Academic Press, London, UK.
9. National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

۹-۱-۳- همایش ها

10. Barbano, D. M. 1996. Mozzarella cheese yield: Factors to consider. Page 29 in Proc. Wisconsin Cheese Markers *Meeting Center of Dairy Research*, University of Wisconsin, Madison.
11. National Mastitis council. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of premilking and postmilking teat disinfections published since 1980. Pages 82-92 in Natl. *Mastitis Council Regional Meeting proceeding*, Harrisburg, PA. Natl. Mastitis council, Inc., Madison. WI.

۹-۱-۴- درگاه الکترونیکی (Web Site)

12. Buch, L. H., A. C. Sorensen, J. Lassen, P. Berg, J. A. Eriksson, J. H. Jakobsen, and M. K. Sorensen. 2011. Hygiene-related and feed-related hoof diseases show different patterns of genetic correlations to clinical mastitis and female fertility. *Journal of Dairy Science*, 94:1540–1551. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3137>.
13. Mathieu R., H. M. Richards, S. J. Brooks, W. Stewart, and M. Sbins. 2004. Relationships between Milk production and heritability in Holstein dairy cattle. *International Journal of Animal Science*, 24(2):65–81. Available at <http://www.informaworld.com/contentUa/V.24-2>.

۱۰- چکیده انگلیسی

بر اساس رویکرد دانشگاه فردوسی مشهد مبنی بر لزوم توجه به نظام‌های رتبه‌بندی و علم سنجی رسمی، از ارایه‌دهندگان مقاله‌ها درخواست می‌گردد که چکیده انگلیسی مقاله را به صورت چکیده مبسوط (Extended Abstract) با فرمت زیر تهیه و در انتهای مقاله حداکثر در یک صفحه بعد از منابع نوشته و سپس مقاله را در سایت بارگذاری نمایند. چکیده مبسوط باید دارای **حداقل ۷۰۰ و حداکثر ۱۰۰۰ کلمه** باشد. بخشهای تشکیل دهنده چکیده مبسوط و مشخصات آنها باید به شرح ذیل باشد.

✓ ابتدای واژه‌های اصلی عنوان انگلیسی مقاله و کلمات کلیدی با حروف بزرگ نوشته شود.

✓ از ذکر اسامی و آدرس نویسندگان به انگلیسی در بخش چکیده مبسوط خودداری گردد.

The Title Should Be Times New Roman, Font Size 12, Bold and Center. The Scientific Name in Title and in Text Should Be *Italic*.

[illegible]

Materials and Methods

[illegible][illegible]

Keywords: Aaaa, Bbbb, Cccc, Dddd, Eeee, Ffff.

*** نویسندگان محترم توجه نمایند که آخرین اصلاحات راهنمای نگارش مقاله در سایت نشریه قابل دسترس است.

تعیین ترکیب شیمیایی و ارزش غذایی سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی فرآوری‌شده با سطوح مختلف تفاله خشک چغندر قند به روش کیسه‌های نایلونی و تولید گاز

عباسعلی ناصریان^{۱*} - رضا خداوردی^۲ - رضا ولی زاده^۱ - عبدالمنصور طهماسبی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۲۱

چکیده

ترکیبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و تولید گاز به روش آزمایشگاهی سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی فرآوری‌شده با تفاله خشک چغندر قند با استفاده از سه رأس گاو نر بالغ هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای دائمی تعیین شد. نمونه‌های آزمایشی جمع‌آوری و بخشی از آن خشک و بخش دیگر با سطوح ۰، ۴ و ۸ درصد تفاله خشک چغندر قند در کیسه‌های نایلونی سیلو شدند و پس از بازگشایی، آزمون تولید گاز انجام شد و بخشی از نمونه‌ها برای تعیین خصوصیات تجزیه‌پذیری ماده خشک، پروتئین خام و دیواره سلولی در ساعات متوالی استفاده شد. ترکیب شیمیایی بوته گوجه‌فرنگی نشان داد که این گیاه به‌ترتیب محتوی ۲۶، ۱۴، ۴۰/۲، ۲۸/۳ و ۱۹/۶ درصد ماده خشک، پروتئین خام، دیواره سلولی، دیواره سلولی بدون همی سلولز و خاکستر خام است. فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک شامل، بخش سریع تجزیه (a)، بخش کندتجزیه (b) و ثابت نرخ تجزیه (c) در نمونه سیلاژ فرآوری‌شده با سطوح ۰، ۴ و ۸ درصد تفاله خشک چغندر قند به‌ترتیب برابر با ۲۱/۶۹، ۴۴/۹۷، ۰/۰۶۹ و ۲۰/۵۷، ۴۵/۱۵، ۰/۰۶۷ و ۲۵/۱۲ و ۰/۴۳، ۰۹۷/۱۱، ۰/۴۳ درصد در ساعت بود. همچنین، فراسنجه‌های تولید و نرخ تولید گاز، ماده آلی قابل متابولیسم و انرژی قابل متابولیسم نمونه‌های آزمایشی به‌ترتیب برابر با ۴۸/۷۹، ۵۴/۲۶، ۵۴/۶۰ میلی‌لیتر به‌ازای گرم ماده خشک، ۰/۰۴۸، ۰/۰۵۵، ۰/۰۵۸ میلی‌لیتر در ساعت، ۷۵/۱۷، ۷۸/۵۸، ۷۵/۵۵ گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک و ۲/۵۵، ۸/۷۵ مگاژول در کیلوگرم ماده خشک تعیین شد. به‌طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که بوته گوجه‌فرنگی دارای ترکیبات مغذی مورد نیاز نشخوارکنندگان بوده و عمل‌آوری با موادی مانند تفاله خشک چغندر قند باعث افزایش ارزش غذایی آن می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌پذیری، ترکیب شیمیایی، تولید گاز، سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی

مقدمه

محصولات فرعی کشاورزی که طی برداشت یا فرآوری محصولات باغی یا زراعی به‌دست می‌آیند در تغذیه حیوانات از دو جنبه کاستن وابستگی دام به غلات که توسط انسان مصرف می‌شود و حذف برنامه‌های پرهزینه برای از بین بردن پس‌مانده‌های محصولات کشاورزی اهمیت دارد (۱۵).

یکی از محصولات فرعی زراعی برگ و ساقه گوجه‌فرنگی می‌باشد که به‌طور عمده در مزارع بدون استفاده باقی مانده و از بین می‌رود (۱۷). گوجه‌فرنگی^۳ از خانواده لیکوپرسیکوم اسکالتوم^۴ است که از هزاران سال پیش وجود داشته و موطن اصلی آن امریکای جنوبی می‌باشد و در حال حاضر بیش از هفت هزار گونه از آن در جهان وجود دارد (۶). تولید گوجه‌فرنگی در دنیا بیش از ۱۳۰ میلیون تن برآورد می‌شود (۱۱). حدود ۲۷/۶ درصد از سهم زیرکشت سبزیجات در

کمبود خوراک دام از معضلات اساسی در صنعت دامپروری است و استفاده از فرآورده‌های فرعی محصولات کشاورزی و عمل‌آوری مناسب آن از راهکارهای اصلی جهت جبران بخشی از کمبود مواد مغذی مورد نیاز دام است. این درحالی است که استفاده از محصولات فرعی کشاورزی به‌علت هزینه نسبی کمتر در مقایسه باعلوفه و غلات، نقش مهمی در سیستم‌های خوراکی نشخوارکنندگان پیدا کرده است (۴ و ۸). فرآورده‌های فرعی صنایع کشاورزی منابع ارزشمندی به‌لحاظ محتوای انرژی، پروتئین، و فیبر مؤثر هستند. استفاده از

۱- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه فردوسی مشهد

(*)- نویسنده مسئول: (Email: naserian@ferdowsi.um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.38678

3- *Lycopersicum esculentum*

4- *Solanaceae*

اندازه‌گیری تولید گاز و کشت بسته

برای آزمون تولید گاز، مایع شکمبه ۲ ساعت پیش از مصرف خوراک وعده صبح از دو گاو نر فیستولدار تغذیه‌شده در سطح نگهداری، جمع‌آوری شد. مقدار ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک از هر نمونه سیلاژ (با ۴ تکرار) با ۳۰ میلی لیتر مخلوط بافر (مطابق با روش منک و استینگاس (۲۴)) و مایع شکمبه (نسبت ۲ به ۱) در بطری‌های شیشه‌ای ریخته شده و درب آن‌ها با استفاده از درپوش لاستیکی و پوشش آلومینیومی کاملاً بسته و در دمای ۳۹ درجه به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون شدند. فشار گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از دستگاه فشارسنج اندازه‌گیری و حجم گاز تولیدی در هر زمان از رابطه تئودورو و همکاران (۳۰) به دست آمد. فراسنجه‌های A و C با روش حداقل مربعات تکراری با استفاده از رویه NLIN سیستم آنالیز آماری (۲۰۰۱) به دست آمد. برای تخمین قابلیت هضم ماده آلی (OMD)، انرژی متابولیسمی (ME)، انرژی خالص شیردهی (NEL) و ناپدید شدن ماده خشک (IVDMD) از فرمول‌های پیشنهادی منک و استینگاس (۲۴) به شرح زیر:

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 2.2 + 0.1357 GP + 0.0057 CP + 0.00002859 CP^2$$

$$OMD \text{ (g/100 g DM)} = 14.88 + 0.889 \times GP + 0.45 \times CP + 0.0651 \times XA$$

استفاده شد و میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) نیز با استفاده از رابطه $SCFA \text{ (mmol)} = 0.00425 GP - 0.0222 GP$ محاسبه گردید (۲۴). در این معادلات GP تولید گاز مقدار ۲۰۰ میلی گرم نمونه خوراک پس از ۲۴ ساعت، CP مقدار پروتئین خام (گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) و XA مقدار خاکستر (گرم به ازای ۱۰۰ گرم ماده خشک) می‌باشد. متوسط نرخ تخمیر (AFR) طبق معادله پیشنهادی فرانس و همکاران (۱۳) $(AFR = A.C / 2 \ln 2)$ محاسبه گردید که A تولید تجمعی گاز و C نرخ جزئی تولید گاز می‌باشند. برای محاسبه ناپدید شدن ماده خشک، محتوی بطری‌ها با پارچه با منافذ ۴۲ میکرومتر صاف شد و باقیمانده آن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد درآون به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. ویژگی‌های تخمیری شکمبه در شرایط برون‌تنی و بازدهی تخمیر خوراک محاسبه شد (۲۵). در مرحله بعد، آزمایش تخمیرپذیری in vitro سیلاژ آزمایشی در قالب سیستم کشت بسته^۱ تعیین شد (۵). یک روز پیش از آزمایش، ۲۰۰ میلی گرم از ماده خشک هر نمونه سیلاژ داخل بطری‌های ۶۰ میلی لیتری ریخته شد و در روز آزمایش مایع شکمبه پیش از مصرف خوراک از ۲ گاو نر فیستولدار تغذیه‌شده در حد نگهداری جمع‌آوری گردید. مایع شکمبه پس از صاف کردن با پارچه ۴ لایه‌ای تحت شرایط بی‌هوازی به آزمایشگاه منتقل و pH آن

کشور (معادل ۱۵۴ هزارهکتار) مربوط به کشت گوجه‌فرنگی بوده که با تولید حدود ۵ میلیون تن در سال زراعی ۱۳۹۰ رتبه هفتم را در جهان به‌خود اختصاص داده است (۲). برآورد می‌شود سالانه حدود ۷۰۰ میلیون عدد بوته تر گوجه‌فرنگی در مزارع سراسر کشور بر جای می‌ماند که با توجه به متوسط درصد ماده خشک ۱۷/۷ سالانه حدود ۱۰۰ میلیون تن ماده خشک از این بقایا حاصل شود که رقمی قابل ملاحظه است (۱۸). با توجه به بحران جهانی غذا و مقادیر تولید بقایای گوجه‌فرنگی در کشور، استفاده بهینه از بقایای این گیاه در تغذیه دام همچون دیگر محصولات فرعی کشاورزی که استفاده مستقیم آنها در تغذیه انسان غیرممکن است، نوعی ضرورت به‌شمار می‌آید. درخصوص استفاده از تفاله خشک و سیلوشده میوه گوجه‌فرنگی (محصول فرعی کارخانه رب) در تغذیه دام، آزمایشات و مطالعات متعددی انجام شده است. از سوی دیگر به‌منظور حفظ سطح مواد مغذی و نیز کاهش غلظت آلکالوئیدهای موجود در محصولات فرعی کشاورزی در تغذیه دام، انتظار می‌رود با سیلو نمودن این بقایا بتوان نتیجه بهتری را در عملکرد دام مشاهده نمود (۳۵). با توجه به کمبود منابع خوراک دام در کشور که ضرورت شناسایی و معرفی منابع جدید را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید، لازم است قابلیت تولید و ارزش غذایی گیاه گوجه‌فرنگی تعیین شود. بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین ترکیبات شیمیایی گیاه گوجه‌فرنگی و تجزیه‌پذیری سیلاژ عمل‌آوری شده آن به‌روش کیسه‌های نایلونی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعیین ترکیب شیمیایی

بوته‌های گوجه‌فرنگی (رقم فلات سی اچ) در مهرماه ۱۳۹۲ در پایان فصل برداشت میوه از مزارع گوجه‌فرنگی استان سمنان جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده شامل برگ و ساقه و اندکی میوه سبز بود که از فاصله ۵ سانتی متری سطح زمین قطع، به اندازه تقریبی ۵ سانتی متر خرد و بخشی از آن جهت تهیه علوفه خشک جدا گردید. از بوته‌های خشک شده نمونه تصادفی برای آنالیز ترکیب شیمیایی گرفته شد (۳۱). بخش دیگر برای آزمایش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای در یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۴ تکرار سیلو شد و پس از ۶۰ روز بازگشایی و مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند و میزان pH آنها اندازه‌گیری شد (۳ و ۹). ترکیب شیمیایی شامل میزان ماده خشک (DM)، پروتئین خام (CP)، چربی خام (EE) و خاکستر (Ash) به روش AOAC (۳) و دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز طبق روش ون‌سوست و همکاران (۳۲) تعیین شد و داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شدند.

چغندر قند این میزان کاهش یافت. افزایش پروتئین سیلاژ احتمالاً ناشی از کاهش ترکیبات محلول در اثر فرآیند تخمیر (۱۰) می‌باشد. در مقابل کاهش میزان پروتئین بوته سیلو شده پس از افزودن تفال خشک چغندر قند را می‌توان به میزان پروتئین خام پایین‌تر تفال خشک چغندر نسبت داد. سیلو کردن بوته گوجه‌فرنگی سبب کاهش غلظت‌های دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی‌سلولز در مقایسه با مقادیر آنها در بوته خشک گوجه شد (۳۸/۵ و ۲۵/۴ در برابر ۴۰ و ۲۸ درصد)، اما افزودن تفال خشک چغندر قند، این مقادیر را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). کاهش میزان دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی‌سلولز در سیلاژ احتمالاً ناشی از تجزیه دیواره سلولی توسط کلستری‌دیاها در شرایط سیلو می‌باشد (۱۰) و افزایش آن پس از عمل‌آوری می‌تواند مرتبط با مقادیر بالای این ترکیبات در تفال خشک چغندر قند باشد. عمل‌آوری سیلاژ با تفال چغندر قند سطح pH را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که نشان‌دهنده تولید اسیدهای چرب فرار است (۲۲). اگرچه انتظار می‌رود با افزایش ماده خشک مواد سیلویی میزان pH آن در مقادیر بالاتری تثبیت شود (۱۲) اما با افزودن تفال خشک چغندر قند کاهش pH شدت بیشتری ($P < 0.05$) داشت که احتمالاً دلیل آن تأمین کربوهیدرات‌های قابل تخمیر بیشتر و در پی آن تولید اسید لاکتیک بیشتر بوده است. به هر حال با در نظر گرفتن میزان ماده خشک در سیلوهای این آزمایش مقادیر pH نیز منطقی به نظر می‌رسند و در دامنه قابل قبولی قرار دارد و می‌توان آنها را به‌عنوان سیلوی خوب رتبه‌بندی کرد (۱۲).

تولید گاز و کشت بسته

مقادیر فراسنجه‌های تولید گاز و متوسط نرخ تخمیر بوته گوجه‌فرنگی مزرعه‌ای خشک (تیمار ۱) و عمل‌آوری شده با سطوح ۰، ۴ و ۸ درصد تفال خشک چغندر قند (به‌ترتیب تیمارهای ۲، ۳ و ۴) در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین پتانسیل تولید گاز مربوط به تیمار چهارم بود که دارای ۸ درصد تفال خشک چغندر قند بود ($P < 0.05$). اگرچه سیلوی بوته گوجه‌فرنگی بدون افزودنی کمترین مقدار تولید گاز را داشت اما بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به میزان دیواره سلولی بالاتر در تیمارهای شاهد، ۳ و ۴ (جدول ۲) می‌توان تولید گاز بیشتری را نیز انتظار داشت (۲۶). از طرفی کاهش سطوح آلکالوئیدها نیز می‌تواند باعث افزایش تولید گاز شود، لذا می‌توان انتظار داشت سطوح آلکالوئیدها در این تیمارها با خشک کردن و نیز عمل‌آوری سیلاژ آن کاهش یافته باشد؛ چراکه سیلو کردن بوته گوجه‌فرنگی بدون افزودنی، سبب افزایش تولید گاز در مقایسه با نوع خشک آن شد ($P < 0.05$).

با بافر به ۷/۲ رسانده شد (۲۳). مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه با نسبت ۲ به ۱ وارد بطری‌های شیشه‌ای حاوی نمونه (سه تکرار در دو اجرا) گردید. پس از پر کردن بطری‌ها تحت شرایط بی‌هوازی درب شیشه‌ها بسته و در بن‌ماری ۳۹ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (۹ و ۲۰). فشار گاز با استفاده از فشارسنج در ساعت‌های ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون ثبت شد و گاز تجمع‌یافته آزاد گردید. در پایان انکوباسیون یک نمونه ۱ میلی‌لیتری از محیط کشت با ۰/۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی اسیدی (۹) و به روش فنلی با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای

در مرحله آخر، در کیسه‌هایی از جنس ابریشم مصنوعی با منافذ ۵۰ میکرومتر، معادل ۵ گرم نمونه آسیاب‌شده از سیلاژ آزمایشی ریخته شد. کیسه‌ها با آب معمولی خیس و در زمان‌های انکوباسیون ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ در شکمبه قرار داده شد. کیسه‌های خارج‌شده از شکمبه پس از شستشو به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و خشک گردید. باقیمانده داخل کیسه‌ها جهت محاسبه بخش ناپدیدشده، دیواره سلولی و پروتئین خام مورد استفاده قرار گرفت. فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک، پروتئین خام و دیواره سلولی در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از معادله پیشنهادی ارسکوف و همکاران (۴۲) $P = a + b(1 - e^{-ct})$ تعیین و تجزیه‌پذیری مؤثر (ED) نمونه‌ها با استفاده از معادله $ED = a + (bc/c + k)$ در نظر گرفتن نرخ خروجی ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۶ در ساعت محاسبه شد (۳۴).

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

ترکیب شیمیایی بوته گوجه‌فرنگی در جدول ۱ آورده شده است. میزان ماده خشک این گیاه در زمان پایان برداشت میوه ۲۶ درصد بود. ونتورا و همکاران (۳۴) میزان ماده خشک بوته گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای را ۱۷/۷ درصد گزارش کردند. یکی از علت‌های اختلاف موجود، نوع کشت بوته است. زیرا بوته‌های آزمایش حاضر از نوع مزرعه‌ای بودند. میزان پروتئین خام بوته گوجه‌فرنگی ۱۴ درصد بود که مشابه با گزارش کمالی و همکاران (۱۷) است. میزان چربی خام بقایای مزرعه گوجه‌فرنگی در این آزمایش مشابه نتایج ونتورا و همکاران (۳۴) بود (۱/۵ درصد). با سیلو کردن شاهد افزایش مقدار پروتئین خام بوته گوجه‌فرنگی بودیم اما با افزودن تفال خشک

جدول ۱- ترکیب شیمیایی بقایای مزرعه گوجه‌فرنگی (درصد ماده خشک)

Table 1- Chemical composition of The remains of a tomato farm (% DM basis)

اسیدیته pH	خاکستر Ash	دیواره سلولی بدون همی سلولز ADF	دیواره سلولی NDF	چربی خام EE	پروتئین خام CP	ماده خشک* DM
6.57	19.6	28	40	1.5	14	26

*درصد گیاه تازه

جدول ۲- تأثیر سیلوکردن بر ترکیب شیمیایی بوته گوجه‌فرنگی (درصد ماده خشک)

Table 2- Effect of Ensiling on tomato plant chemical composition

ترکیب شیمیایی Chemical composition	گیاه قبل از سیلوکردن Plant before ensiling	سیلاژ بوته بدون افزودنی Plant silage without additives	سیلاژ بوته + ۴٪ تفاله خشک چغندر قند plant silage + 4%Dried beet pulp	سیلاژ بوته + ۸٪ تفاله خشک چغندر قند plant silage + 8%Dried beet pulp	میانگین خطای استاندارد SEM
ماده خشک DM	26.0 ^d	29.4 ^c	30.0 ^b	31.6 ^a	0.100
پروتئین خام CP	14.0 ^b	14.4 ^a	13.0 ^c	12.7 ^c	0.104
دیواره سلولی NDF	14.0 ^b	38.5 ^c	45.7 ^a	46.0 ^a	0.123
دیواره سلولی بدون همی سلولز ADF	28.0 ^c	25.4 ^d	35.4 ^b	37.6 ^a	0.174
خاکستر Ash	19.6 ^d	22.2 ^c	23.0 ^b	24.1 ^a	0.121
اسیدیته pH	6.57 ^a	4.71 ^b	4.52 ^c	4.34 ^d	0.048

*در تمامی جداول میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

حاضر با نتایج الوزیری و همکاران (۱۰) متفاوت بود چرا که آنها مقادیر قابلیت هضم ماده آلی بوته خشک گوجه‌فرنگی را ۳۳/۹۴ درصد گزارش کردند که پس از سیلوکردن به ۳۹/۸۱ درصد کاهش یافت. مطالعات مختلف نیز وجود دارد که افزایش قابلیت هضم در پی سیلوکردن گیاه به سبب کاهش اتصالات لیگنوسلولزی توسط هیدرولیز اسیدی درون سیلو را گزارش داده‌اند که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. بخش دیگری از این اختلاف می‌تواند با روش برآورد قابلیت هضم و مرحله رشد و وضعیت فیزیولوژیک گیاه و زمان برداشت مرتبط باشد (۲۴). اگرچه الوزیری و همکاران (۱۰) علت کاهش قابلیت هضم را پس از سیلو شدن گزارش نکردند، اما احتمالاً میزان رطوبت بالای بوته گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای در مطالعه آنها و خروج شیرابه و به تبع آن خروج مواد مغذی محلول سبب کاهش قابلیت هضم سیلاژ شده است (۷). از سوی دیگر افزودن تفاله خشک چغندر قند به سیلاژ علوفه‌های با رطوبت بالا سبب پیشگیری از خروج شیرابه، مواد مغذی محلول و به تبع آن بهبود قابلیت هضم می‌شود (۱)، چراکه تفاله چغندر قند دارای ظرفیت جذب رطوبت بالا و دارای ارزش غذایی مناسبی می‌باشد (۱). مقدار انرژی قابل متابولیسم

سیلو کردن بوته گوجه‌فرنگی سبب کاهش فاز تأخیر شد و این مقدار با افزایش سطوح تفاله خشک چغندر قند کاهش بیشتری را نشان داد، ولی اختلاف آن در بین تیمارها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). میزان تولید گاز در ۹۶ ساعت در سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی با سطوح ۴ و ۸ درصد تفاله خشک چغندر قند (جدول ۳)، به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) بیشتر از سایر تیمارها بود (۵۴/۲۶ و ۵۴/۶۰ میلی‌لیتر). این مقدار پایین‌تر از میزان تولید گاز علوفه‌های رایجی مانند یونجه است، اما در مقایسه با برخی محصولات فرعی کشاورزی با ارزش غذایی پایین (کاه گندم) از میزان بالاتری برخوردار است. میزان تولید گاز به‌طور عمده تحت تأثیر ترکیب شیمیایی گیاه قرار دارد (۱۰)، به‌طوری‌که مقدار انرژی متابولیسمی بالاتر (جدول ۴) سبب افزایش (۲۸) و خاکستر بالاتر می‌تواند باعث کاهش تولید گاز گردد (۱۰). قابلیت هضم با سیلوکردن و نیز افزایش سطح تفاله خشک چغندر قند به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش یافت. کامینز و همکاران (۷) علوفه تیموتی از خانواده گراس‌ها را با سطوح مختلفی از تفاله خشک چغندر قند سیلو کردند و دریافتند که با افزودن تفاله خشک چغندر قند به سیلو قابلیت هضم به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه

بوته‌های مورد آزمایش بین ۷/۸۳ تا ۸/۷۵ مگاژول در کیلوگرم ماده خشک بود. زمانی که گیاه به تنه‌ای سیلو شد مقدار انرژی قابل متابولیسم آن کاهش یافت، اما با افزودن تفاله خشک چغندر قند به سیلو این مقدار افزایش داشت ($P < 0.05$) و بیشترین آن مربوط به تیمار سیلوی گوجه حاوی ۸ درصد تفاله چغندر قند بود. در مطالعه‌ای که توسط کردی و همکاران (۱۹) روی سیلوی تفاله مرکبات انجام گرفت، با افزودن تفاله خشک چغندر به سیلو میزان انرژی قابل متابولیسمی و قابلیت هضم آن افزایش یافت. با سیلو کردن بوته گوجه‌فرنگی و افزودن تفاله خشک چغندر قند به آن، نیتروژن آمونیاکی

به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت. گیاه گوجه‌فرنگی دارای متابولیت‌های ثانویه گیاهی از جمله توماتین است. دورمیک و همکاران (۹) ویژگی‌های تخمیری ۱۲۸ گونه مرعی در استرالیا را با استفاده از کشت بسته ارزیابی کردند و نشان دادند که گونه‌های مختلف آتریپلکس سبب کاهش غلظت آمونیاک محیط کشت نسبت به شاهد شد و آنها علت آن را مربوط به تغییر جمعیت میکروبی یا متابولیت‌های ثانویه گیاهی (تان‌ها) بیان کردند.

جدول ۳- فراسنجه‌های تولید گاز و متوسط نرخ تخمیر بوته خشک گوجه‌فرنگی و سیلاژ عمل‌آوری شده آن با سطوح مختلف تفاله خشک چغندر قند

Table 3- Gas production parameters and average fermentation rate of dry tomato plant and Silage mixed with different levels of dry sugar beet pulp

فراسنجه	بوته خشک	سیلاژ بوته مزرعه	سیلاژ بوته + ۴٪ تفاله خشک چغندر قند	سیلاژ بوته + ۸٪ تفاله خشک چغندر قند	میانگین خطای استاندارد
Item	Dry tomato plant	Tomato plant Silage	plant silage + 4%Dried beet pulp	plant silage + 8%Dried beet pulp	SEM
A ¹	52.82 ^a	48.79 ^b	54.26 ^a	54.60 ^a	0.942
C ²	0.046 ^a	0.048 ^{ab}	0.055 ^a	0.058 ^a	0.0021
L ³	0.098	0.092	0.083	0.079	0.0084
AFR ⁴	1.767 ^a	2.155 ^a	2.170 ^a	2.309 ^a	0.1763

در تمامی جداول میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

¹ Asymptotic gas production (mL/g OM)

² Fractional rate of gas production (/h)

³ Lag time (h)

⁴ Average fermentation rate (mL/h).

تجزیه‌پذیری

نتایج مربوط به فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک، پروتئین خام و دیواره سلولی سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی در جدول ۵ ارائه گردیده است. بخش سریع تجزیه ماده خشک، ثابت نرخ تجزیه‌پذیری، پتانسیل تجزیه‌پذیری و توان تجزیه‌پذیری بالقوه در سیلاژ عمل‌آوری شده با سطح ۸ درصد تفاله خشک چغندر قند بیشترین ($P < 0.05$) مقادیر را به خود اختصاص داد، اما بین سطوح ۰ و ۴ درصد تفاله چغندر قند اختلاف معنی‌داری در مورد فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری مشاهده نشد ($P > 0.05$) اگرچه این دو سطح دارای بیشترین بخش کند تجزیه نسبت به سطح ۸ درصد تفاله بودند ($P < 0.05$). مطالعات معدودی تجزیه‌پذیری بوته گوجه‌فرنگی را بررسی کرده‌اند. تحسین و همکاران (۲۹) میزان بخش سریع تجزیه و کند تجزیه مخلوط بقایای گلخانه‌ای (خیار و گوجه‌فرنگی) را به ترتیب ۱۶/۱ و ۵۵/۸ درصد در ساعت گزارش کردند که اختلاف آن با نتایج این آزمایش با ناخالصی نمونه‌ها و نوع کشت گوجه‌فرنگی مرتبط

است. با اینکه بخش دیواره سلولی در تیمار سطح ۸ درصد تفاله خشک چغندر قند بیشتر از دو تیمار دیگر است، بالا بودن بخش سریع تجزیه و پتانسیل تجزیه‌پذیری ماده خشک (۲۵/۱۲ درصد) آن را می‌توان به میزان بیشتر خاکستر خام مربوط دانست که نشان‌دهنده قابلیت تجزیه‌پذیری بالاتر است (۲۷). از سوی دیگر تفاله چغندر قند می‌تواند مقدار فیبر قابل تجزیه بیشتری را فراهم نماید و باعث بهبود تجزیه‌پذیری فیبر دیگر اجزای خوراک در شکمه شود (۲۱).

ماسودا و همکاران (۲۱) تفاله خشک چغندر قند را در سطوح مختلف با علوفه گرامینه مخلوط نمودند و دریافتند که با افزایش میزان تفاله خشک چغندر قند تا ۱۰ درصد وزن تر علوفه، میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک افزایش می‌یابد، اما با افزایش سطح آن به ۲۰ و ۴۰ درصد، تجزیه‌پذیری کاهش یافت. از سوی دیگر تفاله خشک چغندر قند به لحاظ دارا بودن کربوهیدرات‌های سریع تجزیه می‌تواند کیفیت سیلاژ و تجزیه‌پذیری مواد مغذی آن را بهبود بخشد (۲۸).

جدول ۴- فراسنجه‌های برآوردشده در روش تولید گاز و کشت تخمیری بسته بوته خشک گوجه‌فرنگی و سیلاژ عمل‌آوری‌شده آن با سطوح مختلف تفاله خشک چغندرقد

Table 4- Estimated parameters in *in vitro* gas production and batch culture methods of dry tomato plant and Silage mixed with different levels of dry sugar beet pulp

فراسنجه ITEM	بوته خشک مزرعه Dry tomato plant	سیلاژ بوته مزرعه Tomato plant Silage	سیلاژ بوته + ۴٪ تفاله خشک چغندرقد plant silage + 4%Dried beet pulp	سیلاژ بوته + ۸٪ تفاله خشک چغندرقد plant silage + 8%Dried beet pulp	میانگین خطای استاندارد SEM
تولید گاز در ۹۶ ساعت انکوباسیون Gas produced after 96 h incubation (ml)	53.46 ^b	49.06 ^c	56.03 ^a	56.01 ^a	0.151
ناپدید شدن ماده خشک (%) IVDMD ¹	50.29 ^c	46.29 ^d	53.11 ^b	55.98 ^a	0.689
قابلیت هضم ماده آلی OMD ² (%)	72.45 ^c	75.17 ^b	78.58 ^a	77.57 ^b	0.729
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر SCFA ³ (mmol)	0.777 ^c	0.708 ^d	0.912 ^b	0.952 ^a	0.010
FFE ⁶ (mg DM disappeared /ml gas produced after 24h)	12.54 ^a	11.47 ^b	11.0 ^b	9.16 ^c	0.169
انرژی متابولیسمی ME ⁴ (Mj/kg DM)	7.83 ^c	7.55 ^d	8.52 ^b	8.75 ^a	0.077
بازدهی تخمیر خوراک FFE ⁵ (mg DM disappeared /ml gas produced after 24h)	12.54 ^a	11.47 ^b	11.0 ^b	9.16 ^c	0.169
اسیدیته pH*	6.91 ^a	6.92 ^a	6.89 ^{ab}	6.85 ^b	0.014
نیترژن آمونیاکی N-NH ₃ ⁺ (mg/g CP)	33.4 ^a	29.1 ^b	21.54 ^c	18.41 ^d	0.367

¹ *In vitro* dry matter disappearance

² Organic matter disappeared

³ Short chain fatty acid

⁴ Metabolizable energy

⁵ Feed fermentation efficiency

* estimated from batch culture system

پتانسیل تجزیه‌پذیری پروتئین در تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). اما بین تیمارهای ۴ و ۸ درصد تفاله خشک چغندرقد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در حالی که تجزیه‌پذیری مؤثر دیواره سلولی تیمار ۴ درصد تفاله خشک چغندرقد در نرخ عبور ۰/۰۶ به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

بوته گوجه‌فرنگی دارای مقادیر قابل توجهی از مواد مغذی به‌ویژه پروتئین خام است که می‌تواند بخشی از علوفه مورد نیاز دام را تأمین نماید. مقادیر بالاتر بخش سریع‌تجزیه ماده خشک و پروتئین خام سیلاژ فرآوری‌شده با تفاله خشک چغندرقد احتمالاً مصرف بهتر این گیاه توسط دام را باعث می‌شود. اما برای رسیدن به همبستگی مناسب بین مقادیر تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک و مشاهده اثرات این یافته بر نشخوارکنندگان نیاز به پژوهش‌های بیشتری با استفاده از

در این پژوهش میانگین تجزیه‌پذیری مؤثر برای نرخ‌های عبور ۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۰۸ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری علوفه‌ها تحت تأثیر ترکیب شیمیایی، سهم بافت‌های مختلف گیاهی، ساختار دیواره سلولی و نوع ارتباط سلولز و همی‌سلولز قرار دارد. تجزیه‌پذیری ماده خشک همچنین تحت تأثیر عوامل حیوانی (کاهش اندازه ذرات در مراحل نشخوار، فعالیت میکروبی و شرایط محیط شکمبه) نیز قرار می‌گیرد (۱۴). همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، بخش سریع‌تجزیه پروتئین خام سیلاژ عمل‌آوری‌شده با سطح ۸ درصد تفاله خشک چغندرقد (۰/۴۸۹٪) به‌طور معنی‌داری بیشتر از دو گیاه دیگر بود. بنابراین انتظار می‌رود که پروتئین حقیقی و پروتئین عبوری دو تیمار دیگر بیشتر باشد. مقادیر مشخصی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند تانن در برخی علوفه‌ها از تجزیه سریع پروتئین در شکمبه جلوگیری می‌کنند و بدین ترتیب بازدهی مصرف پروتئین در حیوان افزایش خواهد یافت (۱۴). تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P > 0.05$). بخش سریع‌تجزیه، کندتجزیه و

جدول ۵- فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک، پروتئین و دیواره سلولی سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی فراوری شده با سطوح مختلف تفاله خشک چغندرقد

Table 5- *In situ* degradation parameters of DM, CP and NDF for dry tomato plant and Silage mixed with different levels of dry sugar beet pulp. (%)

سیلاژ بوته گوجه‌فرنگی				
Tomato plant silages				
خطای استاندارد	۸٪ تفاله خشک چغندرقد	۴٪ تفاله خشک چغندرقد	۰٪ تفاله خشک چغندرقد	فراسنجه‌ها
SEM	8%Dried beet pulp	4%Dried beet pulp	0%Dried beet pulp	Parameters
ماده خشک				
DM				
0.940	25.12 ^a	20.57 ^b	21.69 ^b	بخش سریع تجزیه (a)
0.136	43.11 ^a	45.15 ^a	44.97 ^a	بخش کند تجزیه (b)
0.001	0.097 ^a	0.067 ^b	0.069 ^b	نرخ تجزیه بخش b به ازای هر ساعت (c)
1.136	68.24	65.73	66.74	*d= a+b
تجزیه پذیری مؤثر (ED)				
1.706	56.61	52.35	51.71	0.02
2.28	48.3	43.9	41.0	0.04
2.642	42.22	38.26	34.65	0.06
پروتئین خام				
CP				
0.0022	0.489 ^a	0.457 ^b	0.414 ^c	بخش سریع تجزیه (a)
0.0033	0.393 ^b	0.401 ^b	0.441 ^a	بخش کند تجزیه (b)
0.0005	0.069 ^a	0.66 ^b	0.059 ^c	نرخ تجزیه بخش b به ازای هر ساعت (c)
0.005	0.883 ^a	0.876 ^a	0.856 ^b	d= a+b*
تجزیه پذیری مؤثر (ED)				
0.0221	0.685	0.639	0.710	0.02
0.352	0.560	0.510	0.606	0.04
0.0442	0.474	0.424	0.535	0.06
دیواره سلولی				
NDF				
0.0002	0.35 ^a	0.22 ^b	0.034 ^a	بخش سریع تجزیه (a)
0.0003	0.411 ^a	0.409 ^b	0.410 ^a	بخش کند تجزیه (b)
0.0002	0.52 ^c	0.59 ^a	0.53 ^b	نرخ تجزیه بخش b به ازای هر ساعت (c)
0.0005	0.446 ^a	0.431 ^b	0.445 ^a	d= a+b*
تجزیه پذیری مؤثر (ED)				
0.0019	0.332	0.323	0.327	0.02
0.0029	0.252	0.258	0.259	0.04
0.0005	0.207 ^b	0.215 ^a	0.209 ^a	0.06

* a, soluble fraction (%); b, degradable but insoluble fraction (%); c, rate constant (per h) of degradation of fraction b; d=a+b, the potential degradable fraction (%); and ED, effective degradability calculated with a passage rates (k) of 0.02, 0.04, and 0.06 per h.

منابع

- 1- Al-Rwidah, M. N. 1989. The consequences of ensiling grass with absorbent materials. DissAbstr. Int. B Sci. Eng. 49(10):4079B(Abstr).
- 2- Anonymous. 2014, Iranian Agricultural Statistics. Cropping Season 2011-2012. Volume 1. Ministry of Agriculture Jihad. Tehran, Iran. (In Persian).
- 3- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- 4- Arosemena, A., E. J. DePeters, and J.G. Fadel. 1995. Extent of variability in nutrient composition within selected by-product feedstuffs. Anim. Feed Sci. Technol. 54:103-120.
- 5- Ben Salem, H. and T. Smith. 2008. Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. Small Rumin. Res. 77:174-194.
- 6- Borrell, B. 2009. How to grow a better tomato: The case against heirloom

tomatoes.<http://www.scientificamerican.com/article/case-against-heirloom-tomatoes/>

- 7- Cummins, B., P. O'Kiely, M. G. Keane, and D. A. Kenny. 2007. Conservation characteristics of grass and dry sugar beet pulp co-ensiled after different degrees of mixing. *J. Agric. Food Res.* 46:181-193.
- 8- DePeters, E. J., J. G. Fadel, and A. Arosemena. 1997. Digestion kinetics of neutral detergent fiber and chemical composition within some selected by-product feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:127-140.
- 9- Durmic, Z., P. Hutton, D. K. Revell, J. Emms, S. Hughes, and P. E. Vercoe. 2010. In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160:98-109.
- 10- El-Waziry, A. M., F. Alkoik, A. I. Khalil, H. Metwally, and M. A. Al-Mahasneh. 2013. Evaluation of tomato and Cucumber Wastes as Alternative Feeds for ruminants using Gas production technique in vitro. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 8(6):821-826.
- 11- FAO Statistics, 2011. HTML Accessed Apr. 2012. <http://www.fao.org/>.
- 12- Fazaeli, H., M. Zahedifar, and H. Nouroozian. 2006. Chemical composition and ensiling of domask rose extraction residue with different additives. *Pajouhesh&Sazandegi.* 72:58-65. (In Persian with English abstract).
- 13- France, J., J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, and A. Bannink. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* 83:143-150.
- 14- Givens, D. I., E. Owen, R. F. E. Axford, and H. M. Omed. 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Press.
- 15- Grasser, L. A., J. O. Fadel, I. Garnett, and E. J. Depeters. 1995. Quantity and Economic Importance of Nine Selected By-products Used in California Dairy Rations. *J. Dairy. Sci.* 78:962-971.
- 16- Jahani-Azizabadi, H., M. DaneshMesgaran, A. R. Vakili, K. Rezayazdi, and M. Hashemi. 2011. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. *African J. Microb. Res.* 5(27):4812-4819.
- 17- Kamali, A., 2009. Determine the nutritional value of tomato plants with different ratios of molasses and its application in feeding goat fattening. Pages 120-125. in *The 4th In. Conf. New Ideas in Agric. proc. Islamic Azad Uni. Khorasgan, Isfahan.*
- 18- Khodaverdi, R., A. A. Naserian, A. Ebrahimi, M. Talebi, and M. Rahati. 2014. Determination of chemical composition and gas production of dried or ensiled tomato shoot. Pages 140-151. in *The 1st In. Conf. New Ideas in Agric. proc. Islamic Azad Uni. Khorasgan, Isfahan.*
- 19- Kordi, M., and A. A. Naserian. 2012. Influence of wheat bran as a silage additive on chemical composition, in situ degradability and in vitro gas production of citrus pulp silage. *African. J. Biotec.* 11(63):12669-12674.
- 20- Kumara Mahipala, M. B. P., G. L. Krebs, P. McCafferty, and L. H. P. Gunaratne. 2009. Chemical composition, biological affects of tannin and in vitro nutritive value of selected browse species grown in the West Australian Mediterranean environment. *Animal Feed Science and Technology*, 153(3):203-215.
- 21- Masuda, Y., S. Kondo, M. Shimojo, and I. Goto. 1999. Effect of sugar-beet pulp supplementation on fiber degradation of grass hay in the rumen of goats. *Journal of Animal Science*, 12: 186-188.
- 22- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The biochemistry of silage.* 2nd ed., Chalcombe publications, Marlow, UK.
- 23- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43:99-109.
- 24- Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28:7-55.
- 25- Norman, H. C., C. Freind, D. G. Masters, A. J. Rintoul, R. A. Dynes, and I. H. Williams. 2004. Variation within and between two saltbush species in plant composition and subsequent selection by sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55:999-1007.
- 26- Norton, B. W. 2003. The nutritive value of tree legumes. In: *Forage tree legumes in tropical agriculture* (Ed. R.C. Gutteridge and H.M. Shelton) pp.1-10. Available in website: <http://www.fao.org/ag/agP/agpc/doc/Publicat/Guttshel/x5556e0j.htm>.
- 27- Razzaghi, A., R. Valizadeh. Chemical composition, degradability and gas production halophytes (*Atriplex canescens*, *Salsolarigida*, *Aeluropuslittoralis*). 2013. *Journal of Animal Science, the researcher-Iran. Develop.* 7:1-11.
- 28- Rowghani, E., M. J. Zamiri, and A. R. Seradj. 2008. The chemical composition, rumen degradability, in vitro gas production, energy content and digestibility of olive cake ensiled with additives. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9:213-221.
- 29- Tahseen, O, J. Abdallah, J. A. Omar. 2014. In situ degradability of dry matter, crude protein, acid and neutral detergent fiber of olive cake and greenhouse wastes of tomato and cucumber. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 165:93-98.
- 30- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production

method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.

- 31- Towhidi, A., T. Saberifar, and E. Dirandeh. 2011. Nutritive value of some herbage for dromedary camels in the central arid zone of Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 43:617-622.
- 32- Van Soest. P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
- 33- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, and E. C. Titgemeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, 76:2717-2729.
- 34- Ventura, M. R., M. C. Pieltain, and J. I. R. Castanon. 2009. Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*, 154:271-275.
- 35- Zobdeh, M. R., S. A. Mousavi, and H. Fazaeli. 2007. Utilization of potato tops in the diet of finishing lambs. Pages 240-241 in *International Trop. Anim. Nut. Conf. proc.* National Dairy Research Institute, Karnal, India.



Determining Chemical Composition and Nutritional Value of Tomato Shoot Silage Supplemented with Different levels of Beet Pulp by Using Nylon Bag and *in vitro* Gas Production Method

A. Naserian^{1*} - R. Khodaverdi² - R. Valizadeh¹ - A. Tahmasbi¹

Received: 24-08-2014

Accepted: 13-10-2015

Introduction The processed crop by-products can be used as a suitable feedstuff to meet livestock dietary requirements. Tomato shoots that left on the field surface after harvest, is a major valuable by-product. In Iran, the estimated annual tomato shoots production is about 100 million ton. We evaluated the nutritional value of ensiled tomato shoots processed by beet pulp as a fermentation enhancer.

Materials and Methods Tomato shoots were collected from tomato farms in Semnan, Iran. The shoots were ensiled with 0, 4 or 8% (W/W) air-dried beet pulp. After 60 days, the silos were opened and ensiled materials were evaluated for sensitive characteristics as well as pH. The ensiled samples were also analyzed for chemical composition after 48 h oven drying at 60° C. Rumen degradability and fermentation characteristics were measured by using a nylon bag method and an *in vitro* gas production technique, respectively. For *in vitro* gas production technique, 200 mg of dry matter was incubated for 96 h at 39° C. Cumulative gas volumes were recorded 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after incubation. To estimate the gas production parameters, an exponential model was fitted for data. Rumen degradability parameters of dry matter (DM), crude protein (CP) and neutral detergent fiber (NDF) were determined by incubation of 5 g sample for 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 or 96 h in the rumen of a fistulated steer. Similar analysis and measurements were also performed for oven dried tomato shoot samples. All data were subjected to ANOVA using the GLM procedure of SAS and means were compared by using Duncan's multiple range test at 5% probability level.

Results and Discussion At the end of fruit harvest, the measured DM and CP content of tomato shoot samples were 26 and 14% respectively that are in agreement with previous reports. Ensiled tomato shoots had a significant higher content of CP than oven-dried shoots; more likely due to losses of soluble components during the ensiling process. However, the content of CP was decreased with increase in beet pulp level in the tomato shoot silage. Similarly, the tomato shoot silages with 4 or 8% beet pulp showed lower values of NDF and ADF in comparison with tomato shoot silage without beet pulp. Due to lower protein and fiber percentage of beet pulp, the decreases in CP, ADF and ADF contents of tomato shoot silages by adding beet pulp were expected. Although the potential of gas production was enhanced by increased levels of beet pulp in the silages, no significant difference was observed among tomato shoot silages. The silages were also similar for gas production parameters. However, cumulative volumes of gas produced at 96 h incubation for silages with 4 and 8% beet pulp were significantly higher than other treatment. The highest values of rapidly degradable DM, degradation rate constant and degradation potential were observed in tomato shoot silage supplemented with 8% beet pulp. However, there was no significant difference between tomato shoot silages with 4% beet pulp and without beet pulp supplementation.

Conclusions Tomato shoots are a suitable source of nutrient for ruminant. Our results indicated that ensiling increases nutritional value of tomato shoots. The *in vitro* rumen fermentation characteristics as well as rumen degradability of tomato shoot silages were improved by adding 8% beet pulp. However, future studies are needed to confirm these results and elucidate the potential use of tomato shoot silage in ruminant's diet.

Keywords: Chemical composition, Degradability, Gas production, Tomato shoot silage

1 and 2- Professor and MSc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively

(*- Corresponding author email: naserian@ferdowsi.um.ac.ir)

بررسی تاثیر pH و اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

سیدعلیرضا وکیلی^{۱*} - سارا ساکی^۲ - محسن دانش مسگران^۳ - فرشته علی‌پور^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۹

چکیده

هدف این پژوهش بررسی تاثیر pH و اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی بود. چهار پایه خوراکی شامل: ۱۰۰ درصد علف خشک یونجه، ۱۰۰ درصد کنسانتره (جو) و مخلوط‌های علف خشک یونجه و کنسانتره به نسبت ۸۰ به ۲۰ و ۶۰ به ۴۰ درصد به‌صورت دو آزمایش در شرایط برون‌تنی به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت انجام شد. در آزمایش اول، مقادیر صفر، ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر از اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس به محیط کشت اضافه شد و در pH‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. pH ابتدای انکوباسیون به pH=۵، pH=۶ و pH=۷ رسید. بیشترین میانگین گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر در تیمار حاوی یونجه با اسانس اکالیپتوس در pH=۷ و کمترین آن در تیمار ۶۰ به ۴۰ درصد با اسانس کاج در pH=۶ مشاهده شد. در آزمایش دوم همان شرایط آزمایش نخست اما در ۲۴ ساعت انکوباسیون برای بررسی تاثیر آن‌ها بر pH محیط کشت، غلظت نیتروژن آمونیاکی و نسبت ناپدید شدن ماده خشک بود. کمترین pH محیط کشت در انتهای انکوباسیون به تیمار ۶۰ درصد کنسانتره با اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس در pH=۶ و بیشترین آن به یونجه با اسانس کاج در pH=۷ بود. کمترین غلظت نیتروژن آمونیاکی به تیمار یونجه با اسانس کاج در pH=۷ و بیشترین آن به تیمار ۸۰ درصد کنسانتره با اسانس رازیانه در pH=۷ بود. کمترین نسبت ناپدید شدن ماده خشک در تیمار یونجه با اسانس کاج در pH=۷ بود. به نظر می‌رسد آزمایشات بیشتر جهت بررسی تاثیر اسانس‌های طبیعی بر تخمیر شکمبه‌ای ضروری باشد.

واژه‌های کلیدی: اسیدیته، اکالیپتوس، تخمیر شکمبه‌ای، رازیانه، کاج

مقدمه

دهه گذشته استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد (مانند مونتازین، لازالوسید و غیره) کاهش یافته است زیرا سازگاری میکروبی با این افزودنی‌ها برای حیوانات میزبان وجود دارد. این باعث شد تا بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته منع مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را در تغذیه دام فراهم کنند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد (مانند مونتازین، لازالوسید و غیره) علاوه بر اینکه سبب افزایش دفع آمونیاک و متان به محیط و کاهش بازده استفاده از مواد مغذی می‌شود، هزینه‌های تولید را نیز افزایش خواهد داد (۲). اخیراً استفاده از برخی آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد به دلیل باقی ماندن در گوشت و شیر دام، همچنین به علت داشتن اثرات سمی و سرطان‌زا محدود، در مواردی مردود و ممنوع شده است. در نتیجه استفاده از افزودنی‌های طبیعی خوراکی در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته تسریع شده است (۴). پس از اعلام ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در اتحادیه اروپا، پژوهشگران به دنبال یافتن جایگزینی طبیعی برای آن‌ها، مطالعاتی را در شرایط برون‌تنی درباره اثرات اسانس‌های گیاهی

سالهاست متخصصین تغذیه دام به دنبال تغییر در جمعیت و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه به منظور بهبود بازده استفاده از پروتئین و انرژی و کاهش دفع مواد آلاینده محیط زیست می‌باشند. این هدف تا حد زیادی با تنظیم جیره غذایی مناسب و استفاده از مواد افزودنی که سبب تحریک فعالیت جمعیت خاصی از میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌شود، حاصل شده است (۱). در چند

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: savakili@um.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

حاصل از آزمون تولید گاز که شامل: a (بخش سریع التخمیر) و b (بخش با پتانسیل تجزیه پذیری) بود و تا ساعت ۷۲ ادامه داشت، استفاده گردید.

مرحله دوم آزمایش شامل انکوباسیون ۴ جیره پایه خوراکی؛ ۱۰۰ درصد علف خشک یونجه، ۱۰۰ درصد کنسانتره (جو)، مخلوط کنسانتره و علف خشک یونجه با سطوح ۸۰ به ۲۰ و ۶۰ به ۴۰ درصد کنسانتره به یونجه خشک با مقادیر صفر، ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر از اسانس های کاج، اکالیپتوس و رازیانه (۱۰ و ۲۳) با ۳۰ میلی لیتر مخلوط مایع شکمبه-بافر به مدت ۲۴ ساعت و اندازه گیری pH محیط کشت آنها، نیتروژن آمونیاکی و نسبت ناپدید شدن ماده خشک با استفاده از روش کشت ثابت بود. به منظور تعیین میزان گاز تولیدی از ظرف های شیشه ای ۱۰۰ میلی لیتری و بر اساس روش منک و استینگاس (۱۷) استفاده شد. مواد خوراکی استفاده شده در آزمایش شامل یونجه خشک، کنسانتره (جو) و نسبت های مختلف کنسانتره به یونجه خشک ۸۰:۲۰ و ۶۰:۴۰ بود. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- تیمار شاهد (هر پایه خوراکی استفاده شده بدون افزودنی)، ۲- تیمار شاهد به علاوه اسانس رازیانه در مقادیر ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر در ۳۰ میلی لیتر مایع شکمبه-بافر در ۴ پایه خوراکی، ۳- تیمار شاهد به علاوه اسانس کاج در مقادیر ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر در ۳۰ میلی لیتر مایع-بافر در ۴ پایه خوراکی و ۴- تیمار شاهد به علاوه اسانس اکالیپتوس در مقادیر ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر در ۳۰ میلی لیتر مایع شکمبه-بافر در ۴ پایه خوراکی بود.

به منظور انجام آزمایشات برون تنی ابتدا خوراک ها به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد خشک شد و از آسیاب دارای الک ۱ میلی متری استفاده شد. سپس ۲۰۰ میلی گرم از هر خوراک داخل هر ظرف ریخته شد و به هر ظرف ۳ و ۳۰ میکرو لیتر به ازای هر گرم ماده خشک خوراک های کشت شده، اسانس گیاهان مورد استفاده در این مطالعه افزوده شد (۳ تکرار برای هر تیمار). مایع شکمبه قبل از خوراک صبحگاهی از دو بره نر فیستولا گذاری شده تغذیه شده با جیره حاوی ۴۵ درصد یونجه خشک و ۵۵ درصد مواد متراکم گرفته شد و با پارچه متقال چهار لایه صاف گردید. مایع شکمبه صاف شده به نسبت ۲:۱ با بافر مصنوعی مخلوط شد (الیورا، ۱۹۹۸) و سپس به هر ظرف ۳۰ میلی لیتر مخلوط مایع-بافر افزوده و ظرف ها در حمام آب گرم (۳۸/۶ درجه سانتی گراد) قرار داده شدند و تولید گاز در ساعت های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه گیری شد. از برخی سرنگ ها برای برآورد نیتروژن آمونیاکی و pH و DMD تا ساعت ۲۴ استفاده شد. حجم گاز تولیدی تا ۷۲ ساعت برای برآورد پارامترهای تجزیه پذیری a و b ثبت گردید. به منظور تعیین فراسنجه های تولید گاز از معادله $P = b(1 - e^{-ct})$ استفاده شد. در این معادله b: بخش با پتانسیل تجزیه پذیری، c: ثابت

بر تخمیر شکمبه ای انجام دادند (۳). اسانس ها ترکیباتی معطر، فرار و روغنی هستند که از گیاهان استخراج می شوند (۵) و دارای خواص ضد میکروبی علیه بسیاری از باکتری ها، مخمرها و قارچ ها می باشند (۶). به علت اینکه اسانس های گیاهی خصوصیات ضد میکروبی قوی دارند از آن ها به عنوان افزودنی در تغذیه دام استفاده می شود. اهداف این مطالعه بررسی اثر برخی اسانس های گیاهی و pH بر فراسنجه های تخمیر شکمبه ای با منابع خوراکی متفاوت در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش ها

اسانس گیری

در این پژوهش از اسانس رازیانه (*Foeniculu vulgare*)، اکالیپتوس با (*Eucalyptus camaldulensis*) و کاج (*Pinus pumilio*) استفاده شد. جهت اسانس گیری از دانه های کاج و رازیانه و برگ گیاه اکالیپتوس استفاده شد. جهت استخراج اسانس از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب استفاده گردید. بدین منظور در بالن های شیشه ای یک لیتری از نمونه ها (دانه های کاج و رازیانه کوبیده شد و برگ اکالیپتوس آسیاب گردید) به میزان ۷۰ گرم استفاده گردید و ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر به هر بالن اضافه شد. بالن های حاوی نمونه و آب مقطر به لوله های شیشه ای مبرد متصل به هیتر با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. گرمادهی به مدت ۴ ساعت برای انجام تبخیر محتویات داخل بالن ها انجام شد. اسانس های هریک از نمونه ها که بر روی آب سرد شده ی حاصل از انجام عمل تبخیر جمع شده بود استخراج گردید. در نهایت هر یک از اسانس ها در ظروف شیشه ای تیره تا زمان مصرف در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آزمایشات برون تنی

مرحله اول آزمایش شامل انکوباسیون ۴ جیره پایه خوراکی؛ ۱۰۰ درصد علف خشک یونجه (ماده آلی، پروتئین خام و بخش های فیبری به ترتیب ۸۸/۹۲، ۱۵/۶۲ و ۱۶/۴۸)، ۱۰۰ درصد کنسانتره (جو) (ماده آلی، پروتئین خام و بخش های فیبری کنسانتره به ترتیب ۹۷/۰۶، ۲۶/۰۵ و ۱۲/۴۳)، مخلوط کنسانتره و علف خشک یونجه با سطوح ۸۰ به ۲۰ و ۶۰ به ۴۰ درصد کنسانتره به یونجه خشک با مقادیر صفر، ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر از اسانس های کاج، اکالیپتوس و رازیانه به علاوه ۳۰ میلی لیتر مخلوط مایع شکمبه-بافر به مدت ۷۲ ساعت در pH های مختلف (pH=۵، pH=۶ و pH=۷) بود (۱۰ و ۲۳). pH ها در ابتدای انکوباسیون با استفاده از NaOH و HCl در سطوح مورد نظر تنظیم شدند (۱۳ و ۲۰)، برای بررسی اثرهمزمان مقادیر متفاوت اسانس ها و اثر pH های مختلف بر بخش های مختلف تخمیری

نرخ تولید گاز در ساعت، t: زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P: میزان گاز تولیدی در زمان مورد نظر می‌باشد.

مدل آماری

داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش توسط نرم‌افزار (2002) SAS با رویه ANOVA در قالب یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند که مدل آماری طرح به قرار زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این مدل Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار و e_{ij} خطای آزمایش است. برای مقایسه تیمارهای آزمایشی از آزمون دانت ($P < 0.05$) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج افزودن اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس در مقادیر ۳ و ۳۰ میکرولیتر در ۳۰ میلی‌لیتر مایع-بافر را بر تولید گاز نمونه‌های خوراکی مختلف در جدول ۱ تا ۳ نشان داده شده است. نتایج این آزمایش نشان داد در pH=۵ آزمایش تمامی اسانس‌های استفاده شده، بخش قابل تخمیر (b) را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند ($P < 0.05$). همچنین در پایه‌های خوراکی ۸۰ درصد کنسانتره به ۲۰ درصد علوفه، ثابت نرخ تولید گاز به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$)، در حالی که در منبع خوراکی یونجه ثابت نرخ تولید گاز کاهش یافت. علت آن می‌تواند مربوط به این موضوع باشد که در pH=۵ شرایط برای فعالیت برخی باکتری‌ها نامساعدتر گردیده و در نتیجه میزان فعالیت تخمیری این باکتری‌ها در pH مذکور کاهش یافته است. در پایه خوراکی ۶۰ درصد کنسانتره به ۴۰ درصد علوفه هیچ‌یک از اسانس‌ها بر ثابت نرخ تولید گاز اثر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$).

در pH=۶ آزمایش، تنها در پایه خوراکی یونجه تمامی اسانس‌ها، تولید گاز از بخش قابل تخمیر را افزایش دادند ($P < 0.05$)، اما ثابت نرخ تولید گاز تحت تاثیر اسانس‌ها قرار نگرفت ($P > 0.05$).

در pH=۷ آزمایش در پایه خوراکی یونجه، تنها اسانس اکالیپتوس موجب افزایش معنی‌دار تولید گاز از بخش قابل تخمیر شد ($P < 0.05$). سطوح مختلف اسانس‌های رازیانه و اکالیپتوس ثابت نرخ تولید گاز را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش دادند، همچنین مقدار ۳ میکرولیتر اسانس کاج موجب افزایش معنی‌دار ثابت نرخ تولید گاز شد ($P < 0.05$). در جیره بر پایه کنسانتره، اسانس کاج موجب کاهش معنی‌دار گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر شد ($P < 0.05$). مقدار ۳ میکرولیتر اسانس‌های کاج و اکالیپتوس ثابت نرخ تولید گاز را به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش دادند. در نسبت ۸۰ درصد کنسانتره به ۲۰ درصد علوفه، اسانس کاج موجب کاهش

معنی‌دار گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر شد ($P < 0.05$). همچنین مقدار ۳ میکرولیتر ثابت نرخ تولید گاز را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). در پایه خوراکی نسبت ۶۰ درصد کنسانتره به ۴۰ درصد علوفه مقدار ۳ میکرولیتر اسانس‌های کاج و رازیانه و مقدار ۳۰ میکرولیتر اکالیپتوس گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند ($P < 0.05$). مقدار ۳ میکرولیتر اسانس کاج ثابت نرخ تولید گاز را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). در حالی که مقدار ۳ میکرولیتر اکالیپتوس ثابت نرخ تولید گاز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$).

استفاده از مقادیر مختلف اسانس در اغلب موارد نتیجه متفاوتی داشت به‌طوری‌که غلظت بالاتر هریک از افزودنی‌ها تولید گاز را بیشتر کاهش داد. کاهش تولید گاز احتمالاً بیانگر تاثیر این مواد طبیعی بر فعالیت میکروبی شکمه است. اسانس‌های کاج و اکالیپتوس در pH=۵ و pH=۶ گاز تولیدی را نسبت به شاهد کاهش دادند. به‌طوری‌که در pH=۵ تمامی اسانس‌ها در پایه خوراکی کنسانتره و نیز نسبت ۶۰ به ۴۰ درصد کنسانتره به علوفه، غلظت ۳۰ میکرولیتر کاهش گاز تولیدی را به همراه داشت. به‌علاوه در پایه خوراکی با نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد کنسانتره به علوفه هر دو غلظت اسانس رازیانه و اکالیپتوس و غلظت ۳۰ میکرولیتر اسانس کاج، گاز تولیدی را کاهش دادند.

در pH=۶ غلظت‌های ۳ و ۳۰ میکرولیتر اسانس‌های کاج و اکالیپتوس و ۳۰ میکرولیتر رازیانه در پایه ۶۰ به ۴۰ درصد کنسانتره به علوفه و نیز ۳۰ میکرولیتر اکالیپتوس در نسبت ۸۰ به ۲۰ درصد کنسانتره به علوفه موجب کاهش تولید گاز شدند. اما در pH=۷ غلظت ۳۰ میکرولیتر رازیانه و ۳ و ۳۰ اکالیپتوس در پایه یونجه، غلظت ۳ میکرولیتر کاج در کنسانتره، مقدار ۳۰ میکرولیتر کاج در نسبت ۸۰ به ۲۰ کنسانتره به علوفه و همچنین در نسبت ۶۰ به ۴۰ کنسانتره به علوفه مقدار ۳۰ میکرولیتر اسانس‌های کاج و اکالیپتوس و نیز ۳ میکرولیتر رازیانه، منجر به افزایش تولید گاز شدند.

از آنجایی که مقدار گاز تولید شده از یک خوراک شاخصی از قابلیت تخمیر آن خوراک و در نتیجه ارزش انرژی‌زایی آن خوراک می‌باشد، لذا ممکن است چنین استنباط شود که اسانس‌هایی همچون کاج و اکالیپتوس در pH=۵ و pH=۶ که موجب کاهش تولید گاز و متعاقباً کاهش تخمیر خوراک می‌شوند، جهت تعدیل فرآیند تخمیر در شکمه مناسب نمی‌باشند، ولی در pH=۷ می‌توانند موثر باشند. نتایج این آزمایش نشان داد که در pH=۷ میزان گاز تولیدی نسبت به سایر pHها افزایش یافته است. دلیل این افزایش را احتمالاً می‌توان شرایط مساعدتر فعالیت برخی از باکتری‌ها و افزایش فعالیت تخمیری آن‌ها دانست.

جدول ۱- اثر افزودن اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر بخش قابل تخمیر تولید گاز (b) (میلی‌لیتر بر گرم ماده آلی) در جیره‌های مختلف در pH=5^۱
Table1- The effect of adding essential oils, fennel, pine and eucalyptus on fermentable portion of gas production (b) (ml/g OM) in various diets in pH=5¹

		اسانس‌ها (میکرولیتتر)						SEM ^۲
		Essential oils						
t		رازیانه		کاج		اکالیپتوس		
		<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Pinups pumilio</i>		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>		
جیره‌های پایه	شاهد	3	30	3	30	3	30	
Basic diets	Control							
یونجه خشک	27.28 ^{ab}	30.3 ^a	27.36 ^{ab}	30.15 ^a	21.34 ^b	26.97 ^{ab}	29.29 ^{ab}	
Alfalfa hay								
جو	92.66 ^a	93.21 ^a	30.71 ^b	82.98 ^a	25.73 ^b	95.30 ^a	25.65 ^b	
Barley grain								
80:20	79 ^a	62.51 ^b	30.73 ^c	72.24 ^{ab}	27.48 ^c	62.36 ^b	27.63 ^c	
60:40	57 ^a	50.53 ^a	29.54 ^b	54.88 ^a	33.21 ^b	51.44 ^a	25.27 ^b	

۱- حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

۲- میانگین خطای استاندارد

۳- b: بخش قابل تخمیر تولید گاز

۴- 80:20: ۸۰ درصد دانه جو به ۲۰ درصد علف خشک یونجه

۵- 60:40: ۶۰ درصد دانه جو به ۴۰ درصد علف خشک یونجه

1- Means with different superscript letters in row are significantly different ($P < 0.05$).

2- SEM: Standard error of the means

3- b: Fermentable portions of gas production of gas production (ml/g OM)

4- 80: 20, 80% Barley grain to 20% alfalfa hay

5- 60:40, 60% Barley grain to 40% alfalfa hay

جدول ۲- اثر افزودن اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر بخش قابل تخمیر تولید گاز (b) (میلی‌لیتر بر گرم ماده آلی) در جیره‌های مختلف در pH=6^۱
Table 2- The effect of adding essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentable portion of gas production (b) (ml/g OM) in various diets in pH =6¹

		اسانس ها (میکرولیتر)						
		Essential oils						
t		راز یانه		کاج		اکالیپتوس		
		Foeniculum vulgare		Pinups pumili		Eucalyptus camaldulensis		
جیره های پایه	شاهد	3	30	3	30	3	30	SEM ^۲
Basic diets	Control							
علف								
خشک یونجه	11.9	17.14	14.81	13.36	13	12.02	12.68	1.75
Alfalfa hay								
دانه جو	13.49	10.09	10.77	12.73	12.43	11.58	11.42	1.38
Barley grain								
80:20	36 ^a	20.45 ^{ab}	20.02 ^{ab}	30.62 ^a	23.17 ^{ab}	26.33 ^{ab}	11.36 ^b	4.75
60:40	17.33 ^a	13.51 ^{ab}	7.14 ^c	7.32 ^c	6.10 ^c	9.46 ^{bc}	7.85 ^c	1.50

۱- حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

۲- میانگین خطای استاندارد

۳- b: بخش قابل تخمیر تولید گاز

۴- 80:20: ۸۰ درصد دانه جو به ۲۰ درصد علف خشک یونجه

۵- 60:40: ۶۰ درصد دانه جو به ۴۰ درصد علف خشک یونجه

1- Means with different superscript letters in row are significantly different ($P < 0.05$).

2- SEM: Standard error of the means

3- b: Fermentable portions of gas production of gas production (ml/g OM)

4- 80: 20, 80% Barley grain to 20% alfalfa hay

5- 60:40, 60% Barley grain to 40% alfalfa hay

جدول ۳- اثر افزودن اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر بخش قابل تخمیر تولید گاز (میلی لیتر بر گرم ماده آلی) در جیره‌های مختلف در pH=7^۱

Table 3-The effect of adding essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentable portion of gas production (b) (ml/g OM) in various diets in PH = 7¹

		اسانس‌ها (میکرولیتر) Essential oils						
t		رازیانه <i>Foeniculum vulgare</i>		کاج <i>Pinups pumilio</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensis</i>		SEM ^۲
		3	30	3	30	3	30	
جیره‌های پایه Basic diets	شاهد Control							
علف خشک یونجه Alfalfa hay	46.73 ^c	60.34 ^{bc}	63.83 ^b	47.41 ^c	56.78 ^{bc}	99.27 ^a	101.35 ^a	4.51
دانه جو Barley grain	76.89 ^{ab}	73.21 ^{ab}	84.73 ^a	41.19 ^c	85.54 ^a	60.09 ^b	92.34 ^a	6.23
80:20	68.65 ^{ab}	73.86 ^{ab}	33 ^{abc}	57.43 ^{bc}	42.83 ^c	82.83 ^a	75.84 ^{ab}	7.04
60:40	57.87 ^c	82.15 ^{ab}	63.09 ^{bc}	58 ^c	99.21 ^a	64.72 ^{bc}	101.29 ^a	6.76

۱- حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

۲- میانگین خطای استاندارد

۳- b: بخش قابل تخمیر تولید گاز

۴- 80:20: ۸۰ درصد دانه جو به ۲۰ درصد علف خشک یونجه

۵- 60:40: ۶۰ درصد دانه جو به ۴۰ درصد علف خشک یونجه

1- Means with different superscript letters in row are significantly different ($P < 0.05$).

2- SEM: Standard error of the means

3- b: Fermentable portions of gas production (ml/g OM)

4- 80: 20, 80% Barley grain to 20% alfalfa hay

5- 60:40, 60% Barley grain to 40% alfalfa hay

($P < 0.05$). همچنین تمامی اسانس‌ها ناپدید شدن ماده خشک را کاهش دادند اما این کاهش معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). در نسبت ۶۰ درصد کنسانتره به ۴۰ درصد علوفه نیز اثر معنی‌داری از اسانس‌ها بر pH محیط کشت، غلظت نیتروژن آمونیاکی و ناپدید شدن ماده خشک مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نتایج افزودن اسانس‌های گیاهی رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر pH محیط کشت، نسبت ناپدید شدن ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی نمونه‌های خوراکی در محیط کشت ثابت در pH=۶ در پایه‌های خوراکی مختلف در جداول ۸ تا ۱۱ آمده است. در این pH در پایه خوراکی یونجه اسانس اکالیپتوس در مقدار ۳۰ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت شد. در حالی که اثر رازیانه و کاج بر pH معنی‌دار نبود. همچنین اثر هیچ‌یک از اسانس‌ها بر غلظت نیتروژن آمونیاکی و ناپدید شدن ماده خشک معنی‌دار نبود. در کنسانتره تمامی اسانس‌ها موجب افزایش pH محیط کشت و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و ناپدید شدن ماده خشک شدند ولی اثر آنها معنی‌دار نبود. در نسبت ۸۰ درصد کنسانتره به ۲۰ درصد علوفه مقدار ۳۰ میکرولیتر اسانس رازیانه pH محیط کشت را در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش داد. اسانس کاج غلظت نیتروژن آمونیاکی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$). اسانس

نتایج افزودن اسانس‌های گیاهی رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر pH محیط کشت، نسبت ناپدید شدن ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی نمونه‌های خوراکی در محیط کشت ثابت در pH=۵ در پایه‌های خوراکی مختلف در جداول ۴ تا ۷ آمده است.

در pH=۵ اسانس رازیانه موجب کاهش معنی‌دار pH محیط کشت در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P < 0.05$). مقدار ۳۰ میکرولیتر رازیانه موجب کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید ($P < 0.05$). در حالی که هیچ‌یک از اسانس‌های استفاده شده بر ناپدید شدن ماده خشک اثر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). در کنسانتره مقدار ۳۰ میکرولیتر اسانس‌های رازیانه و کاج موجب افزایش معنی‌دار pH در مقایسه با شاهد شدند ($P < 0.05$), در حالی که مقدار ۳ میکرولیتر اسانس اکالیپتوس pH محیط کشت را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.05$). همچنین هیچ‌یک از اسانس‌ها بر غلظت نیتروژن آمونیاکی اثر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$). تنها اسانس اکالیپتوس در مقدار ۳۰ میکرولیتر موجب کاهش معنی‌دار ناپدید شدن ماده خشک گردید ($P < 0.05$). در نسبت ۸۰ درصد کنسانتره به ۲۰ درصد علوفه، اثر اسانس‌ها بر pH محیط کشت معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اسانس اکالیپتوس در مقدار ۳ میکرولیتر موجب کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با تیمار شاهد شد

اکالیپتوس در هر دو مقدار افزوده شده موجب کاهش معنی‌دار $(P<0/05)$ pH محیط کشت شد. در حالی که مقدار ۳۰ میکرولیتر آن موجب کاهش معنی‌دار غلظت نیتروژن آمونیاکی شد $(P<0/05)$. در نسبت ۶۰ درصد کنسانتره به ۴۰ درصد علوفه اسانس کاج در مقدار ۳ میکرولیتر و اکالیپتوس در مقدار ۳۰ میکرولیتر pH محیط کشت را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند $(P<0/05)$. اسانس رازیانه غلظت نیتروژن آمونیاکی را به‌طور معنی‌داری $(P<0/05)$ کاهش داد. همچنین اسانس‌ها بر روی ناپدید شدن ماده خشک اثر معنی‌داری نداشتند ولی باعث کاهش آن شدند. نتایج افزودن اسانس‌های گیاهی رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر pH محیط کشت، نسبت ناپدید شدن ماده خشک و نیتروژن آمونیاکی نمونه‌های خوراکی در محیط کشت ثابت در $pH=7$ در پایه‌های خوراکی مختلف در جداول ۱۲ تا ۱۵ آمده است. در پایه خوراکی یونجه اسانس رازیانه در مقدار ۳۰ میکرولیتر و کاج در مقدار ۳ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت شد $(P<0/05)$. اسانس رازیانه در هر دو مقدار افزوده شده و کاج در مقدار ۳ میکرولیتر غلظت نیتروژن آمونیاکی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد $(P<0/05)$. همچنین مقدار ۳۰ میکرولیتر رازیانه و اکالیپتوس باعث افزایش معنی‌دار $(P<0/05)$ ناپدید شدن ماده خشک شد. در حالی که اسانس کاج آن را به‌طور معنی‌داری کاهش داد $(P<0/05)$. در منبع خوراکی کنسانتره اسانس‌های رازیانه در مقدار ۳۰ میکرولیتر و کاج در مقدار ۳ میکرولیتر باعث افزایش معنی‌دار pH محیط کشت شدند $(P<0/05)$. اسانس رازیانه موجب افزایش معنی‌دار $(P<0/05)$ غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به شاهد شد در حالی که اسانس‌های کاج و اکالیپتوس غلظت نیتروژن آمونیاکی را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند $(P<0/05)$. همچنین تمامی اسانس‌ها موجب کاهش معنی‌دار ناپدید شدن ماده خشک نسبت به تیمار شاهد شدند $(P<0/05)$. در نسبت خوراکی ۸۰ درصد کنسانتره به ۲۰ درصد علوفه اسانس رازیانه بر روی pH محیط کشت اثر معنی‌داری نداشت. در حالی که اسانس کاج و اکالیپتوس در مقدار ۳ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار $(P<0/05)$ pH محیط کشت شدند. اسانس رازیانه در مقدار ۳ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار $(P<0/05)$ غلظت نیتروژن آمونیاکی شد در حالی که اسانس‌های کاج و اکالیپتوس غلظت نیتروژن آمونیاکی را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش دادند $(P<0/05)$. اسانس رازیانه در مقدار ۳۰ میکرولیتر و اکالیپتوس موجب افزایش معنی‌دار ناپدید شدن ماده خشک شدند $(P<0/05)$. در حالی که اسانس کاج موجب کاهش ناپدید شدن ماده خشک شد. در نسبت خوراکی ۶۰ درصد کنسانتره به ۴۰ درصد علوفه اسانس رازیانه در مقدار ۳۰ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت شد $(P<0/05)$ و ناپدید شدن ماده خشک را نیز به‌طور معنی‌داری $(P<0/05)$ افزایش داد. اسانس کاج موجب افزایش معنی‌دار pH شد $(P<0/05)$. اسانس‌های کاج و اکالیپتوس غلظت نیتروژن آمونیاکی را

به‌طور معنی‌داری $(P<0/05)$ کاهش داد. اسانس اکالیپتوس در مقدار ۳ میکرولیتر موجب افزایش معنی‌دار pH شد $(P<0/05)$. اسانس اکالیپتوس موجب افزایش معنی‌دار ناپدید شدن ماده خشک نسبت به تیمار شاهد شد $(P<0/05)$. در حالی که اثر اسانس کاج بر روی ناپدید شدن ماده خشک معنی‌دار نبود. باسکوئیت و همکاران (۴) گزارش کردند که اسانس بادیان، میخک، زنجبیل، یوکا، چای سبز، پونه کوهی، دارچین، شنبلیله و نیز روغن سیر، سینامالدهید، کارواکرول و ایوجینول در غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر طی کشت ۲۴ ساعته، pH شکمبه را افزایش داد. ایوانز و مارتین (۱۳) گزارش کردند که ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر تیمول، در شرایط آزمایشگاهی pH شکمبه را افزایش داد در حالی که در مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر اثری بر pH شکمبه نداشت. تحقیقات آیاد و همکاران (۱) نیز نشان می‌دهد که با افزودن عصاره‌ی سیر، پیاز و لیمو ترش به جیره‌ی گوساله‌های پرواری، pH شکمبه کاهش یافت. نتایج این آزمایش با نتایج اسپانگرو و همکاران (۲۳) از مشابهت برخوردار است. آن‌ها گزارش کردند که افزودن اسانس‌های پونه، دارچین، آویشن و پوست پرتقال در مقادیر ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۲ میکرولیتر در $pH=7$ ، موجب افزایش مقدار pH در مقایسه با تیمار شاهد شده است. همچنین در $pH=5$ و $pH=6$ این آزمایش در برخی تیمارها کاهش pH محیط کشت مشاهده شد که این با نتایج اسپانگرو و همکاران (۲۳) از مشابهت برخوردار بود. آنها مشاهده کردند با افزودن مخلوطی از اسانس‌های گیاهی در $pH=5/5$ ، pH محیط کشت نسبت به pH اولیه کاهش یافت. کاردوزو و همکاران (۸) و باسکوئیت و همکاران (۶) مشاهده کردند که اسانس‌های ایوجینول، رازیانه و آنتول در $pH=7$ غلظت نیتروژن آمونیاکی را افزایش داد. باسکوئیت و همکاران (۶) با استفاده از یک محیط کشت حاوی مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های شکمبه نشان دادند که روغن سیر و ترکیبات فعال آن (دی‌آلیل سولفید، دی‌آلیل دی‌سولفید و آلیل مرکاپتان) در مقادیر ۳۰، ۳۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، غلظت نیتروژن آمونیاکی را افزایش می‌دهد، در حالی که مقدار ۳۰۰۰ میلی‌گرم آن باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد. این نتایج بیانگر این است که مقادیر بالای اسانس‌ها، اثرات مضر بر تخمیر میکروبی شکمبه دارند، که این فعالیت ضد میکروبی آنها را تأیید می‌کند (۵، ۱۳ و ۲۱). کاستیلجوس (۱۲) بیان کرد که استفاده از تیمول و ایوجینول، وقتی که pH ثابت نگه داشته شود در مقادیر ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بر غلظت نیتروژن آمونیاکی تأثیری نداشت. کاردوزو و همکاران (۸) نشان دادند که افزودن روغن سیر در ۲ ساعت اولیه انکوباسیون، باعث افزایش ۲۳ درصدی در تولید ازت پپتیدی شد که این یا به دلیل تحریک پروتئولیز و یا منع از پروتئولیز است. همچنین بعد از ۸ ساعت، غلظت نیتروژن آمونیاکی ۲۵٪ کاهش یافت که این نشان‌دهنده ممانعت از دی‌آمیناسیون است. با این حال نتایج این آزمایش نتایج کاردوزو و همکاران (۱۰) را تأیید کرد که

گزارش کردند افزودن اسانس‌های رازیانه، ایوجینول و آنتول در مقادیر ۳ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر غلظت نیتروژن آمونیاکی را در $pH=7$ ، افزایش و اسانس‌های دارچین، کاپسایسین، سینامالدهید، یوکا و نیز روغن سیر آن را کاهش داد. در حالی که در $pH=5/5$ ایوجینول موجب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد و دیگر اسانس‌ها آن را کاهش دادند. نتایج این آزمایش با نتایج باسکوئث و همکاران (۵۵) که اسانس‌های پونه و سینامالدهید در مقادیر ۰، ۳، ۳۰، ۳۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر و نیز گروینر و همکاران (۱۵) با مقدار ۴۵/۱ میلی گرم بر لیتر یوکا و نیز ریان و همکاران (۲۲) با ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر یوکا غلظت نیتروژن آمونیاکی را در $pH=7$ کاهش داد، مشابهت دارد اما با نتایج اسپانگرو و همکاران (۲۳) که مشاهده کردند با افزودن اسانس‌های پونه، دارچین، آویشن و پرتقال در هر دو سطح $pH=7$ و $pH=5/5$ غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تاثیر قرار نگرفت مغایرت دارد. آباد و همکاران (۱) گزارش کردند که استفاده از مخلوطی از عصاره‌های سیر، پیاز و لیمو ترش به جیره گوساله‌های پروراری موجب افزایش نسبت ناپدید شدن ماده خشک در شکمبه شد. کاستیلجوس و همکاران (۱۲) با استفاده از سیستم کشت مداوم مشاهده کردند که استفاده از ترکیبی از اسانس‌های گیاهی بر ناپدید شدن ماده خشک

تاثیری نداشت. یانگ و همکاران (۲۵) گزارش کردند که روغن سیر و اسانس سرو کوهی قابلیت هضم ماده خشک را در شکمبه افزایش داد. در این آزمایش در اکثر تیمارها، کاهش در تولید نیتروژن آمونیاکی مشاهده شد. کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت در سایر تیمارهای آزمایشی در این مطالعه احتمالاً به دلیل اثرات ممانعتی اسانس‌های به کار رفته در این مطالعه بر باکتری‌های دارای توان بالای تولید آمونیاک و در نتیجه کاهش دامیناسیون اسیدهای آمینه باشد. ممکن است عدم کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در برخی از تیمارها نسبت به تیمار کنترل نشان‌دهنده کاهش میزان فعالیت پروتئولیز و افزایش فعالیت پپتیدولیز و آمینولیز میکروارگانیسم‌های شکمبه در این تیمارها باشد. نسبت ناپدید شدن ماده خشک نیز در برخی تیمارها، افزایش و در برخی کاهش یافت. این تغییرات بسته به نوع و غلظت اسانس استفاده شده از آن متغیر بود. همچنین در مواردی قابلیت هضم ماده خشک تحت تاثیر اسانس‌ها قرار نگرفت. بیوچمین و مک گین (۲۰۰۶) مشاهده کردند که کاهش تولید گاز به واسطه افزودن اسانس‌ها با ناپدید شدن سوپسترا رابطه نامطلوبی دارد. نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد تولید گاز با ناپدید شدن ماده خشک کاهش یافته است.

جدول ۴- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی یونجه در $pH=5$
Table 4- The effect of adding of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed of hay in $pH=5$

فراسنجه‌های تخمیری		اسانس‌ها (میکرولیتر)						SEM ^۱	P-value
		Essential oils							
		رازیانه		کاج		اکالیپتوس			
		<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Pinups pumili</i>		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>			
شاهد	Control	3	30	3	30	3	30		
اسیدیته pH	5.97 ^{ab}	5.92 ^{abc}	5.89 ^{abc}	5.82 ^{bc}	6 ^a	5.86 ^{abc}	5.76	2.39	0.054
نیتروژن آمونیاکی N-NH3 ^۲	8.06 ^a	7.82 ^a	7.06 ^b	7.72 ^a	7.51 ^{ab}	7.62 ^a	7.58 ^a	2.78	0.232
قابلیت هضم ماده خشک DMD ^۳	43.33	53.33	51.67	45	46.67	51.67	3.92	1.17	1.17

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- احتمال تفاوت معنی‌دار بین تیمارها ($P < 0.05$)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: significant difference probability between treatments ($P < 0.05$)

5- Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

جدول ۵- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی کنسانتره در pH = 5
Table 5- The effect of adding of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed of concentrate in pH = 5.

فراسنجه‌های تخمیری	I	اسانس‌ها (میکرولیتر) Essential oils						SEM	P-value
		رازیانه <i>Foeniculum vulgare</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensis</i>			
		3	30	3	30	3	30		
		شاهد Control							
اسیدیته pH	5.53 ^c	5.47	5.63 ^a	5.51	5.62 ^{ab}	5.39 ^d	5.55	0.020	5.41
نیتروژن آمونیاکی N-NH ₃	6.42 ^b	6.73	6.23	6.40	6.96 ^a	6.80	6.54	0.20	1.37
قابلیت هضم ماده خشک	55 ^a	50	46.67	50	46.67	51.67	45 ^b	2.545	2.36
DMD									

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- احتمال تفاوت معنی‌دار مابین تیمارها (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵).

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)

5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

جدول ۶- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی ۸۰ به ۲۰ کنسانتره به علوفه در pH = 5
Table 6 - The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Base Feed with ratio of concentrate to forage of 80% to 20% in pH = 5

روغن‌های اسانس‌ی (میکرولیت)									
فراسنجه‌های تخمیری	شاهد Contro l	Essential oils						SEM	P-value
		رازیانه		کاج		اکالیپتوس			
		<i>Foeniculum vulgar</i>		<i>Pinups pumili</i>		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>			
		3	30	3	30	3	30		
اسیدیته pH	5.63	5.66	5.58	5.64	5.66	5.75	5.75	0.038	2.93
نیتروژن آمونیاکی N-NH ₃	7.49 ^{ab}	6.87	6.85	7.13	7.81	6.29 ^c	6.90	0.2300	4.11
قابلیت هضم ماده خشک DMD	56.66	46.66	48.33	46	46.66	56.66	51.67	3.469	1.93

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- قابلیت هضم ماده خشک

۴- احتمال تفاوت معنی‌دار بین تیمارها (P < ۰/۰۵)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter digestibility

4- P-value: The significance level

جدول ۷- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی نسبت ۶۰ به ۴۰ کنسانتره به علوفه در pH=۵
Table 7- The effect of adding of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed with ratio concentrate to forage 60% to 40% in pH =5

Effect of essential oils concentration on storage 0.0% to 10.0% in per cent									
فراسنجه‌های تخمیری	شاهد Control	اسانس‌ها (میکرولیتر) Essential oils						SEM	P-value
		رازیانه <i>Foeniculum vulgar</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensis</i>			
		3	30	3	30	3	30		
اسیدیته pH	5.74	5.67	5.71	5.75	5.81	5.70	5.60	0.019	0.133
نیترژن آمونیاکی N-NH3	7.66	7.68	7.51	7.68	6.69	7.38	6.60	0.234	4.79
قابلیت هضم ماده خشک DMD	47	33	31.67	46.67	44	46.67	45	3.928	2.47

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیترژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- احتمال تفاوت معنی‌دار بین تیمارها ($P < 0.05$)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH3: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: The significance level

جدول ۸- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی یونجه در pH =۶
Table 8 - The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Base Feed of hay in pH =6

		اسانس‌ها (میکرولیتر)							
		Essential oils							
		راز یانه		کاج		اکالیپتوس			
شاهد		<i>Foeniculumvulga</i>		<i>Pinups pumili</i>		<i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
فراسنجه‌های تخمیری	Control	3	30	3	30	3	30	SEM	P-value
اسیدیته	4.89 ^{bc}	4.88	4.90	4.89	4.92	4.92	4.93 ^a	0.008	3.5
pH									
نیتروژن آمونیاکی	8.61 ^a	8/32	8/42	7.90 ^b	7.78 ^b	8.10	8.01	0.167	3.86
N-NH3									
قابلیت هضم ماده خشک	35.66	34.5	31.5	34.16	33.16	37.16	36.16	0.69	6.25
DMD									

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیترژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- احتمال تفاوت معنی‌دار بین تیمارها ($P < 0.05$)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH3: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: The significance level

Table 9 -The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed of concentrate in pH =6 (میکرو لیتر)

تخمیری	فراسنجه‌های شاهد	اسانس‌ها (میکرولیتر)						SEM	P-value
		Essential oils							
		رازیانه		کاج		اکالیپتوس			
		<i>Foeniculum vulgare</i>		<i>Pinus pumili</i>		<i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
	Control	3	30	3	30	3	30		
اسیدیته									
pH	4.82	4.83	4.85	4.86	4.83	4.83	4.84	0.015	0.66
نیترژن آمونیاکی									
N-NH ₃	9.53	9.15	9.31	8.87	9.18	89.13	9.22	0.199	1.28
قابلیت هضم ماده خشک									
DMD	51.16	50	49.5	49.5	44.5	48.16	46	1.86	2.74

۲- نیٹروژن آمونیاک،

۲- نیٹروژن آمونیاک،

۳- ناپدیدي ماده خشک

۴- احتمال، تفاوت معنی دار، بین تیمارها ($P < 0.05$)

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: The significance level

جدول ۱۰- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی ۸۰ به ۲۰ کنسانتره به علوفه در pH = ۶

Table10 -The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed with concentrate to forege 80% to 20% in pH =6

		اسانس ها (میکرو لیتر)							
		Essential oils							
فراسنجه های تخمیری	شاهد	راز یانه <i>Foeniculum vulga</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیبتوس <i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
	Control	3	30	3	30	3	30	SEM	P-value
اسیدیته pH	5.19 ^{ab}	5.10	4.91 ^c	5.20	5.17	4.95 ^c	4.96 ^c	0.029	0.178
نیترژن آمونیاکی N-NH ₃	8.88 ^{ab}	8.88	9.28	7.59 ^d	7.67 ^d	8.39	8.08 ^{cd}	0.202	8.78
قابلیت هضم ماده خشک DMD	47.5	42.5	41.5	47	44	38.66	39.83	1.73	4.15

جدول ۱۱- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی ۶۰ به ۴۰ کنسانتره به علوفه در pH=6
Table 11 - The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Base Feed with concentrate to forage 60% to 40% in pH =6

		اسانس ها (میکرولیتر) Essential oils							
فراسنجه های تخمیری	شاهد Control	رازیانه <i>Foeniculum vulga</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensi</i>		SEM	P-value
		3	30	3	30	3	30		
اسیدیته pH	4.66 ^b	4.67	4.67	4.70 ^a	4.67	4.67	4.70 ^a	0.009	3.14
نیتروژن آمونیاکی N-NH ₃	8.86 ^{ab}	9.39	8.98	8.57	8.78	8.68	8.24	0.309	1
قابلیت هضم ماده خشک DMD	47.5	40.5	38.83	42	40.66	42	37.16	0.78	7.61

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)

5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

جدول ۱۲- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های محیط کشت با پایه خوراکی یونجه در pH=7
Table 12 - The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed hay in pH =7

		اسانس ها (میکرولیتر) Essential oils							
فراسنجه های تخمیری	شاهد Control	رازیانه <i>Foeniculum vulga</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensi</i>		SEM	P-value
		3	30	3	30	3	30		
اسیدیته pH	6.80 ^c	6.85	6.87 ^b	7.22 ^a	6.85	6.84	6.82	0.015	0.000
نیتروژن آمونیاکی N-NH ₃	7.59 ^b	8.39 ^a	8.54 ^a	5.90 ^c	7.48	7.46	7.42	0.206	0.000
قابلیت هضم ماده خشک DMD	43.33 ^b	54 ^a	56.96 ^a	20.83 ^d	35.5 ^c	38.16	52 ^a	2.124	0.000

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)

5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

جدول ۱۳- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت با پایه خوراکی کنسانتره در pH = 7
Table 13 -The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed of concentrate pH = 7

		اسانس‌ها (میکرولیتر)							
		Essential oils							
		رازیانه		کاج		اکالیپتوس			
		<i>Foeniculum vulga</i>		<i>Pinups pumili</i>		<i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
فراسنجه‌های تخمیری	شاهد control	3	30	3	30	3	30	SEM	P-value
اسیدیته pH	6.72 ^c	6.78	6.84 ^b	7.02 ^a	6.79	6.75	6.73	0.025	0.074
نیترژن آمونیاکی N-NH ₃	8.74 ^b	9.35 ^a	9.29 ^a	7.52 ^c	6.58 ^e	7.12 ^d	6.84 ^e	0.094	0.000
قابلیت هضم ماده خشک DMD	46 ^{bc}	59.66 ^a	47.5	32.16 ^e	45	40.66 ^d	50.06	2.124	1.406

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیترژن آمونیاکی

۳- ناپذیری ماده خشک

۴- تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵)

- 1- SEM: Standard error of the means
 2- N-NH₃: Ammonia nitrogen
 3- DMD: dry matter disappearance
 4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)
 5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

جدول ۱۴- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری با پایه خوراکی ۸۰ به ۲۰ کنسانتره به علوفه در pH = 7
Table 14 -The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Basic Feed with concentrate to forego 80% to 20% in pH = 7

		اسانس‌ها (میکرولیتر) Essential oils							
		رازیانه <i>Foeniculum vulga</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
فراسنجه‌های محیط کشت	شاهد Control	3	30	3	30	3	30	SEM	P-value
اسیدیته pH	6.76 ^c	6.84	6.85	6.96 ^a	6.82	6.87 ^b	6.85	0.027	5.54
نیترژن آمونیاکی N-NH3	8.51 ^b	9.90 ^a	8.71	6.71 ^d	6.91 ^d	7.75 ^c	7.78 ^c	0.129	0.00
قابلیت هضم ماده خشک DMD	32.83 ^c	34	39.16 ^b	24.86 ^d	26 ^d	49.5 ^a	48	1.253	0.000

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیترژن آمونیاکی

۳- ناپذیری ماده خشک

۴- تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵)

- 1- SEM: Standard error of the means
 2- N-NH₃: Ammonia nitrogen
 3- DMD: dry matter disappearance
 4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)
 5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

جدول ۱۵- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس‌های رازیانه، کاج و اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیری با پایه خوراکی نسبت ۶۰ به ۴۰ کنسانتره به علوفه pH=7
Table 15 - The effect of addition of essential oils of fennel, pine and eucalyptus on fermentation parameters in Base Feed with concentrate to forego 60% to 40% in pH =7

		اسانس‌ها (میکرولیتتر) Essential oils							
		رازیانه <i>Foeniculum vulga</i>		کاج <i>Pinups pumili</i>		اکالیپتوس <i>Eucalyptus camaldulensi</i>			
فراسنجه‌های تخمیری	شاهد Ccontrol	3	30	3	30	3	30	SEM	P-value
اسیدیته pH	6.79 ^c	6.80	6.87 ^b	7.15 ^a	6.90 ^b	6.090 ^b	6.81	0.124	0.011
نیتروژن آمونیاکی N-NH ₃	8.39 ^b	8.77	9.20 ^a	6.74 ^d	7.36 ^c	7.73 ^c	7.52 ^c	0.57	0.00
قابلیت هضم ماده خشک DMD	34.16 ^c	44.83 ^b	35.83	32	32.33	55 ^a	50.66 ^a	1.36	0.00

۱- میانگین خطای استاندارد

۲- نیتروژن آمونیاکی

۳- ناپدید شدن ماده خشک

۴- تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال (P < ۰/۰۵)

۵- میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵)

1- SEM: Standard error of the means

2- N-NH₃: Ammonia nitrogen

3- DMD: dry matter disappearance

4- P-value: significant difference probability between treatments (P < 0.05)

5- Means within same row with different superscripts differ (P < 0.05).

نتیجه‌گیری کلی

کاهش هدرروی نیتروژن آمونیاکی تجزیه پروتئین میکروبی را در شکمبه کنترل کنند و بازدهی نیتروژن را در نشخوارکنندگان بهبود بخشند. از آنجایی که مقدار گاز تولید شده از یک خوراک شاخصی از قابلیت تخمیر آن خوراک، و در نتیجه ارزش انرژی‌زایی آن می‌باشد، لذا ممکن است چنین استنباط شود که استفاده از اسانس کاج چون باعث کاهش تولید گاز و متعاقباً کاهش تخمیر خوراک می‌گردد، جهت تعدیل فرآیند تخمیر مناسب نمی‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از بین اسانس‌های افزوده شده در pHهای مورد آزمایش، اسانس کاج در مقدار ۳ میکرولیتر و در موارد کمتری اسانس اکالیپتوس در مقدار ۳۰ میکرولیتر، موجب کاهش بیشتر تولید نیتروژن آمونیاکی، افزایش pH محیط کشت و نیز کاهش ناپدید شدن ماده خشک در تمام مواد خوراکی شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اسانس‌های کاج و اکالیپتوس می‌توانند با

منابع

- 1- Aiad, A. M., N. I. Bassuony, A. A. Afifi, and F. M. Abo-Donia. 2008. Adding natural juice of vegetabables and fruitage to ruminant diets: (A) lemon, onion and garlic juice supplement to diets fed to suckling buffalo calves and its effect on digestibility, growth performance and fungi count. World Journal of Agricultural Sciences, 4(2): 149-156.
- 2- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88: E9-E21.
- 3- Burt, S. 2004. Essential Oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- 4- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 89:761-771.
- 5- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. 2004. Effects of different doses of plant extracts on rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 87: 213-213.
- 6- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, P. W. Cardozo, and C. Kamel. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on ruminal microbial fermentation in a dual flow continuous culture. Journal of Dairy Science, 88: 2508-2516.

- 7- Calsamiglia, S., L. Castillejos, and M. Busquet. 2005. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. *Recent Advances in Animal Nutrition*, (1): 129-167.
- 8- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 82: 3230-3236.
- 9- Cardozo, P.W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Effect of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84: 2801-2808.
- 10- Cardozo, P.W., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2572-2579.
- 11- Carro, M. D. and M. J. Ranilla. 2002. Los antibioticos promotores del crecimiento como aditivos: Efectos sobre la producción animal, situación legal y perspectivas de futuro. *Informacion Veterinaria*, 238: 35-45.
- 12- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 132: 186-201.
- 13- Evans, J. D. and S. A. Martin. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41(5): 336-340.
- 14- Gershenzon, J. and R. Croteau. 1991. *Terpenoids in Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. 1. G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic Press, San Diego, CA. Pages: 165-219.
- 15- Grobner, M. A., D. E. Johnson, S. R. Goodall, and D. A. Benz. 1982. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. In *Proceedings of the Annual Meeting*. American Society for Animal Science Western Section.
- 16- Lila, Z. A., N. Mohammed, S. Kanda, T. Kamada, and H. Itabashi. 2003. Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 86: 3330-3336.
- 17- Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28:7-55.
- 18- Nagy, J.G., H.W. Steinhoff, and G.M. Ward. 1964. Effects of essential oils of sagebush on deer rumen microbial function. *Journal Wildlife Management*, 28:785-790.
- 19- Patra, A. K. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal Veterinary Advance*, 6: 416-428.
- 20- Patra, A.K., D.N. Kamra, N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128: 276-291.
- 21- Reuter, H. D. 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. *Garlic*.
- 22- Ryan, J. P., T. Quinn, and B. F. Leek. 1997. Comparison of effect of *Yucca schidigera* plant extract (De-Odorize) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture (Yea- Sacc1026) on pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep s ruminal fluid in vitro. *Journal. Irish Veterinary Journal*, 50(7): 422-429.
- 23- Spanghero, M., C. Zanfia, E. Fabbro, N. Scicutella, and C. Camellini. 2008. Effects of a blend of essential oils on some end products of in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4): 364-374.
- 24- Van Nevel, C. J. 1988. Manipulation of rumen fermentation. *The rumen microbial ecosystem*. Pages: 387-443.
- 25- Yang, W. Z., C. Benchaar, B. N. Ametaj, A. V. Chaves, M. L. He, and T. A. McAllister. 2007. Effects of Garlic and Juniper Berry Essential Oils on Ruminal Fermentation and on the Site and Extent of Digestion in Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 5671-5681.



The Effect of pH and Fennel, Pine and Eucalyptus Essential Oils on Rumen Fermentation Properties (*in vitro*)

A. Vakili^{1*} - S. Saki² - M. Danesh Mesgaran³ - F. Alipour⁴

Received: 17-09-2014

Accepted: 10-07-2017

Introduction In the ruminant animal, rumen fermentation provides nutrients, energy and protein needed for livestock, but this process is accompanied by the loss of energy in the form of methane and protein as ammonia nitrogen. Methane released from ruminants as an environmental pollutant with 38% greenhouse gases is one of the most important reasons for global warming. On the other hand, it reduces 2 to 15 percent of the energy consumed by the livestock. Ammonia nitrogen and nitric oxide are excreted through urine and fertilizers and pollute the environment. Therefore, researchers have tried to eliminate these problems from the past to add some supplements to animal feed to improve fermentation performance. Over the past few decades, ionophors and probiotics have been marketed as methane reducers. However, the antibiotic concerns and the level of these compounds in animal products have limited their use. To solve this problem, the use of herbs, essential oils and their extracts in the replacement of antibiotics and improvement of rumen function has been suggested. Essential oils are aromatic, volatile and oily compounds extracted from plants. They have antimicrobial properties against many bacteria, yeasts, and fungi. Due to the fact that herbal essential oils have strong antimicrobial properties, they are used as additives in livestock feeding. The purpose of this study was to evaluate the effect of some essential oils and pH on rumen fermentation parameters in different diets in *in vitro*.

Materials and Methods In this study, the essential oils of Fennel (*Foeniculu vulgare*), Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) and Pinus pumilio (*Pinus pumilio*) were used. For the extraction of pine and fennel seeds and Eucalyptus leaves were used. Water extraction was used to extract essential oils from Clevenger apparatus. For this purpose, 1Lit glass balloons (pine and fennel seeds were cut and Eucalyptus leaf grinding), 70 grams were used and 750 ml of distilled water was added to each balloon. Samples and distilled water were warmed up at 100°C. Heating was performed for 4 hours to evaporate the contents of the balloons. The essential oils of each sample were extracted on the cooled water from the evaporation procedure. Finally, each of the essential oils was stored in dark glass containers until refrigerated at 4 ° C. The first phase consisted of incubation 4 basal diet: 100% alfalfa hay, 100% concentrate (barley), mixed concentrate with alfalfa with levels of 80 to 20 and 60 to 40% of concentrates to alfalfa hay with zeros, 3 and 30 mg/l of essential oils pine, eucalyptus and fennel mixed with 30 ml of rumen fluid for 72 hours at pH different (5 = pH, 6 = pH and 7 = pH). The pH were set at desired levels using NaOH and HCl at the beginning of incubation to investigate the effect of essential oils and different pH on different parts fermentation, the result of test gas production (a and b). The second experiment tested the same conditions but in the first 24 hours for examining their effects on pH medium, the concentration of ammonia nitrogen and dry matter disappearance.

Results and Discussion The highest average gas production from fermentable partion in treatment of hay with eucalyptus oil and the lowest at 7 = pH in the treatment of 60 to 40 percent with pine essential oil was observed at 6 = pH. At the end of incubation the treatment of 60% concentrate with essential oils of fennel, pine and eucalyptus in 6 = pH and highest for alfalfa with pine oil was at 7 = pH. The lowest concentration of ammonia nitrogen in the treated hay with pine essential oils 7 = pH and the highest 80 percent concentrate treatment with essential oils in fennel was 7 = pH. The disappearance of dry matter in the hay treated with essential oils of pine was 7 = pH. These results suggest that high levels of essential oils effect on rumen microbial fermentation, which confirmed the antimicrobial activity.

Conclusions The results of this study show that of the added essential oils in tested pH, pine essential oil in 3 µl and less in the amount of 30 µl of eucalyptus essential oil, resulted in further reduction of ammonia nitrogen production, increased pH of the culture medium and decreased disappearance dry matter was found in all foods. Therefore, it can be concluded that the essential oils of pine and eucalyptus can control the degradation of the

1- Associate Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

2- MSc Graduated of Ruminant Nutrition, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

4- PhD student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(* - Corresponding author email: savakili@um.ac.ir)

microbial protein in the rumen by reducing the ammonia nitrogen content and improve the nitrogen yield in ruminants. Since the amount of gas produced from an indigenous feed is due to the fermentation of that feed, and hence its energy value, it can be concluded that the use of pine essential oils, because it reduces gas production and consequently reduces feed fermentation, The fermentation process is not suitable.

Key word: Eucalyptus, Fennel, PH, Pine, Ruminant fermentation

اثر افزودنی‌های باکتریایی و پری‌بیوتیکی بر ترکیب شیمیایی، تولید گاز و پایداری هوازی سیلاژ ذرت

سیما علایی باهر^۱ - حمید محمدزاده^{۲*} - اکبر تقی زاده^۳ - علی حسینیخانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۰

چکیده

این طرح به منظور بررسی اثرات افزودنی میکروبی تجاری با نام لالسیل فرش^۵ (حاوی لاکتوباسیلوس بوکتری و افزودنی پری‌بیوتیکی (پودر آب پنیر) روی ترکیب شیمیایی، pH، پایداری هوازی و قابلیت هضم آزمایشگاهی سیلاژ ذرت انجام شد. تیمارهای آزمایشی به‌ترتیب شامل (۱) سیلاژ ذرت شاهد (بدون افزودنی)، (۲) سیلاژ ذرت تیمار شده با پودر آب پنیر، (۳) سیلاژ ذرت تیمار شده با افزودنی باکتریایی با نام تجاری لالسیل فرش و (۴) سیلاژ ذرت تیمار شده با پودر آب پنیر به همراه افزودنی باکتریایی لالسیل بودند. در پایان ۹۰ روز دوره آزمایشی، تیمار پودر آب پنیر و افزودنی باکتریایی سبب کاهش تولید پساب و افزایش در ماده خشک سیلاژ نسبت به گروه شاهد شدند. کمترین مقاومت در برابر فساد هوازی مربوط به تیمار پودر آب پنیر و بیشترین میزان مربوط به تیمار لالسیل بود (به ترتیب ۷۰ ساعت و ۱۴۴ ساعت). تیمارهای مکمل شده با افزودنی باکتریایی و آب پنیر افزایش در حجم گاز تولیدی را نسبت به گروه شاهد در ساعات مختلف آنکوباسیون نشان دادند. نتایج نشان داد که افزودن پودر آب پنیر با کاهش نرخ تولید پساب، افزایش غلظت پروتئین خام، کاهش غلظت الیاف نامحلول در شوینده خشی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و افزایش درصد قابلیت هضم سیلاژ ذرت می‌تواند باعث بهبود ارزش غذایی سیلاژ گردد. همچنین افزودنی باکتریایی لالسیل با کاهش سریع pH و افزایش پایداری هوازی سیلاژ ذرت می‌تواند موجب رسیدن سریع سیلاژ و بهبود پایداری سیلاژ حاصله در برابر فساد هوازی گردد.

واژه‌های کلیدی: افزودنی میکروبی، باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک، پودر آب پنیر، لاکتوباسیلوس بوکتری، مخمر

مقدمه

سرعت pH موجب جلوگیری از رشد باکتری‌های نامطلوب در سیلو شده و در نتیجه مانع مصرف مواد غذایی سیلاژ شده و ارزش غذایی سیلاژ را حفظ می‌کنند (۲).

در کنار استفاده از لاکتوباسیل‌های با تخمیر همگن (مثل لاکتوباسیلوس پلاتناروم)، گاهی نیز از لاکتوباسیل‌های با تخمیر ناهمگن (مانند لاکتوباسیلوس بوکتری) در تهیه سیلاژ استفاده می‌شود (۸، ۹، ۱۹ و ۲۵). لاکتوباسیل‌های با تخمیر همگن موجب تولید دو ملکول اسید لاکتیک از هر ملکول هگزوز شده و لذا باعث افت سریعتر pH می‌شوند (۱۶، ۲۰ و ۲۲). اما باکتری‌های اسید لاکتیک با تخمیر ناهمگن در کنار اینکه با تولید لاکتات در مراحل اولیه تخمیر باعث افت سریع pH در سیلاژ می‌شوند، در مراحل نهایی تخمیر باعث تبدیل لاکتات به استات شده و نسبت لاکتات به استات را در سیلاژ افزایش می‌دهند (۱۵ و ۲۳). به دلیل خاصیت ضد قارچ اسید استیک بر میکروارگانیسم‌های سیلاژ (۱۳ و ۲۷)، افزایش نسبت استات به لاکتات در سیلاژ در پاسخ به استفاده از افزودنی میکروبی حاوی لاکتوباسیل‌های با تخمیر ناهمگن می‌تواند در کنار افت سریع

سیلاژ به کمک فرآیند طبیعی تخمیر و با تولید اسید لاکتیک حاصل می‌شود (۲۵). سیلاژ با کیفیت خوب با حداقل کردن فعالیت آنزیم‌های گیاهی و میکروارگانیسم‌های نامطلوب و تشویق برای فعالیت باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک به دست می‌آید (۴). به هنگام تهیه سیلاژ ممکن است از افزودنی‌های مختلفی به منظور دستیابی به تخمیر اسیدلاکتیکی و در نتیجه تهیه سیلاژ با کیفیت و ماندگاری بالا استفاده شود (۱۷). افزودنی‌های باکتریایی با کاهش

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشگاه تبریز

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(*)- نویسنده مسئول: (Email: hamidmh@tabrizu.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.63019

5- Lalsil Fresh

نگهداری میزان پساب سیلاژها توسط شیرهای تعبیه شده در سیلوها اندازه‌گیری شده و وزن سیلوها ثبت شد. در این طرح فراسنجه‌های pH، درصد ماده خشک، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی، پایداری هوازی سیلاژ ذرت، جمعیت میکروبی و پتانسیل تولید گاز اندازه‌گیری شدند.

آنالیز شیمیایی

پس از اتمام دوره سیلو کردن، سیلوها توزین شده و باز شدند و نمونه‌گیری از آنها جهت انجام آنالیزهای آزمایشگاهی صورت گرفت. ماده خشک، خاکستر و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) با روش ذکر شده در AOAC سال ۲۰۰۲ و پروتئین خام به‌وسیله میکروکلدال تعیین گردید. الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) نیز با روش ون سوست اندازه‌گیری شدند (۲۶). ضایعات ماده خشک پساب با اندازه‌گیری روزانه میزان تولید پساب و تعیین ماده خشک پساب مشخص شد. مجموع ضایعات اکسیداسیون و تخمیر نیز با کم کردن ضایعات ماده خشک پساب از کل ضایعات ماده خشک سیلاژ محاسبه گردید.

پایداری هوازی

جهت اندازه‌گیری پایداری هوازی سیلاژها مقدار ۵۰۰ گرم از هر سیلاژ در داخل سطل‌های پلاستیکی قرار داده و با پارچه ململ (پارچه پنیر)^۲ دو لایه پوشانده شدند. دماسنجی در وسط سطل در داخل توده سیلویی قرار داده شده و هر دو ساعت یکبار دمای سیلاژ و دمای محیط اندازه‌گیری شدند. وقتی دمای سیلاژ به میزان ۲ درجه بیشتر از دمای محیط رسید، سیلاژها به‌عنوان سیلاژ فاسد و کپک‌زده در نظر گرفته شدند (۱۴ و ۲۰).

کشت میکروبی

کشت میکروبی نمونه‌های سیلاژ به منظور تعیین کل میکروارگانیسم‌های هوازی، تعداد باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک و تعداد قارچ‌ها (کپک و مخمر) انجام شد. بدین‌منظور به‌ترتیب از محیط کشت‌های NA (Nutrient Agar)، MRS (de Potato Dextrose Agar) PDA و MAN Rogosa Sharpe استفاده شد. به منظور شمارش بار میکروبی سیلاژ از روش کشت سطحی استفاده شد (۱۶ و ۲۸). بدین منظور ۳۰ گرم از نمونه سیلاژ با ۲۷۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی مخلوط و دو دقیقه تکان داده شد. جهت اندازه‌گیری کشت میکروبی عصاره سیلاژ تا ۱۰^۶ مرتبه رقیق-سازی گردید. به منظور کشت و شمارش کل باکتری‌ها و باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک، از روش کشت سطحی استفاده شد. به این

pH، موجب بهبود پایداری هوازی سیلاژ و در نتیجه ممانعت سیلاژ از فساد هوازی در مرحله باز شدن سیلو گردد (۲، ۸ و ۹).

لاکتوباسیل‌های موجود در علوفه سیلویی با مصرف قندهای محلول ترکیباتی مثل لاکتات، استات، دی اکسید کربن و غیره را تولید می‌کنند (۲۵). اگر قندهای موجود در علوفه کافی نباشد ممکن است تخمیر مناسب صورت نپذیرد (۱۲). پودر آب پنیر منبع غنی از قند محلول در آب بوده و لذا می‌تواند در کنار این که به‌عنوان سوبسترا برای باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک در سیلو مطرح باشد، لاکتوز موجود در پودر آب پنیر می‌تواند به‌عنوان منبع پری‌بیوتیکی بر لاکتوباسیل‌ها عمل کند (۱۹). علی‌رغم اینکه تحقیقات زیادی در خصوص استفاده از منابع قندی مثل ملاس، آرد غلات و غیره بر شدت و نوع تخمیر در سیلو انجام شده است، اما درخصوص نقش آب پنیر به‌عنوان منبع کربوهیدرات محلول و منبع پری‌بیوتیکی بر فعالیت لاکتوباسیل‌های سیلاژ ذرت تحقیقی صورت نپذیرفته است. لذا فرضیه این طرح پژوهشی بر این اساس است که استفاده همزمان از افزودنی‌های میکروبی (لاکتوباسیلوس بوکتری) و پری‌بیوتیکی (پودر آب پنیر) باعث بهبود ترکیب شیمیایی و پایداری هوازی سیلاژ ذرت خواهد شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲ و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار اجرا شد. در ابتدا ذرت علوفه‌ای در مرحله دانه خمیری (حدود ۲۰ درصد ماده خشک) برداشت و سپس توسط چابر به قطعات ۳ تا ۵ سانتی‌متری خرد شد. تیمارهای ۱ تا ۴ به‌ترتیب شامل (۱) سیلاژ ذرت شاهد، (۲) سیلاژ ذرت تیمار شده با پودر آب پنیر (یک درصد یا ۱۰ کیلو بر تن)، (۳) سیلاژ ذرت تیمار شده با افزودنی باکتریایی با نام تجاری لالسیل-فرش^۱ (حاوی باکتری لاکتوباسیلوس بوکتری) به میزان ۱/۸×۱۰^۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) به ازای هر گرم علوفه تازه و (۴) سیلاژ ذرت تیمار شده با پودر آب پنیر (یک درصد) و افزودنی باکتریایی (۱/۸×۱۰^۶ CFU به ازای هر گرم علوفه تازه) بودند. اضافه کردن پودر آب پنیر و افزودنی باکتریایی به علوفه سیلویی به روش اسپری کردن انجام شد. لازم به ذکر است که جهت حذف اثر آب افزوده شده به تیمارهای دریافت‌کننده پودر آب پنیر و لالسیل، به گروه شاهد نیز همان مقدار آب مقطر اضافه شد. مواد سیلویی در سیلوهای آزمایشگاهی با ظرفیت تقریبی ۴ کیلو علوفه ذرت سیلویی پر شده و توزین شدند. سیلوها به مدت ۹۰ روز در محیطی خشک و دور از نور آفتاب و در دمای اتاق، نگهداری شدند. در طول دوره

استنگیس، (۱۹۸۸) محاسبه گردید. میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) نیز بر اساس رابطه گتاچیو و همکاران، (۲۰۰۲) محاسبه شد. که در این روابط GP تولید گاز (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) تا ساعت ۲۴، CP، CF و CA به ترتیب پروتئین خام، چربی خام و خاکستر (درصد ماده خشک) نمونه می‌باشند.

$$ME (MJ/kg DM) = 2/2 + 0/136 GP + 0/057 CP + 0/029 CF2 \quad (\text{معادله ۱})$$

$$NEL (MJ/kg DM) = -0/36 + 0/1149 GP + 0/0054 CP + 0/0139 CF - 0/0054 CA \quad (\text{معادله ۲})$$

$$DOM (\% DM) = 14/88 + 0/889 GP + 0/45 CP + 0/0651 CA \quad (\text{معادله ۳})$$

$$SCFA (m mol/200 mgDM) = 0/222 GP - 0/00425 \quad (\text{معادله ۴})$$

مقایسه آماری

تمامی داده‌های به‌دست آمده به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار و با استفاده از نرم‌افزار SAS ویرایش ۹ و در سطح ۱ و ۵ درصد مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

اثرات افزودنی‌های پری‌بیوتیکی و باکتریایی بر ترکیب شیمیایی سیلاژ ذرت در جدول ۱ آورده شده است. سیلاژهای دارای افزودنی پری‌بیوتیکی (پودر آب پنیر) و همچنین سیلاژهای تلقیح شده با افزودنی باکتریایی غلظت ماده خشک بیشتری نسبت به سایر سیلاژها داشتند ($P < 0/05$). افزایش ماده خشک تحت تأثیر افزودنی‌های به‌کار رفته در این آزمایش ناشی از کاهش اتلاف و ضایعات ماده خشک در اثر فرآیندهای اکسیداسیون و تخمیر و یا خروج پساب بوده است (جدول ۲).

در صورتی که گیاه میزان کافی کربوهیدرات‌های قابل حل داشته باشد، اسیدهای تولید شده، pH سیلاژ را به ۴ یا پایین‌تر می‌رساند که در این حالت بسته به ماده خشک گیاه از ادامه فعالیت‌های تخمیری جلوگیری می‌شود و سیلاژ به صورت پایدار مانده و ترکیبات آن تغییر نمی‌کنند (۳). در نتیجه تولید اسیدها و کاهش pH سیلاژ، رشد میکروارگانیسم‌های فاسدکننده سیلو متوقف می‌شود (۱۵). برخلاف آب پنیر، استفاده از افزودنی باکتریایی لاکتوباسیلوس بوکتری سبب کاهش pH در سیلاژهای دریافت‌کننده این افزودنی شد ($P < 0/05$) (جدول ۱) که احتمالاً به‌دلیل غالبیت جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک در سیلاژ در مراحل اولیه سیلو کردن در پاسخ به افزودنی لاکتوباسیلوس بوکتری است (۲ و ۲۵).

منظور در زیر هود و در کنار شعله، به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده نمونه‌ها به وسیله سمپلر بر سطح محیط جامد تزریق و سپس با میله شیشه استریل پخش شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی، به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. شمارش قارچ‌ها نیز با استفاده از روش کشت سطحی انجام شد. برای ایجاد شرایط بهینه رشد قارچ‌ها، کلیه پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از اتمام گرم‌خانه‌گذاری، کلنی‌ها شمارش و با توجه به شمارش انجام شده و رقت مورد استفاده برای کشت، جمعیت میکروارگانیسم‌ها محاسبه شد.

اندازه‌گیری تولید گاز

جهت اندازه‌گیری میزان تولید گاز حاصل از تخمیر از روش فدوراک و هرودی (۷) استفاده شد. در ابتدا ۳۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک هر تیمار که قبلاً با آسیاب مجهز به الک ۲ میلی‌متری آسیاب شده بودند را وزن کرده و در داخل شیشه‌های (ویال) ۱۰۰ میلی‌لیتر استریل ریخته و برای هر نمونه ماده غذایی ۵ تکرار در نظر گرفته شد. مایع شکمبه و بافر تهیه شده طبق روش مک‌دوگال (۲۳) به نسبت یک قسمت از مایع شکمبه و دو قسمت از بافر به داخل ارلن ریخته شده و جهت جلوگیری از ورود هوا و کاهش دمای مایع، گاز کربنیک به داخل مخلوط تزریق و در روی هیتر با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در هر شیشه حاوی نمونه، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر مک‌دوگال ریخته شد و پس از تزریق گاز کربنیک و بی‌هوازی نمودن محیط داخل شیشه درب آن را با درپوش لاستیکی و سیلک آلومینیومی محکم بسته و در دستگاه انکوباتور شیکر در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه از ۵ عدد شیشه بدون آنکه نمونه غذایی در آن ریخته شود (شاهد) استفاده شد. در این شیشه‌ها فقط ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و بافر ریخته شده و سپس در انکوباتور قرار داده شدند. میزان گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از قرار دادن در انکوباتور شیکر میزان گاز تولیدی به روش جابه‌جایی مایع قرائت و ثبت گردید. در این روش از میزان جابه‌جایی آب در لوله آزمایشی مدرج متصل به ویال جهت اندازه‌گیری میزان گاز تولید شده استفاده می‌شود. به منظور تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادله ۱- $P = A e^{ct}$ ارسکوف و مک‌دونالد (۱۹۷۹) استفاده شد که در این معادله P ، تولید گاز در زمان t ، A پتانسیل تولید گاز، C نرخ تولید گاز، t زمان تخمیر است. انرژی قابل متابولیسم (ME)، انرژی ویژه شیردهی (NEL) و درصد ماده آلی قابل هضم (DOM) سیلاژ ذرت با استفاده از معادلات ارائه شده توسط منکی و همکاران، (۱۹۷۹) و منکی و

جدول ۱- اثرات افزودنی باکتریایی و پریبیوتیکی بر ترکیب شیمیایی سیلاژ ذرت (درصد از ماده خشک)
Table 1- The impact of bacterial inoculant and prebiotic additive on chemical composition of Corn silage (% DM)

صفت Treat	میانگین تیمارها Means of Treatments				اثر پودر آب پنیر Effect of Whey			اثر لاسیل Effect of Lalsil			اثر متقابل Interaction Effects	
	شاهد Control	لاسیل Lalsil	پودر آب پنیر Whey	لاسیل و پودر آب پنیر W+L	فاقد پودر آب پنیر Without Whey	دارای پودر آب پنیر Whey	P value	فاقد لاسیل Without Lalsil	دارای لاسیل With Lalsil	P value	P value	SEM
pH	4.05 ^a	3.87 ^c	4.03 ^{ab}	3.99 ^b	3.96	4.01	<0.01	4.04	3.93	<0.01	<0.01	0.02
ماده خشک (درصد) Dry Matter	18.90 ^b	20.61 ^a	21.34 ^a	20.90 ^a	19.76	21.12	<0.01	20.12	20.75	0.02	<0.01	0.39
الیاف نامحلول در شونده خنثی Neutral Detergent Fiber	43.53 ^b	46.73 ^a	43.13 ^b	42.06 ^b	45.13	42.60	0.03	43.33	44.40	0.31	0.06	1.17
الیاف نامحلول در شونده اسیدی Acid Detergent Fiber	20.86 ^b	22.06 ^a	20.33 ^b	20.20 ^b	21.47	20.27	0.03	20.60	21.13	0.26	0.17	0.77
خاکستر Ash	7.60 ^b	8.34 ^a	8.18 ^a	8.23 ^a	7.97	8.20	0.19	7.89	8.28	0.04	0.07	0.28
پروتئین خام Crude Protein	8.82 ^c	8.68 ^c	10.28 ^a	9.46 ^b	8.75	9.87	<0.01	9.55	9.07	0.05	0.02	0.37

جدول ۲- اثرات افزودنی باکتریایی و پری‌بیوتیکی بر ضایعات مواد مغذی سیلاژ ذرت
Table 2- The effect of bacterial inoculant and prebiotic additive on nutritive wastage of Corn silage

Table 2 The effect of bacterial inoculum and probiotic feeding on nutrient digestibility of Corn silage											
صفت Treat	میانگین تیمارها Means of Treatments			اثر پودر آب پنیر Effect of Whey			اثر لاسیل Effect of Lalsil			اثر متقابل Interaction Effects	
	شاهد Control	لاسیل Lalsil	پودر آب پنیر Whey	لاسیل و پودر آب پنیر W+L	فاقد پودر آب پنیر Without Whey	دارای پودر آب پنیر Whey	P value	فاقد لاسیل Without Lalsil	دارای لاسیل With Lalsil	P value	SEM
ضایعات پساب (درصد از وزن تر) Effluent Waste (% wet weight)	15.63 ^a	14.53 ^b	13.38 ^c	10.88 ^d	15.08	12.13	<0.01	14.51	12.70	<0.01	0.51
ضایعات اکسیداسیون و تخمیر (درصد از وزن تر) Oxidation and Fermentation Waste (% wet weight)	0.62 ^c	1.03 ^b	0.50 ^c	2.07 ^a	0.82	1.29	<0.01	0.56	1.55	<0.01	0.17
کل ضایعات علوفه (درصد از وزن تر) Total Waste (% wet weight)	16.26 ^a	15.56 ^a	13.88 ^b	12.96 ^b	15.91	13.43	<0.01	15.07	14.26	0.05	0.61
ضایعات پساب (درصد از کل ضایعات) Effluent Waste (% total waste)	96.15 ^a	93.40 ^b	96.38 ^a	84.00 ^c	94.77	90.19	<0.01	96.27	88.70	<0.01	0.94
ضایعات اکسیداسیون و تخمیر (درصد از کل ضایعات) Oxidation and Fermentation Waste (% total waste)	3.84 ^c	6.59 ^b	3.61 ^c	15.99 ^a	5.22	9.80	<0.01	3.72	11.29	<0.01	0.94

میکروبی در طول فاز هوازی و بی هوازی در فرآیند سیلو کردن می باشد (۱۵ و ۱۹). همچنین پودر آب پنیر موجب کاهش ضایعات پساب شد ($P < 0.05$) که از جمله دلایل آن می توان به بالاتر بودن ماده خشک پودر آب پنیر نسبت به علوفه سیلویی و افزایش فشار اسمزی توسط پودر آب پنیر اشاره کرد (۱۵).

افزودن پودر آب پنیر به سیلاژ ذرت سبب کاهش پایداری هوازی سیلاژهای حاصل گردید (جدول ۳). هولزار و همکاران، (۱۳) بالا بودن میزان کربوهیدرات محلول و لاکتیک اسید و غلظت پایین اسیدهای چرب فرار را به عنوان دلایل اصلی در تسریع وقوع فساد هوازی سیلاژ نام بردند. در واقع کربوهیدرات محلول و لاکتیک اسید به عنوان سوبسترا جهت رشد و فعالیت مخمرها و کپک ها پس از باز شدن سیلو لازم بوده ولی اسیدهای چرب فرار خاصیت کشندگی و ممانعت کننده رشد برای مخمرها و کپک ها دارند (۱۳). در آزمایش حاضر سیلاژهای دریافت کننده پودر آب پنیر احتمالاً به علت غلظت بالای کربوهیدرات محلول (۱۲) و نیز غلظت بالای ماده خشک (۱۹) دارای پایداری هوازی پایینی بودند. اما میزان پایداری هوازی تیمارهایی که حاوی افزودنی باکتریایی لاکتوباسیلوس بوکتری بودند، بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۳). گزارش شده است که لاکتات به عنوان سوبسترای مخمرها در هنگام باز کردن سیلو بوده و سیلاژهای دارای غلظت بالای اسید لاکتیک معمولاً پایداری هوازی کمتری دارند (۲۰). اگرچه لاکتوباسیلوس بوکتری در مراحل اولیه تخمیر در سیلاژ اقدام به تولید اسید لاکتیک از قندهای محلول کرده و باعث افت سریعتر pH می شود، اما در مراحل نهایی تخمیر لاکتات را به استات تبدیل می کند (۱۳ و ۲۰). در این آزمایش نیز تیمارهای حاوی لالسیل نیز احتمالاً به علت غلظت پایین تر لاکتات (به دلیل تبدیل لاکتات به استات توسط لاکتوباسیلوس بوکتری در فازهای انتهایی تخمیر)، غلظت بالای استات و نسبت بالاتر استات به لاکتات (۸ و ۹)، پایداری هوازی بیشتری در مقابل فساد و کپک زدگی نشان دادند. همچنین تأثیر لاکتوباسیلوس بوکتری را بر بهبود پایداری هوازی می توان توسط افزایش سهم اسید استیک تولیدی از کل VFA تولید شده در سیلاژ تحت تأثیر لاکتوباسیلوس بوکتری نیز ارتباط داد (۸، ۱۵ و ۲۷). لذا لالسیل به سرعت pH را کاهش داده و موجب حفظ ارزش غذایی سیلاژ و تسریع در تخمیر لاکتیکی در شرایط بی-هوازی شده و از طرف دیگر مانع تخمیر ثانویه بعد از باز کردن سیلو می شود. همچنین نشان داده شده است که افزودنی میکروبی نسبت استات به لاکتات را در سیلاژ افزایش داده و به دلیل خاصیت ضد قارچ بودن اسید استیک، مقاومت سیلاژها را در مقابل فساد هوازی افزایش می دهد (۳).

افزودن پودر آب پنیر به علوفه ذرت سیلویی سبب کاهش در میزان الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) در سیلاژهای ذرت گردید ($P < 0.05$) که این امر می تواند به دلیل افزایش قند محلول در این سیلاژها و یا افت سریعتر pH در مراحل اولیه سیلو کردن باشد که سبب کاهش سهم NDF از کل ماده خشک سیلاژ می گردد (۲۷ و ۲۸). در مقابل، لاکتوباسیلوس بوکتری باعث افزایش عددی در میزان NDF سیلاژ ذرت شد. این امر احتمالاً به دلیل مصرف قندهای محلول علوفه است که سبب افزایش نسبی الیاف سیلاژ شده است (۱۴). سیلاژهای حاوی پودر آب پنیر غلظت بالاتری از الیاف نامحلول در شوینده اسیدی نسبت به تیمارهای فاقد پودر آب پنیر داشتند ($P < 0.05$) که احتمالاً ناشی از افت سریع pH در این تیمارها است که منجر به تجزیه همی سلولز و در نتیجه افزایش سهم ADF در سیلاژ حاصل می شود (۴). استفاده از افزودنی باکتریایی لاکتوباسیلوس بوکتری سبب افزایش عددی در میزان الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) سیلاژها گردید که البته از نظر آماری معنی دار نبود.

در تیمارهایی که افزودنی باکتریایی دریافت کرده بودند غلظت خاکستر نسبت به تیمارهای تلقیح نشده افزایش نشان داد (جدول ۱). افزایش در خاکستر خام در سیلاژ در پاسخ به افزودنی باکتریایی می تواند به دلیل کاهش تولید پساب و در نتیجه کاهش هدررفت خاکستر از طریق پساب (۱۹ و ۲۵) و نیز کاهش سهم نسبی برخی اجزا (مثل قندهای محلول و الیاف نامحلول در شوینده خنثی) در اثر تخمیر و هیدرولیز اسیدی (۳، ۶ و ۱۴) باشد. محمدزاده و همکاران (۱۴) نیز عنوان کردند که سیلاژهای دارای افزودنی میکروبی میزان بالاتری از خاکستر خام را به خود اختصاص دادند. در طی سیلو کردن درصد پروتئین خام تیمارهای تلقیح شده با لالسیل کاهش نشان داد به طوری که سیلاژهایی که پس از ۹۰ روز سیلو کردن باز شدند، به دلیل سهم بالاتر الیاف و خاکستر خام تمایل به داشتن پروتئین خام کمتری بودند. اما افزودن پودر آب پنیر به علوفه ذرت سبب افزایش در میزان پروتئین خام نسبت به گروه شاهد گردید ($P < 0.05$) که این امر احتمالاً به دلیل کاهش هدروری پروتئین محلول در پساب (۲۵) و کاهش سهم الیاف نامحلول در شوینده خنثی (۸) می باشد. همانطور که جدول ۲ نشان می دهد، افزودن لالسیل منجر به افزایش ضایعات اکسیداسیون و تخمیر شده ($P < 0.05$) اما بر کل ضایعات تأثیر معنی دار نداشت. این امر می تواند به مصرف مواد مغذی علوفه سیلویی توسط لاکتوباسیلوس بوکتری در نتیجه افزایش تعداد میکروارگانیسم های علوفه در طول فاز هوازی و بی هوازی (تخمیر) مربوط باشد (۲۸). پودر آب پنیر موجب کاهش ضایعات پساب و کل ضایعات شده ولی همانند لالسیل سبب افزایش ضایعات اکسیداسیون و تخمیر شد ($P < 0.05$) که دلیل احتمالی آن افزایش فعالیت آنزیم های گیاهی و

جدول ۳- اثرات افزودنی باکتریایی و پری‌بیوتیکی بر پایداری هوازی سیلاژ ذرت
Table 3- The impact of bacterial inoculant and prebiotic additive on aerobic stability of Corn silage

Table 5- The impact of bacterial inoculum and probiotic additive on aerobic stability of Corn silage														
میانگین تیمارها Means of Treatments			اثر پودر آب پنیر Effect of Whey				اثر لالسیل Effect of Lalsil				اثر متقابل Interaction Effects		SEM	
صفت Treat	شاهد Control	لالسیل Lalsil	پودر آب پنیر Whey	پودر آب پنیر W+L	فاقد پودر آب پنیر Without Whey	دارای پودر آب پنیر Whey	P value	فاقد لالسیل Without Lalsil	دارای لالسیل With Lalsil	P value	P value			
پایداری هوازی (ساعت) Aerobic Stability (Hour)	75.00 ^b	141.00 ^a	70.66 ^c	75.66 ^b	108.00	73.16	<0.01	72.83	108.33	<0.01	<0.01	0.82		
تعداد ساعات بالاتر از دو درجه دمای پیک نسبت به دمای محیط (درجه سانتی گراد) Differences Between Pick Temperature and Environment	10.33 ^{ab}	13.66 ^a	6.66 ^b	7.00 ^b	12.00	6.83	0.01	8.50	10.33	0.29	0.37	2.78		
تعداد پیک Number of Picks	2 ^b	3 ^a	2 ^b	2 ^b	2.50	2.00	<0.01	2.00	2.50	<0.01	<0.01	0.10		

جدول ۴- اثرات افزودنی باکتریایی و پریبیوتیکی بر جمعیت میکروبی (log CFU/ gr)

تreat	میانگین تیمارها Means of Treatments				اثر پودر آب پنیر Effect of Whey		اثر لالسیل Effect of Lalsil		اثر متقابل Interaction Effects	
	شاهد Control	لالسیل Lalsil	پودر آب پنیر Whey	پودر آب پنیر W+L	فاقد پودر آب پنیر Without Whey	دارای پودر آب پنیر Whey	فاقد لالسیل Without Lalsil	دارای لالسیل With Lalsil	P value	SEM
مخمر Yeast	2.99 ^a	2.47 ^b	2.47 ^b	2.47 ^b	2.71	2.65	2.73	2.67	0.31	0.04
باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک Lactic acid Producing Bacteria	9.58 ^a	9.31 ^b	9.40 ^{ab}	9.29 ^b	9.54	9.34	9.49	9.30	0.66	0.10
کل باکتری‌ها Total Bacteria	9.30 ^a	9.23 ^{bc}	9.26 ^b	9.20 ^c	9.27	9.23	9.28	9.22	0.54	0.02

نتایج این آزمایش با نتایج رنجت و کانگ (۲۲) که اثر افزودنی لاکتوباسیلوس بوکتری را در سطوح مختلف بر روی سیلاژ ذرت مورد بررسی قرار داده و بهبود در پایداری هوازی سیلاژ را مشاهده کردند، کاملاً مطابقت داشت. در پیهیوس و همکاران (۶)، طی سه آزمایش متفاوت افزودنی لاکتوباسیلوس بوکتری را به تنهایی و یا همراه با ال پلانتاروم مورد استفاده قرار دادند که در تمامی آزمایشات لاکتوباسیلوس بوکتری سبب بهبود پایداری هوازی گردید و این پاسخ مثبت با افزایش در مصرف خوراک حیوان تا ۴۸۰ ساعت پس از قرارگیری سیلاژ در مجاورت هوا ادامه یافت. در آزمایش فیلیا (۸)، نیز اثر لاکتوباسیلوس بوکتری به تنهایی و در ترکیب با ال پلانتاروم بر روی علوفه گندم، سورگوم و ذرت مورد بررسی قرار گرفت که در تمامی تیمارها بهبود پایداری هوازی گزارش گردید.

افزودن پودر آب پنیر به سیلاژ ذرت احتمالاً به دلیل افت سریعتر pH در مراحل ابتدایی تخمیر (۸ و ۹) و بالاتر بودن ماده خشک سبب کاهش عددی اندکی در جمعیت کپک و لاکتوباسیل‌ها گردید (جدول ۴). افزودنی باکتریایی نیز احتمالاً به علت غلظت بالاتر استات و نیز pH پایین (۲۸) سبب کاهش عددی در جمعیت مخمر، کپک و باکتری‌های اسید لاکتیکی گردید. در آزمایشات دیگری نیز نشان داده شده است که استفاده از افزودنی میکروبی سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیل‌ها (۲۷) و یا سبب کاهش لاکتوباسیل‌ها (۱۸) شده و یا بر جمعیت آنها موثر نبوده است (۲۴). موثر بودن افزودنی میکروبی بر جمعیت میکروارگانیسم‌های سیلاژ وابسته به نوع علوفه سیلو شده، زمان باز شدن سیلو، جمعیت اولیه میکروارگانیسم‌های طبیعی سیلاژ و غیره بستگی دارد (۱۵ و ۲۵).

داده‌های مربوط به تولید گاز حاصل از تخمیر (تصحیح شده برای بلانک)، در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون و نیز فراسنجه‌های تولید گاز (A و C) سیلاژ ذرت در جداول ۵ و ۶ ذکر شده است. افزودن پودر آب پنیر در ساعات اولیه آزمایش سبب ایجاد اختلافات معنی‌داری با تیمار شاهد نگردید ولی از ساعت ۶ تا انتهای دوره آزمایشی اختلاف معنی‌داری در گاز تولیدی نشان داد. این میزان افزایش در تولید گاز را می‌توان توسط بالا بودن میزان کربوهیدرات محلول، پروتئین خام و هیدرولیز نسبی الیاف در تیمار پودر آب پنیر نسبت به تیمار شاهد توجیه کرد (۸، ۱۵، ۲۲ و ۲۳) که سبب افزایش بخش قابل تجزیه و در نتیجه افزایش تولید گاز می‌شود. با توجه به اینکه افزودن پودر آب پنیر مقدار پروتئین سیلاژ را زیاد نموده و احتمالاً غلظت کربوهیدرات محلول را در سیلاژ افزایش می‌دهد (۱۰)، می‌توان افزایش در تولید گاز در گروه حاوی پودر آب پنیر را توجیه کرد.

جدول ۵- میزان تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (میلی لیتر به ازای ۱۰۰۰ میلی گرم ماده خشک) در سیلاژ ذرت تحت تاثیر افزودنی باکتریایی و پری‌بیوتیکی

Table 5- The amount of Gas production in different incubation (ml per 1000 mg of dry matter) times in Corn silage influence bacterial and prebiotic additive												
		زمان انکوباسیون (ساعت) Incubation Time (Hours)										
تیمار		2	4	6	8	12	16	24	36	48	72	96
شاهد												
شاهد	Control	21.86 ^{bc}	51.18 ^b	71.41 ^b	92.81 ^b	118.96 ^b	135.40 ^b	152.24 ^c	160.54 ^c	162.63 ^c	163.30 ^c	163.34 ^b
لاسلیل	Lalsil	18.36 ^c	57.32 ^a	86.47 ^a	108.29 ^a	136.85 ^a	152.87 ^a	166.92 ^b	172.26 ^b	173.22 ^b	173.42 ^b	173.43 ^b
پودر آب پنیر	Whey	26.14 ^b	54.14 ^{ab}	78.14 ^b	98.69 ^b	131.39 ^a	155.40 ^a	185.95 ^a	207.52 ^a	216.06 ^a	220.77 ^a	221.50 ^a
لاسلیل و پودر آب پنیر	W+L	31.11 ^a	57.78 ^a	78.52 ^b	94.56 ^b	116.95 ^b	130.45 ^b	143.58 ^c	149.52 ^d	150.56 ^d	151.23 ^d	151.25 ^c
اثر پودر آب پنیر												
فاقد پودر آب پنیر	Without Whey	20.11	54.09	78.91	100.63	127.90	144.88	159.62	166.39	168.13	168.36	168.39
دارای پودر آب پنیر	Whey	28.44	55.98	78.32	96.59	124.44	142.96	164.70	177.51	183.29	186.52	186.92
P value		<0.01	0.87	0.94	0.60	0.75	0.82	0.47	0.07	<0.01	<0.01	<0.01
اثر لاسیل												
فاقد لاسیل	Without Lalsil	24.08	52.69	75.13	95.74	125.02	145.40	168.73	183.85	189.36	191.87	192.15
دارای لاسیل	With Lalsil	23.69	57.58	82.49	101.43	126.91	141.64	155.27	160.86	161.79	162.22	162.23
P value		0.73	0.08	0.02	0.24	0.92	0.63	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
اثر متقابل												
P value		0.02	0.39	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
SEM		2.61	2.83	3.30	3.66	4.17	4.52	5.05	5.50	5.68	5.77	5.78

جدول ۶- مشخصه‌های تولید گاز سیلاژ ذرت تحت تاثیر افزودنی باکتریایی و پری‌بیوتیک

Table 6- The characteristics of Gas production of Corn silage influence bacterial and prebiotic additives

تیمار Treatment	پارامترهای تولید گاز Gas Production Parameters	
	A	C
شاهد Control	163.34 ^b	0.116 ^b
لالسیل Lalsil	173.43 ^b	0.144 ^a
پودر آب پنیر Whey	221.64 ^a	0.077 ^c
لالسیل و پودر آب پنیر W+L	151.25 ^c	0.125 ^b
اثر پودر آب پنیر		
فاقد پودر آب پنیر Without Whey	168.38	0.097
دارای پودر آب پنیر Whey	186.43	0.101
P value	<0.01	0.72
اثر لالسیل		
فاقد لالسیل Without Lalsil	192.37	0.096
دارای لالسیل With Lalsil	162.38	0.134
P value	<0.01	<0.01
اثر متقابل		
P value	<0.01	0.39
SEM	5.78	0.0066

A: پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر به ازای گرم ماده خشک)، C: نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت)، حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارهاست ($P < 0.05$).

A: Potential of gas production (ml/g DM), C: Gas production rate (ml/h), Means within same column with different superscripts differ $P < 0.05$.

بوکنری و مخلوط لالسیل با پودر آب پنیر روند افزایشی یافت. در آزمایشات هاشم‌زاده و همکاران (۱۲)، مهلا و همکاران (۱۷) و لشکری و همکاران (۱۶) که اثر منابع مختلف کربوهیدراتی را بر روی سیلاژ علوفه‌های متفاوت مورد بررسی قرار دادند، افزایش در تولید گاز در تیمار دریافت‌کننده منبع کربوهیدراتی نسبت به تیمار فاقد منابع کربوهیدرات گزارش شد.

نسبت اسیدهای چرب فرار مختلف تولید شده در شکمبه نشخوارکنندگان نقش تعیین‌کننده‌ای در خصوصیات تولیدی دارد (۲). به نظر می‌رسد SCFA تولید شده در شکمبه از طریق مسیر ورید باب بر ماهیچه‌های روده اثر بگذارد و با افزایش جذب منجر به تولید بهتری گردد (۲). افزایش میزان اسیدهای چرب فرار تولیدی در شکمبه می‌تواند باعث افزایش نگرانی‌ها در مورد pH شکمبه و ناهنجاری‌های مرتبط با آن و همچنین کاهش احتمالی تولید گردد.

افزودنی باکتریایی لاکتوباسیلوس بوکنری در ساعات اولیه آزمایش تغییرات چندانی در میزان گاز تولیدی ایجاد نکرد. در ساعت ۶ بیشترین میزان گاز تولیدی مربوط به تیمار پودر آب پنیر بود و کمترین مقدار آن را مخلوط افزودنی پری‌بیوتیکی و پروبیوتیکی به خود اختصاص دادند. در ساعت ۸ آزمایش بیشترین مقدار گاز تولیدی مربوط به لاکتوباسیلوس بوکنری و کمترین میزان آن را مخلوط افزودنی‌های پری‌بیوتیکی و پروبیوتیکی به خود اختصاص دادند. همچنین تیمار پودر آب پنیر در این ساعت کاهش اندکی در میزان گاز تولیدی نسبت به تیمار لاکتوباسیلوس بوکنری نشان داد که معنی‌دار نبود ($P < 0.05$) و این شرایط تا ساعت ۱۲ نیز ادامه داشت. در ساعت ۱۶ هیچ‌کدام از تیمارهای حاوی پودر آب پنیر و لاکتوباسیلوس بوکنری با هم معنی‌دار نبودند ($P < 0.05$). اما در ساعات ۲۴ تا ۹۶ میزان گاز تولیدی تیمار پودر آب پنیر نسبت به تیمار لاکتوباسیلوس

(۲۱). با افزایش میزان ماده آلی قابل تخمیر، میزان انرژی قابل متابولیسم و به تبع آن میزان کل اسیدهای چرب فرار افزایش می‌یابد (۱). در آزمایش حاضر به دلیل بالاتر بودن میزان تولید گاز در تیمار آب پنیر، غلظت انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و درصد ماده آلی قابل هضم بالاتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$) که همه اینها احتمالاً به دلیل تولید گاز بالاتر در این تیمار بود که ناشی از قند محلول بالا، هیدرولیز نسبی الیاف و پروتئین خام بالاتر می‌باشد. همچنین در تیمار لالسیل نیز غلظت انرژی قابل

متابولیسم، انرژی خالص شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و درصد ماده آلی قابل هضم بالاتر از گروه شاهد بوده اما از تیمار پودر آب پنیر کمتر بود ($P < 0.05$) که این امر احتمالاً به تولید گاز بالای این تیمار در ساعت ۲۴ نسبت به گروه شاهد برمی‌گردد. انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و درصد ماده آلی قابل هضم بالاتر از گروه شاهد بوده ($P < 0.05$) اما از تیمار پودر آب پنیر کمتر بود که دلیل احتمالی آن هیدرولیز نسبی الیاف و پروتئین خام در این تیمار نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۷- تأثیر سیلاژ ذرت بر فراسنجه‌های تخمین شده به روش تولید گاز

Table 7- The effect of Corn silage on Gas production parameters

	ME	NE _L	DOM	SCFA
شاهد Control	6.89 ^c	3.12 ^c	46.41 ^c	0.6717 ^c
لالسیل Lalsil	7.28 ^b	3.53 ^b	49.01 ^b	0.7368 ^b
پودر آب پنیر Whey	7.89 ^a	3.98 ^a	53.10 ^a	0.8213 ^a
لالسیل و پودر آب پنیر W+L	6.69 ^c	3.00 ^c	45.20 ^c	0.6332 ^c
اثر پودر آب پنیر				
فاقد پودر آب پنیر Without Whey	7.09	3.33	47.96	0.7043
دارای پودر آب پنیر Whey	7.24	3.49	49.12	0.7271
P value	0.67	0.54	0.71	0.59
اثر لالسیل				
فاقد لالسیل Without Lalsil	7.39	3.55	49.96	0.7465
دارای لالسیل With Lalsil	6.97	3.27	46.93	0.6852
P value	<0.01	0.03	<0.01	<0.01
اثر متقابل				
P value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
SEM	0.14	0.12	0.90	0.02

ME: انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM)، NE_L: انرژی ویژه شیردهی (MJ/kg DM)، SCFA: اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (mMol/200mgD)،

DOM: ماده آلی قابل هضم (%)

ME: Metabolizable energy (MJ/kg DM), NEL: Net energy for lactation (MJ/kg DM), SCFA: Short chain fatty acids (mMol/200mgD), DOM: Digestibility of organic matters(%)

نتیجه‌گیری کلی

افزایش پایداری هوازی سیلاژ ذرت می‌تواند موجب رسیدن سریع سیلاژ و بهبود پایداری سیلاژ حاصله در برابر فساد هوازی گردد. در مجموع استفاده از افزودن پودر آب و لالسیل می‌تواند موجب بهبود کیفیت سیلاژ ذرت حاصله گردند.

نتایج نشان داد که افزودن پودر آب پنیر با کاهش نرخ تولید پساب، افزایش پروتئین خام، کاهش الیاف و افزایش قابلیت هضم سیلاژ ذرت می‌تواند باعث بهبود ارزش غذایی سیلاژ ذرت برای دام گردد. همچنین افزودنی باکتریایی لالسیل با کاهش سریع pH و

- 1- Araba, A., F. M. Byers, and F. Guessous. 2002. Patterns of rumen fermentation in bulls fed barley/molasses diets. *Animal Feed Science and Technology*, 97(1):53-64.
- 2- Baytok, E., T. Aksu, M. A. Karsliandand, and H. Muruz. 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(2):469-474.
- 3- Church, D. C. 1984. *Livestock feeds and feeding* (No. Ed. 2). O & B Books, Inc.
- 4- Curtis, J. L. 1996. Effect of variety on the forage yield, ensiling characteristics, and nutritive value of alfalfa, and effects of cutting, stage of maturity, and silage additives on the preservation and nutritive value of alfalfa silage. a dissertation. Kansas State University. Department of Animal Science and Industry, Collage of Agriculture.
- 5- Dönmez, N., M. A. Karşlı, A. Çınar, T. Aksu, and E. Baytok. 2003. The effects of different silage additives on rumen protozoan number and volatile fatty acid concentration in sheep fed corn silage. *Small Ruminant Research*, 48(3):227-231.
- 6- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. Van Wikselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4):330-343.
- 7- Fedorah, P. M. and S. E. Hrudey. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environmental Technology*, 4(10):425-432.
- 8- Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 86(11):3575-3581.
- 9- Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5):1080-1086.
- 10- Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1998. The in vitro gas coupled with ammonia measurement for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1):87-95.
- 11- Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *The Journal of Agricultural Science*, 139(03):341-352.
- 12- Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, E. Ghasemi, A. Taghizadeh, S. Kargar, and W. Z. Yang. 2014. Interactive effects of molasses by homofermentative and heterofermentative inoculants on fermentation quality, nitrogen fractionation, nutritive value and aerobic stability of wilted alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(2):290-299.
- 13- Holzer, M., E. Mayrhuber, H. Danner, and R. Braun. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6):282-287.
- 14- Khorvash, M., H. Mohammadzadeh, and G. R. Ghorabni. 2014. Effects of treating corn silage with homo and hetero fermentative lactic acid bacteria on performances of Holstein dairy cattle. *Research on Animal Science*, 24(1):35-44. (In Persian).
- 15- Kung, L. 2000. *Silage Fermentation and additives*. Miller Publishing Co. Minnetonka, MN.
- 16- Lashkari, S., A. Taghizadeh, J. Seifdavati, and A. Z. M. Salem. 2014. Qualitative characteristics, microbial populations and nutritive values of orange pulp ensiled with nitrogen supplementation. *Slovak Journal of Animal Science*, 47:90-99.
- 17- Mahla, A. G., and I. M. Khalifa. 2007. The effect of molasses on quality of sorghum (*sorghum bicolor*) silage. *Research. Journal of Animal and Veterinary Science*, 2:43-46.
- 18- McAllister, T. A., R. Feniuk, Z. Mir, P. Mir, L. B. Selinger, and K. J. Cheng. 1998. Inoculants for alfalfa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Production Science*, 53(2):171-181.
- 19- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heren. 1991. *The biochemistry of silage*. 2nded. chalconbePub. Abersyth. U. K.
- 20- Nishino, N., M. Yoshida, H. Shiota, and E. Sakaguchi. 2003. Accumulation of 1, 2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5):800-807.
- 21- Parand, A., and A. Taghizadeh. 2010. Effects of treating method of barley grain on gas production. *Research on Animal Science*, 20(2):1-13. (In Persian).
- 22- Ranjit, N. K. and L. Kung. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 83(3):526-535.

- 23- Schmidt, R. J., W. Hu, J. A. Mills, and L. Kung. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 92(10):5005-5010.
- 24- Thomas, M. E., J. L. Foster, K. C. McCuiston, L. A. Redmon, and R. W. Jessup. 2013. Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of sorghum silage treated with inoculants. *Journal of Dairy Science*, 96(11):7120-7131.
- 25- Valizadeh, R., A. Naserian, and A. Azhdarifard. 2003. The Biochemistry of Silage. (In Persian).
- 26- Van Soest, P.V., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10):3583-3597.
- 27- Weinberg, Z. G., G. Ashbell, Y. Hen, and A. Azrieli. 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6):512-518.
- 28- Zahiroduddini, H., J. Baah, W. Absalom, and T. A. McAllister. 2004. Effect of an inoculant and hydrolytic enzymes on fermentation and nutritive value of whole crop barley silage. *Animal Feed Science and Technology*, 117(3):317-330.



The Effects of Bacterial Inoculant and Prebiotic Additive on Chemical Composition, Gas Production and Aerobic Stability of Corn Silage

S. Alaei Baher¹ - H. Mohammadzadeh^{2*} - A. Taghizadeh³ - A. Hoseinkhani⁴

Received: 30-03-2017

Accepted: 01-07-2017

Introduction Ensiling is a popular preservative method for forage crops and some byproducts. In this process water soluble carbohydrates in forages are converted into lactic acid with lactic acid bacteria and prevents nutrients losses by other microorganisms. Low dry matter in fresh forage may lead to higher losses of nutrients in effluent or fermentation process. Moreover, corn silage are susceptible to spoilages by fungi. Deteriorated silages are rich in mycotoxins and some other harmful components which may reduce dry matter intake, milk production and milk composition or may lead to some acute or chronic disease in ruminants. Whey powder is a product with high potential to water absorbents which may reduce effluent production at ensiling high moisture forages. *Lactobacillus buchneri* is a lactic acid producing bacteria which produce acetic acid while producing lactic acid. Acetic acid is an antifungal compound which may inhibit fungi development in silage. This study was conducted to determine the effects of whey powder and a lactic acid bacteria inoculant (*Lalsil Fresh*, containing *Lactobacillus Buchneri*) on chemical composition, pH, aerobic stability and in vitro digestibility of corn silage.

Materials and Methods The whole-crop corn was harvested at 1/2 milky maturity stage. Treatments were: 1. Control (corn silage without any inoculant), 2. Corn silage treated with whey powder (1% or 10 kg per ton fresh forage) 3. Corn silage treated with *Lalsil Fresh* at 1.8×10^6 colony forming unit per gram fresh forage and 4. Corn silage treated with whey powder (1% or 10 kg per ton fresh forage) and bacterial additive at 1.8×10^6 colony forming unit per gram fresh forage. The additives were solved in water and then sprayed over forages and mixed thoroughly. The same amount of water was applied to the control treatment. Laboratory PVC silos - 70 cm in height, 10 cm in diameter with a sink at the bottom for measurement of seepage were used for ensiling the whole corn crops. Corn forage was ensiled in triplicate laboratory mini silos for 90 days at room temperature and in the dark.

Results and Discussion Effluent production was lower and concentration of dry matter (DM) was higher in prebiotic and bacterial treated silages when compared to control ($P<0.05$). Lower effluent production from corn silage can inhibit environmental pollution and also retain nutrients in silage. Application of whey powder to corn silage resulted in silages with higher crude protein concentration and lower concentrations of cell wall compositions ($P<0.05$). The pH value of silages was lower in bacterial inoculated treatments ($P<0.05$) compared with control. This was maybe due to accelerated fermentation and rapid fall in pH. Treating corn silage with whey powder reduced aerobic stabilities of corn silages when they were exposed to the air ($P<0.05$) due to higher concentration of water soluble carbohydrates. But, treating corn silage with *Lalsil Fresh* improved the aerobic stabilities of corn silages in comparison with control group ($P<0.05$) due to higher ratio of acetate to lactate. Higher resistance of silage to spoilage can inhibit fungi from mycotoxin production and nutrients deterioration which led to better animal performance and health. The most potential of in vitro gas production and metabolisable energy (ME) concentration was measured in whey powder treatment ($P<0.05$). Also, treating corn silage with the bacterial inoculant resulted an increase in potential of in vitro gas production and ME concentration of corn silage ($P<0.05$). Higher energy content in corn silage may improve milk production and composition in dairy cattle.

Conclusion Results suggest that whey powder can improve nutritive value of corn silage by increasing dry matter and crude protein concentration and decreasing fiber. Also, Whey powder reduces effluent production

1- Msc student of Ruminant Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(*- Corresponding author email: hamidmhz@tabrizu.ac.ir)

from corn silage which consequently prevents environmental pollution. Bacterial inoculant improves corn silage resistance to spoilage by fast falling in pH and improvement of aerobic stability. Higher resistance to spoilage in corn silage can increase milk production and prevents mycotoxin related diseases and problems in ruminants. Both whey powder and bacterial inoculant improve metabolisable energy concentration of corn silage which may lead to higher production in ruminants.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus Buchneri*, Microbial Inoculant, Whey Powder, Yeasts

تعیین ارزش تغذیه‌ای هفت گونه از علف‌های هرز مزارع یونجه با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی

ملیحه داداشی^۱ - علی حسین خانی^{۲*} - حمید محمدزاده^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷

چکیده

هدف از انجام این تحقیق تعیین ارزش غذایی هفت گونه از علف‌های هرز موجود در مزارع یونجه شامل: تلخه، بومادران و ریش قوش از خانواده کاسنی، یونجه و شبدر شیرین از خانواده بقولات و دم روباهی، علف پشمکی و علف باغ از خانواده گندمیان بود. نمونه‌برداری از گونه‌های مورد مطالعه در مرحله برداشت یونجه از مزرعه (۱۰٪ گلدهی مزرعه) صورت گرفت. نمونه‌های برداشت شده در مزرعه به مدت ۷۲ ساعت هوا خشک شده و برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات شیمیایی، تخمیرپذیری و تجزیه‌پذیری نمونه‌ها با روش آزمایشگاهی تعیین شد. نتایج نشان داد که در بین گونه‌های مورد مطالعه از نظر ترکیبات شیمیایی تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت. یونجه با ۱۴/۳ و دم‌روباهی با ۸/۴ درصد بیشترین و کمترین مقدار پروتئین خام را در بین علوفه‌های مورد آزمایش داشتند. بیشترین و کمترین میزان دیواره سلولی مربوط به دم‌روباهی و شبدر شیرین به ترتیب با ۵۸/۷ و ۳۳/۸ درصد بود. ریش قوش و تلخه به ترتیب با ۲۸/۸ و ۱۹/۵ درصد بیشترین و کمترین میزان دیواره سلولی منهای همی سلولز را در بین گونه‌های مورد مطالعه داشتند. با مقایسه میزان گاز تولیدی حاصل از تخمیر علف‌های هرز و یونجه در ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون، یونجه و علف پشمکی به ترتیب با ۲۴۹/۷ و ۱۶۶/۴ میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک، بیشترین و کمترین میزان گاز تولیدی را به خود اختصاص دادند. در بین علوفه‌های مورد آزمایش بیشترین مقدار قابلیت هضم ماده آلی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مربوط به یونجه و شبدر شیرین بود. ناپدید شدن ماده خشک برای شبدر شیرین در ساعات مختلف انکوباسیون بیشتر از بقیه گونه‌ها بود. علف پشمکی کمترین میزان ناپدید شدن را در بین گونه‌های مورد مطالعه داشت. شبدر شیرین و علف پشمکی با ۳۲/۶ و ۲۳/۲ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار بخش سریع تجزیه‌پذیر ماده خشک را در بین علوفه‌ها داشتند. بخش با پتانسیل تجزیه‌پذیری کم و نرخ ناپدید شدن ماده خشک برای شبدر شیرین بیشتر از بقیه علوفه‌ها به جز یونجه بود. نتیجه کلی اینکه تفاوت بین ترکیبات شیمیایی، پتانسیل تولید گاز و تجزیه‌پذیری یونجه در مقایسه با علف‌های هرز بایستی در تنظیم جیره‌های غذایی نشخوارکنندگان مدنظر قرار گیرد اما آنچه مسلم است ارزش غذایی یونجه با توجه به نتایج به‌دست آمده قابل مقایسه با علف‌های هرز نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌پذیری، ترکیبات شیمیایی، علف‌های هرز مزارع یونجه، قابلیت هضم به روش آزمایشگاهی

مقدمه

هزینه تولید را هزینه خوراک دام تشکیل می‌دهد لزوم توجه به کیفیت خوراک بیشتر نمایان می‌شود (۴۱ و ۳۳). علی‌رغم تلاش‌هایی که در جهت افزایش تولیدات کشاورزی صورت گرفته، محصولات زراعی دائماً از سوی عوامل خسارت‌زا اعم از زنده و غیر زنده تحت تأثیر قرار گرفته است، که یکی از عوامل زنده تأثیرگذار در کاهش محصول، علف‌های هرز هستند. علی‌رغم روش‌های مختلف زراعی برای مبارزه با علف‌های هرز، برخی از آنها به‌عنوان عضو جدا نشدنی مزارع بوده و لاجرم توسط دام استفاده می‌شوند (۲۰). به‌طور کلی فرض بر این است که علف‌های هرز دارای ارزش غذایی کم می‌باشند و دام قادر به استفاده از آن نخواهد بود، بنابراین اقدامات وقت‌گیر و پرهزینه جهت کنترل آنها صورت می‌گیرد. اما بسیاری از علف‌های هرز ممکن است

با افزایش رشد جمعیت جهانی نیاز به تأمین خوراک انسان خصوصاً از منابع حیوانی، راندمان افزایش وزن دام و تولیدات آن افزایش چشمگیری پیدا کرده است (۳۱). در این میان تغذیه دام از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا با توجه به اینکه بیش از ۶۰ درصد

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه تبریز

۲- دانشیار دانشگاه تبریز

۳- استادیار دانشگاه تبریز

(*)- نویسنده مسئول: Email: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.62498

دمروباهی^۵، علف باغ^۶ و علف پشمکی^۷ از خانواده گندمیان انتخاب شدند. این گیاهان در مرحله گلدهی مزرعه به روش تصادفی در اواخر خرداد و اوایل تیر از یک سانتی متری سطح خاک قطع شدند (۲ و ۴). نمونه گیری از کل سطح مزرعه صورت گرفت. مقدار علوفه برداشت شده از هرگونه بیش از چهار کیلوگرم بود که به مدت ۷۲ ساعت در مزرعه مستقیماً در معرض هوای آزاد قرار گرفته و خشک شدند و پس از خشک شدن، خرد و کاملاً مخلوط گردید.

آزمایشات تجزیه شیمیایی: ترکیبات شیمیایی نمونه ها با روش های تجزیه، AOAC (۱) تعیین شد. درصد ماده خشک (DM) با استفاده از آون ۱۰۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت، درصد پروتئین خام (CP) با روش کج لال از طریق محاسبه درصد نیتروژن نمونه ها، الیاف نامحلول در پاک کننده خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در پاک کننده اسیدی (ADF) توسط دستگاه آنکوم و کیسه های مخصوص آن اندازه گیری شد (۳۰).

اطلاعات حاصل از روش های تجزیه شیمیایی توسط نرم افزار SAS (۳۲) با رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری طرح به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij} \quad (1)$$

Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، t_i اثر تیمار، e_{ij} خطای آزمایش، مقایسه میانگین ها به روش دانکن صورت گرفت.

اندازه گیری تخمیر پذیری گونه های مورد آزمایش: برای اندازه گیری میزان تولید گاز حاصل از تخمیر از روش فدوراک و هرودی (۹) استفاده شد. برای هر نمونه خوراکی ۵ تکرار در نظر گرفته شد. به منظور تصحیح گاز تولیدی با منشأ میکروبی (مایع شکمبه) تعداد ۵ عدد شیشه بدون آنکه نمونه هایی از مواد خوراکی (بالانک) در آن ریخته شود در نظر گرفته شد. ۳۰۰ میلی گرم از هر نمونه آسیاب شده با غربال ۲ میلی متری در داخل شیشه های ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد. مایع شکمبه حدود ۲ ساعت بعد از خوراک وعده صبحگاهی از گوسفندان فیستوله دار که با جیره پایه به مدت یک ماه تغذیه شده اند، جمع آوری شده و با پارچه نخی ۴ لایه ای، صاف و در داخل فلاسک محتوی گاز کربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. قبل از انتقال مایع شکمبه به داخل شیشه های سرم به نسبت ۱:۲ (یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت بافر) با بافر مرک دوگال (۱۹) مخلوط شد. شیشه های سرم قبل از انتقال مایع شکمبه و بافر، جهت جلوگیری از شوک حرارتی، به مدت نیم ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد گرم شده بودند. در هر شیشه حاوی تیمار آزمایشی، مقدار ۲۰ میلی لیتر از مخلوط مایع

غنی از مواد مغذی بوده و قابلیت هضم بالایی داشته باشند (۲۶). در بسیاری از موارد با آموزش حیوان برای خوردن علف های هرز قبل از اینکه به مرحله تولید بذر برسد می توان از تکثیر آن جلوگیری نموده و جمعیت علف های هرز را پایین نگه داشت. این روش می تواند حتی به اندازه علف کش ها مؤثر باشد و کیفیت علوفه مصرفی حیوان را نیز بهبود بخشد و همچنین می تواند باعث صرفه جویی در هزینه تولید خوراک شود (۴۲). حسن نژاد (۱۲) با شناسایی و تهیه نقشه پراکنش علف های هرز مزارع یونجه استان آذربایجان شرقی با استفاده از سامانه اطلاعات جغرافیایی (GIS) نشان داد که علف پشمکی، ریش قوش، دمروباهی، علف باغی و تلخه به ترتیب در ۶۶/۷، ۷۷/۸ و ۶۷/۷، ۳۳/۳ و ۲۲/۲ درصد مزارع یونجه منطقه وجود دارند. براساس این گزارش، تنها ۵ علف هرز فوق الذکر در حدود ۱۵ درصد از تراکم سطح مزرعه یونجه را به خود اختصاص داده بودند که رقم قابل توجهی بوده و معمولاً در چین اول به همراه بسته های یونجه وارد چرخه مصرف در واحدهای دامداری می شوند. با توجه به این موضوع به نظر می رسد که مصرف این علف های هرز در حیوانات مزرعه ای غیر قابل اجتناب می باشد. لذا به نظر می رسد اولین و مهمترین اقدام در راستای استفاده از علف های هرز مزارع علوفه به عنوان خوراک حیوان، بررسی کیفیت تغذیه ای آنها باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی ترکیبات شیمیایی و گوارش پذیری هفت گونه از علف های هرز معمول در مزارع یونجه با استفاده از روش های آزمایشگاهی به منظور تعیین ارزش تغذیه ای آنها و مقایسه آنها با کیفیت غذایی گیاه یونجه بود.

مواد و روش ها

گونه های مختلفی از علف های هرز مزارع یونجه در ابتدا، از مزارع یونجه دانشگاه تبریز منطقه کرکج واقع در هشت کیلومتری شرق تبریز تهیه گردید. مزرعه کرکج دارای طول جغرافیایی ۱۷' و ۴۵° و عرض جغرافیایی ۵' و ۳۷° و ارتفاع ۱۳۶۰ متر بالاتر از سطح آب های آزاد می باشد. آب و هوای این منطقه در زمره اقلیم های استپی و نیمه خشک جهان با تابستان خشک است که به ندرت در تابستان های آن بارندگی روی می دهد. میانگین بارندگی سالانه ۲۷۱ میلی متر گزارش شده است. خاک منطقه از نوع شن لومی بوده و هدایت الکتریکی عصاره خاک (EC) حدود ۰/۵۲ دسی زیمنس بر متر مربع است. pH خاک در حدود ۷/۳ و ماده آلی آن در حدود ۰/۸ درصد می باشد (۱۵). هفت گونه از علف های هرز مزارع یونجه شامل: تلخه^۱، بومادران^۲ و ریش قوش^۳ از خانواده کاسنی، شیدرشیرین^۴ از خانواده بقولات و

1- *Acroptilon repens*

2- *Achillea millefolium*

3- *Crepis sancta*

4- *Melilotus officinalis* (L.) Pall.

5- *Alopecurus myosuroides*

6- *Dactylis glomerata*

7- *Bromus tectorum*

ساعت به همراه ۳ عدد شیشه شاهد از انکوباتور خارج و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شده و قسمت شناور آن را جدا کرده و قسمت باقیمانده آن با بافر که حاوی فسفات هیدروژن سدیم به مقدار ۵/۹ گرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۷۶ گرم، نمک طعام ۷/۲ گرم و آب مقطر که به حجم یک لیتر رسانیده شده شستشو و باز به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید و مجدداً قسمت شناور جدا شده و باقیمانده به آن منتقل و پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، ماده خشک اندازه‌گیری شده و میزان ناپدید شدن ماده خشک آن‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۳۷).

(۷) (ماده خشک نمونه = ناپدید شدن ماده خشک اولیه) $\times 100$ / {میانگین ماده خشک شاهد} - (ماده خشک باقیمانده بعد از آون) - (ماده خشک اولیه)
برای تعیین میزان ناپدید شدن ماده خشک در ساعت صفر از کیسه‌های نایلونی استفاده شد به طوری که ۳ گرم از ماده غذایی در کیسه ریخته و پس از شستشو در زیر آب، میزان ماده خشک ناپدید شده محاسبه شد. برای محاسبه تجزیه‌پذیری مؤثر از فرمول (۸) استفاده شد.

$$ED = a + (b \times c / c + r) \quad (8)$$

که در آن a میزان تجزیه‌پذیری بخش محلول، b میزان تجزیه‌پذیری بخش نامحلول، c نرخ ثابت تجزیه و r نرخ عبور (از نرخ عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت استفاده شد) می‌باشد. مدل آماری مورد استفاده در روش تولید گاز و تعیین میزان تجزیه‌پذیری به روش آزمایشگاهی طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار برای تولید گاز و ۳ تکرار برای ناپدید شدن ماده خشک به روش آزمایشگاهی بود. مدل آماری به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij} \quad (9)$$

که در آن Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، t_i اثر تیمار، e_{ij} خطای آزمایش بود. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SAS و رویه ANOVA استفاده شد و فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شامل بخش محلول، بخش با تجزیه‌پذیری آهسته و نرخ ثابت تجزیه، با استفاده از رویه NLIN محاسبه شدند. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی علوفه‌های مورد مطالعه: نتایج تجزیه

تقریبی علوفه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در جداول ۱ و ۲ گزارش شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، گندمیان بیشترین بقولات کمترین ماده خشک را داشتند ($P < 0.05$). با توجه به اینکه تمامی نمونه‌ها تحت شرایط یکسانی هوا خشک شده بودند لذا به‌نظر

شکمه و بافر افزوده شد و پس از تزریق گاز کربنیک و بی-هوازی نمودن محیط داخل شیشه، درب آنها با استفاده از درپوش پلاستیکی و پرس فلزی بسته شد و در نهایت، قرائت و ثبت میزان گاز تولیدی حاصل از تخمیر مواد خوراکی در فواصل زمانی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۷۲ و ۹۶ ساعت (۳۸) در دستگاه انکوباتور شیکر صورت گرفت. با استفاده از فرمول (۲) میزان حجم گاز تولیدی براساس وزن نمونه ماده خوراکی در هر زمان تصحیح گردید.

$$V = (V_t - V_b) \times 100 / W \quad (2)$$

در این معادله V حجم گاز تصحیح شده برحسب میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک، V_t حجم گاز تولیدی در شیشه‌های حاوی ماده خوراک برحسب میلی‌لیتر، V_b حجم گاز تولیدی در شیشه‌های فاقد ماده خوراکی برحسب میلی‌لیتر و W وزن نمونه ماده غذایی برحسب میلی گرم ماده خشک می‌باشد. برای پرازش داده‌های تولید گاز از مدل زیر استفاده شد (۲۵)

$$P = B (1 - e^{-ct}) \quad (3)$$

که در آن P تولید گاز در زمان t ، B پتانسیل تولید گاز، c ثابت نرخ تجزیه، t زمان تخمیر (ساعت) و e عدد نپر 2.718 می‌باشد. درصد قابلیت هضم ماده آلی (OMD)، انرژی خالص شیردهی (NE_L) و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۱۷، ۳۶).

$$OMD (\% DM) = 12/88 + 0.931GP + 1/932CF + 0.309CP + 0.511CA \quad (4)$$

$$SCFA (mmol) = 0.222GP - 0.0425 \quad (5)$$

$$NE_L (MJ/100gDM) = 0.101GP + 0.51CP + 0.112CF \quad (6)$$

در این معادلات GP تولید گاز حاصل مقدار ۲۰۰ میلی گرم نمونه خوراک پس از ۲۴ ساعت؛ CP، CF و CA به ترتیب پروتئین خام، چربی خام و خاکستر (درصد) می‌باشند.

میزان ناپدید شدن ماده خشک به روش آزمایشگاهی:

در روش ناپدید شدن ماده خشک به روش آزمایشگاهی، مرحله اول تعیین تجزیه‌پذیری ماده غذایی همانند مرحله اول تولید گاز بود. به‌طوری که ۳۰۰ میلی گرم از خوراک مورد استفاده را وزن کرده و در داخل شیشه‌های مخصوص ریخته شد. شیشه‌های حاوی نمونه به ۶ سری زمانی شامل ساعت‌های ۲، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با ۳ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد و سپس به طریقه‌ای که در تولید گاز ذکر شده مخلوط مایع شکمه و بافر اضافه شده و در انکوباتور قرار داده شد. برای هر سری زمانی گروه شاهد فاقد نمونه ماده غذایی محتوی ۲۰ میلی لیتر از مخلوط مایع شکمه و در سه تکرار در انکوباتور قرار داده شد. این نمونه‌ها جهت تعیین تجزیه‌پذیری ماده خشک مورد استفاده قرار گرفتند. شیشه‌های سری اول پس از ۲

می‌رسد گندمیان تمایل بیشتری به نگهداری رطوبت خود پس از برداشت دارند. دم روباهی و تلخه بیشترین و کمترین مقدار خاکستر (Ash) را در بین گونه‌های مورد مطالعه داشتند ($P < 0.05$). همچنین همسو با ماده خشک، گندمیان بالاترین میزان خاکستر را نیز دارا بودند. به دلیل اینکه این گونه گیاهان مقادیر بالایی از عنصر سیلیس را دارا می‌باشند (۲۸) لذا دارا بودن خاکستر بالا دور از انتظار نخواهد بود (۱۸). از لحاظ پروتئین خام (CP)، یونجه بیشترین مقدار را در بین علوفه‌های مورد آزمایش داشت و در مرتبه بعدی شبدر شیرین و تلخه قرار گرفتند و کمترین مقدار CP مربوط به دم روباهی بود. به طور کلی گیاهان تیره بقولات با میانگین ۱۳/۹ درصد بالاترین و گندمیان با میانگین ۹/۸ درصد کمترین CP را داشتند ($P < 0.05$). بیشترین و کمترین مقدار دیواره سلولی (NDF) مربوط به گونه دم‌روباهی و شبدر شیرین بود (جدول ۱). مقدار دیواره سلولی منهای همی سلولز (ADF) ریش قوش نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر بود که می‌تواند منجر به قابلیت هضم پایین‌تر این گونه شود. تلخه، شبدر شیرین و یونجه نیز دارای ADF پایین‌تری نسبت به سایر گونه‌ها بودند ($P < 0.05$). مقادیر CP و NDF به‌دست آمده در این مطالعه برای علف باغ، علف پشمکی و بومادران با مقادیر به‌دست آمده توسط ارزیابی و همکاران (۲ و ۴) مطابقت ندارد. این محققین مقادیر CP علف باغ، علف پشمکی و بومادران را به ترتیب ۸/۵، ۶/۷ و ۶/۲ درصد و مقادیر NDF را برای علف باغ، علف پشمکی و بومادران به ترتیب ۵۱/۸، ۵۴/۵ و ۴۹/۳ درصد گزارش نمودند، همچنین مقدار NDF به‌دست آمده برای علف باغ در این مطالعه با داده‌های حشمتی و همکاران (۱۳) که مقدار آن را ۶۳/۳ درصد گزارش کرده‌اند مطابقت ندارد. شورنگ و نیکخواه (۳۴) میزان Ash، DM، CP، EE، NDF و ADF علف پشمکی را به ترتیب ۹۲/۱، ۹۲/۲، ۱۹/۸، ۱/۶، ۳۹/۹ و ۳۵/۸ درصد گزارش کردند. پایین بودن CP یونجه در بررسی حاضر، حاصل آسیب وارده توسط آفت سرخرطومی می‌باشد که عموماً چین اول یونجه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶ و ۲۹). ارزیابی و همکاران (۳) در مطالعه‌ای که بر روی گیاهان مراتع زاگرس انجام دادند مقدار CP علف پشمکی، علف باغ و یونجه را در مرحله گلدهی به ترتیب ۸/۶، ۸/۷ و ۱۵/۹ درصد گزارش کردند که با مقدار به‌دست آمده در این مطالعه تفاوت دارد. این محققین مقدار ADF را برای علف پشمکی، علف باغ و یونجه به ترتیب ۴۱/۸، ۴۵/۲ و ۳۴/۲ درصد گزارش کردند که از مقادیر به‌دست آمده در این مطالعه بیشتر می‌باشند.

ترکیبات شیمیایی سه خانواده گونه‌های گیاهی مورد بررسی در جدول ۲ مورد مقایسه قرار گرفته است. خانواده بقولات بیشترین میزان CP و کمترین مقدار NDF را به‌خود اختصاص دادند. ارزیابی و همکاران (۳) گزارش کردند که CP در گونه‌های خانواده بقولات بیشتر است که می‌تواند به دلیل ویژگی‌های فیزیولوژیکی،

مورفولوژیکی و آناتومیکی مختص هر گونه گیاهی باشد که آن را از سایر گونه‌ها متمایز می‌کند. این محققین همچنین گزارش کردند که علوفه‌های خانواده بقولات به‌طور معمول علوفه با کیفیت مطلوب‌تری نسبت به گندمی‌ها تولید می‌کنند چرا که NDF و ADF کمتری در مقایسه با گندمیان دارند. زیاد بودن درصد برگ در گیاه تلخه می‌تواند دلیل اصلی بالاتر بودن CP آن باشد که با نتایج ارزیابی و همکاران (۳) و هولچک و همکاران (۱۱) مطابقت دارد. مک دونالد و همکاران (۱۸) گزارش کردند که هرچه میزان NDF و ADF بیشتر باشد میزان CP کاهش و در نتیجه میزان ارزش علوفه‌ای کاهش می‌یابد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد و علوفه‌هایی همچون دم‌روباهی و ریش قوش با دارا بودن مقادیر بالاتر NDF و ADF، میزان CP کمتری از بقیه گونه‌ها داشتند. در کل علت تفاوت‌های مشاهده شده بین مطالعات مختلف با مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل متفاوت بودن شرایط محیطی رشد علوفه (خاک و آب)، تفاوت در نحوه نمونه‌برداری، شرایط آب و هوایی (۵)، واریته و مرحله برداشت و چین (۳۵) باشد.

آزمایشات تخمیر (تولید گاز): داده‌های مربوط به تولید گاز حاصل از تخمیر علوفه‌های مورد آزمایش در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون، در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود در زمان‌های مختلف بعد از انکوباسیون، علوفه‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری در میزان گاز تولیدی حاصل از تخمیر داشتند ($P < 0.05$). در ۲ ساعت اول انکوباسیون، شبدر شیرین با ۱۵/۷ میلی‌لیتر گاز به ازای هر گرم ماده خشک بیشترین و علف پشمکی با تولید ۶/۹۳ میلی‌لیتر به ازای هر گرم ماده خشک کمترین میزان تولید گاز حاصل از تخمیر را دارا بودند که این می‌تواند به دلیل دیر تخمیر بودن محتویات دیواره سلولی و عدم کلنی‌سازی باکتری‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی بر روی ذرات غذایی در ساعات نخست انکوباسیون باشد. در ۴ ساعت پس از انکوباسیون یونجه نسبت به سایر گونه‌ها بیشترین مقدار تولید گاز را به خود اختصاص داد و علف پشمکی کمترین مقدار گاز تولیدی را داشت که این روند تا انتهای انکوباسیون ادامه داشت به‌طوری که یونجه و علف پشمکی بیشترین و کمترین میزان تخمیر را در ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون داشتند البته میزان گاز تولیدی شبدر شیرین تا انتهای تخمیر با یونجه برابری می‌کند ($P < 0.05$) (جدول ۳). بالا بودن میزان تولید گاز یونجه می‌تواند به دلیل بالا بودن میزان کربوهیدرات‌های قابل تخمیر و همچنین مقدار پروتئین محلول در آن‌ها و تأمین نیتروژن مورد نیاز برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌های تخمیرکننده مواد غذایی باشد (۳۸).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی علوفه‌های مورد مطالعه^۱ (n=104) (%)
Table 1- Chemical composition of studied forage¹ (n=104) (%)

خانواده The family	گونه‌های مورد مطالعه The studied plants	ماده خشک DM ²	خاکستر Ash	پروتئین CP ³	چربی خام EE ⁴	دیواره سلولی NDF ⁵	دیواره سلولی منهای همی سلولز ADF ⁶
بقولات Fabaceae	یونجه <i>M. sativa</i>	87.5 ^c	5.9 ^d	14.3 ^a	6.1 ^e	35.5 ^f	23.9 ^{bc}
	شیدر شیرین <i>M. Officinalis</i>	88 ^c	7 ^c	13.3 ^b	7.5 ^c	33.8 ^g	23.6 ^c
کاسنی Asteraceae	بومادران <i>A. Repens</i>	86.8 ^c	7.5 ^c	10.3 ^{de}	3.5 ^f	38.7 ^d	25.4 ^b
	تلخه <i>A. Millefolium</i>	92.2 ^b	5.8 ^d	13.2 ^b	9 ^b	36.8 ^e	19.5 ^d
	ریش قوش <i>C. Sancta</i>	87.7 ^c	6.9 ^c	9.5 ^e	7.1 ^{cde}	45 ^c	28.8 ^a
گندمیان Poaceae	علف باغ <i>D. Glomerata</i>	93.3 ^{ab}	10.4 ^b	11.3 ^c	7.4 ^{cd}	58.3 ^a	27.8 ^a
	دم روباهی <i>A. Myosuroides</i>	93.6 ^a	11.8 ^a	8.4 ^f	11 ^a	58.7 ^a	27.9 ^a
	علف پشمکی <i>B. Tectorum</i>	92.5 ^{ab}	7.5 ^c	9.9 ^e	6.3 ^{de}	54.89 ^b	28.25 ^a
میانگین اشتباه استاندارد SEM ⁷		0.410	0.314	0.182	0.348	0.325	0.573
سطح معنی‌داری P- value		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

۱- حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

1- Means within the same column with different superscript letters were significantly different (p<0.05)

2- Dry Matter, 3- Crude Protein, 4- Ether Extract, 5- Neutral Detergent Fiber, 6- Acid Detergent Fiber, 7- Standard error of mean

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی تیره‌های علوفه‌ای مورد مطالعه^۱ (درصد)
Table 2- Chemical composition of studied forage family¹ (%)

خانواده/ پارامترها The family/parameters	بقولات Fabaceae	گندمیان Poaceae	کاسنی Asteraceae	میانگین خطای استاندارد SEM ²	سطح معنی‌داری p- value
ماده خشک Dry Matter	87.4±0.2 ^b	93.3±0.5 ^a	88.9±2.7 ^b	0.41	0.0177
خاکستر Ash	6.5±0.6 ^b	9.9±2 ^a	6.7±0.7 ^b	0.46	0.0397
پروتئین خام Crude Protein	13.9±0.6 ^a	9.8±1.3 ^b	11±1.7 ^b	0.49	0.0306
چربی خام Ether Extract	6.7±0.7	5.2±2.2	6.5±2.4	0.73	0.5965
دیواره سلولی Neutral Detergent Fiber	34.6±1 ^b	57.3±2 ^a	40.2±3.8 ^b	0.94	0.0002
دیواره سلولی منهای همی سلولز Acid Detergent Fiber	23.7±0.4 ^a	28±1.2 ^a	24.5±4.1 ^a	0.91	0.2137

۱- حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

1- Means within the same raw with different superscript letters were significantly different (p<0.05)

2- Standard error of mean

منصوری و همکاران (۲۱) میزان تولید گاز حاصل از انکوباسیون علف یونجه به مدت ۹۶ ساعت را ۲۵۰ میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک و

ماده خشک تعیین شده است. تنوع در نتایج می‌تواند ناشی از اختلافات گونه، وارسته و شرایط نگهداری علف یونجه باشد. البته به دلیل آسیب ناشی از آفت سرخرطومی، میزان پروتئین یونجه در آزمایش حاضر ۱۴/۳ درصد بود (جدول ۱) که مقدار پایینی برای یونجه به‌شمار می‌رود و می‌تواند بر تخمیر و میزان گاز تولیدی تأثیر منفی بگذارد.

جدول ۳- میانگین گاز تولیدی علوفه‌های مورد آزمایش^۱ (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)

Table 3- Average gas production of studied forage¹ (ml/g DM)

گونه‌های مورد مطالعه plants experimental	زمان انکوباسیون (ساعت) incubation time (h)										
	2	4	6	8	12	16	24	36	48	72	96
یونجه <i>M. sativa</i>	13 ^{ab}	38.4 ^a	73 ^a	88.9 ^a	118.1 ^a	155.5 ^a	189.7 ^a	214.1 ^a	220.9 ^a	239.4 ^a	249.7 ^a
شبدرد شیرین <i>M. Officinalis</i>	15.7 ^a	37.6 ^{ab}	70.6 ^a	84.7 ^a	108 ^b	139.6 ^b	172.5 ^b	195.6 ^b	211.1 ^b	222.7 ^b	231.5 ^b
بومادران <i>A. Repens</i>	13.9 ^a	34.9 ^{abc}	62.9 ^b	67.6 ^b	85.5 ^c	117.9 ^c	140.7 ^c	161.8 ^c	171.6 ^c	184.5 ^c	191.1 ^c
تلخه <i>A. Millefolium</i>	11.3 ^{ab}	26.8 ^{de}	55 ^{cd}	60.2 ^b	79.14 ^{cd}	110.7 ^d	140.9 ^c	160.5 ^c	171.2 ^c	182.9 ^c	191.4 ^c
ریش قوش <i>C. Sancta</i>	12 ^{ab}	29.3 ^{cd}	61.2 ^b	62.3 ^b	73.9 ^d	100.2 ^e	125.7 ^d	142.8 ^{ef}	153.5 ^{de}	162.1 ^{ef}	170 ^{ef}
علف باغ <i>D. Glomerata</i>	12.5 ^{ab}	32.2 ^{bcd}	63.3 ^b	65.6 ^b	76.9 ^{cd}	107.8 ^d	130.2 ^d	148.9 ^{de}	160.2 ^{de}	171.2 ^{de}	179.4 ^{de}
دم روباهی <i>A. Myosuroides</i>	12.6 ^{ab}	29.3 ^{cd}	58.2 ^{bc}	64 ^b	80.6 ^{cd}	111.5 ^{cd}	138.6 ^c	156.5 ^{cd}	168.8 ^{cd}	179.9 ^{cd}	186.5 ^{cd}
علف پشمکی <i>B. Tectorum</i>	6.9 ^b	22.7 ^e	50.4 ^d	51.9 ^c	62.2 ^e	90.9 ^f	124.4 ^d	138.2 ^f	147.4 ^f	158.1 ^f	166.3 ^f
میانگین خطای استاندارد SEM ²	0.789	0.812	0.784	1.104	1.166	0.930	1.155	1.320	1.313	1.349	1.422
سطح معنی‌داری P-value	0.1329	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

۱- حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

1- Means within the same column with different superscript letters were significantly different ($p < 0.05$)

2- Standard error of mean

میکروبی در شکمبه را فراهم کنند. این محققین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سطوح پروتئین خام، تولید گاز و قابلیت هضم مواد آلی گزارش نمودند. بنابراین مقادیر کمتر از ۱۰ درصد CP موجود در مواد خوراکی می‌تواند سبب کاهش فعالیت میکروبی در شکمبه گردد و در نتیجه کاهش تخمیرپذیری آنها را در پی داشته باشد. در مطالعه حاضر دم‌روباهی، ریش قوش و علف پشمکی به ترتیب با ۹/۵۴ و ۹/۹۴ گرم در ماده خشک CP (جدول ۱) در تأمین نیتروژن مناسب برای تخمیر باکتریایی با مشکل مواجه بودند. مقادیر پایین گاز تولیدی در این گیاهان نیز مؤید این نکته می‌تواند باشد. فراسنجه‌های مربوط به

گیاهان خانواده گندمیان و کاسنی میانگین تولید گاز کمتری را در سراسر طول دوره انکوباسیون نسبت به خانواده بقولات داشتند ($P < 0.05$) (جدول ۵) که این نتایج را می‌توان مربوط به ویژگی‌های ساختمانی آنها دانست. مرتنز (۲۳) گزارش کرد نسبت آرایینوز به زایلوز در بقولات بیشتر است در نتیجه زودتر تجزیه می‌شوند. در بقولات زمان تأخیر کمتر بوده و سرعت هضم بیشتری دارند ضمن اینکه لیگنین و بخش غیرقابل هضم کمتری در مقایسه با گندمیان دارند. نورتون (۲۴) گزارش نمودند که مواد خوراکی باید حداقل حاوی ۱۰ درصد CP باشند تا آمونیاک مورد نیاز برای فعالیت‌های مطلوب

از مصرف خوراک می‌تواند بالا باشد چرا که یکی از مهمترین عوامل در هضم علوفه بحث اتصال میکروارگانیزم‌ها به علوفه، تخمیر آن و تکثیر جمعیت میکروبی می‌باشد. لذا این روند می‌تواند در میزان هضم آنها موثر باشد.

بیشترین مقادیر تخمینی از OMD، SCFA و NE_I مربوط به یونجه و کمترین آنها مربوط به ریش قوش بود ($P<0.05$). کمتر بودن میزان تولید گاز، OMD و سایر پارامترهای تولید گاز علف پشمکی و دم‌روباهی و ریش قوش در عین حال می‌تواند به بیشتر بودن میزان NDF و ADF آنها نیز مربوط باشد. میزان SCFA موجود در یونجه بیشتر از سایر گونه‌ها می‌باشد که به دلیل تولید گاز بیشتر در ۲۴ ساعت اول انکوباسیون می‌باشد.

تولید گاز و مقادیر تخمینی OMD، SCFA و NE_I در جدول ۴ گزارش گردیده است. بیشترین پتانسیل تولید گاز (a+b) مربوط به یونجه بعد از آن به شیدرشیرین و تلخه اختصاص داشت و کمترین آن مربوط به علف پشمکی از خانواده گندمیان بود ($P<0.05$). احتمالاً سرعت بالای تولید گاز در خانواده بقولات تحت تأثیر کربوهیدرات‌های قابل تخمیر می‌باشد که به سهولت در دسترس جمعیت میکروبی قرار می‌گیرد و انرژی بیشتری را برای رشد و تکثیر میکروارگانیزم‌ها تأمین می‌کند بنابراین باعث بیشتر شدن پتانسیل تولید گاز شده است (۷) همچنین همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سطح پروتئین خام، تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی وجود دارد (۳۷) که نتایج این تحقیق هم مؤید این مطلب می‌باشد. تمامی علوفه‌های مورد بررسی، نرخ تولید گاز تقریباً برابری با یونجه دارند (جدول ۴). اهمیت این موضوع به‌خصوص در ساعات اولیه تخمیر شکمبه‌ای پس

جدول ۴- فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از گونه‌های مورد مطالعه^۱Table 4- Gas production parameters of the studied species¹

گونه‌های مورد مطالعه Species	فراسنجه‌ها Parameters				
	پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر در گرم ماده خشک) a+b (ml/g DM) ²	نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت) c (ml/h) ³	قابلیت هضم ماده آلی (%) OMD (%) ⁴	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی مول) SCFA (mmol) ⁵	انرژی خالص شیردهی (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) NE _I (MJ/KgDM) ⁶
یونجه <i>M. sativa</i>	252.8 ^a	0.06 ^a	69.5 ^a	0.86 ^a	5.30 ^a
شیدر شیرین <i>M. Officinalis</i>	226.8 ^b	0.06 ^a	67.8 ^b	0.77 ^b	5.07 ^b
بومادران <i>A. Repens</i>	187.4 ^c	0.06 ^a	63.7 ^c	0.61 ^c	4.53 ^c
تلخه <i>A. Millefolium</i>	188.7 ^c	0.06 ^a	67.2 ^b	0.61 ^c	4.47 ^c
ریش قوش <i>C. Sancta</i>	165.7 ^{ef}	0.05 ^b	54.8 ^f	0.53 ^e	3.68 ^e
علف باغ <i>D. Glomerata</i>	175.5 ^{de}	0.06 ^a	60.3 ^d	0.57 ^d	4.04 ^d
دم روباهی <i>A. Myosuroides</i>	183.6 ^{cd}	0.06 ^a	57.7 ^e	0.57 ^d	3.95 ^d
علف پشمکی <i>B. Tectorum</i>	166 ^f	0.05 ^b	49.7 ^g	0.541 ^e	3.42 ^f
میانگین خطای استاندارد SEM ⁷	1.48	8.57	0.27	0.003	0.021
سطح معنی‌داری P-value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

۱- حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

1- Means within the same column with different superscript letters were significantly different ($p<0.05$)

2- Potential of gas production, 3- Fractional rate of gas production 4- Organic Matter Digestibility, 5- Small Chain Fatty Acids, 6- Net Energy for Lactation, 7- Standard error of mean

جدول ۵- میانگین مقدار گاز تولیدی و فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از تیره‌های علوفه‌ای مورد آزمایش^۱Table 5- Average amount of gas production and related parameters for the studied forage family¹

خانواده / زمان (ساعت) Time(h) /family	بقولات Fabaceae	گندمیان Poaceae	کاسنی Asteraceae	میانگین خطای استاندارد SEM ⁷	سطح معنی‌داری p-value
2	14.7±1.80	10.7±3.2	12.4±1.4	0.79	0.315
4	38±0.59	29±6.1	29.4±2.7	1.41	0.123
6	71.8±1.68 ^a	57.3±6.7 ^b	59.4±3.8 ^b	1.61	0.047
8	86.8±2.94 ^a	60.3±7.3 ^b	63.4±3.8 ^b	1.80	0.006
12	113±7.14 ^a	73.2±9.6 ^b	79.6±5.8 ^b	2.60	0.006
16	147.5±11.2 ^a	103.4±11 ^b	109.6±8.9 ^b	3.42	0.012
24	181.1±12.1 ^a	132±7.1 ^b	135.7±8.2 ^b	2.99	0.003
36	204.8±1 ^a	147.8±9.2 ^b	155±10.6 ^b	3.54	0.004
48	222±15 ^a	158.8±10.8 ^b	165.44±10.4 ^b	3.79	0.004
72	236±18.9 ^a	236±18.8 ^b	176.5±12.5 ^b	4.49	0.006
96	245±50.2 ^a	177.4±10.2 ^b	184.5±11.7 ^b	4.26	0.005
فراسنجه‌های تولید گاز					
Parameters of gas production					
پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر در گرم ماده خشک) a+b (ml/g DM) ²	251.9±1.6 ^a	175.8±12 ^b	186.5±21.1 ^b	0.64	0.0001
نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت) c (ml/h) ³	0.06±0.008 ^a	0.055±0.002 ^b	0.06±0.003 ^a	0.22	0.0127
قابلیت هضم ماده آلی (%) OMD (%) ⁴	68.3±0.8 ^a	63.7±3.2 ^b	54.1± 3.5 ^c	0.12	0.0001
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی مول) SCFA (mmol) ⁵	0.82±0.05 ^a	0.59±0.02 ^b	0.55± 0.03 ^c	0.001	0.0001
انرژی خالص شیردهی (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) NE _L (MJ/ KgDM) ⁶	5.23±0.18 ^a	4.34±0.25 ^b	3.68±0.23 ^c	0.009	0.0001

۱- حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

1- Means within the same raw with different superscript letters were significantly different (p<0.05)

2- Potential of gas production, 3- Fractional rate of gas production, 4- Organic matter digestibility, 5- Small chain fatty acids, 6- Net energy for lactation, 7- Standard error of mean

بررسی داشت (P<۰/۰۵). این تیره گیاهی همچنین بیشترین OMD، SCFA و NE_L را نیز دارا بود (P<۰/۰۵). همان‌گونه که در بررسی گیاهان این تیره‌ها به‌صورت منفرد (جدول ۳ و ۴) نیز بیان شد این تفاوت می‌تواند ناشی از سطوح بالاتر پروتئین در این تیره گیاهی (جدول ۱) و در نتیجه فراهمی نیتروژن برای رشد و تکثیر باکتری‌ها باشد. نشان داده شده است که میزان تولید گاز با NDF همبستگی منفی اما با میزان کربوهیدرات محلول همبستگی مثبت دارد (۶).

میزان ناپدید شدن ماده خشک با روش آزمایشگاهی:

میزان ناپدید شدن ماده خشک و همچنین ضرایب مربوطه در گونه‌های مورد مطالعه در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به نتایج ارائه شده در زمان صفر انکوباسیون، شبدشیرین و یونجه بیشترین علف پشمکی و ریش قوش کمترین میزان ناپدید شدن ماده خشک را دارا بودند (P<۰/۰۵). این ارقام با نتایج حاصل از تولید گاز (جدول ۳) همخوانی کامل دارد.

شورنگ و نیکخواه (۳۴) OMD یونجه را ۶۵/۱ درصد گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر یعنی ۶۹/۵ درصد مطابقت دارد. همچنین تقی‌زاده و همکاران (۳۸) میزان a+b برای یونجه را ۲۵۴/۱۶ میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک و نرخ تولید گاز را ۰/۰۶۳ میلی‌لیتر در ساعت گزارش کرده‌اند ماهری و همکاران (۲۲) میزان (a+b) را برای یونجه ۶۹/۶ درصد و OMD را ۷۱/۲ درصد تعیین کردند که با نتایج این آزمایش قرابت دارند که می‌تواند به این دلیل باشد که تولید گاز در این مطالعات با تولید گاز تحقیق حاضر تقریباً برابر است. حسینی‌نژاد و همکاران (۱۴)، a+b را برای دمروباهی ۸۶/۴۶ درصد، نرخ تولید گاز را ۰/۰۵۸ درصد در ساعت و میزان OMD را ۶۹/۲۶ درصد تعیین نمودند.

میانگین مقدار گاز تولیدی و فراسنجه‌های تولید گاز حاصل از تیره‌های علوفه‌ای مورد آزمایش در جدول ۵ گزارش شده است. تیره بقولات بیشترین میزان تخمیرپذیری را در بین تیره‌های گیاهی مورد

جدول ۶- میزان ناپدید شدن ماده خشک (درصد) و فراسنجهای مربوطه در گونه‌های مورد مطالعه^۱
Table 6- Dry matter disappearance (%) and related parameters for the studied species¹

گونه‌های مورد مطالعه	زمان انکوباسیون (ساعت)								فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری			تجزیه‌پذیری موثر		
	incubation period (h)								Degradability parameters			Effective degradability		
	0	2	12	24	48	72	96	بخش محلول Soluble fraction (%)	بخش کند تجزیه‌پذیر Slowly degradable fraction (%)	ثابت نرخ تجزیه Degradation rate (%/h)	ثابت نرخ عبور Passage rate (%/h)			
Studied forages												0.02	0.05	0.08
یونجه <i>M. sativa</i>	24.1 ^{ab}	30.6 ^a	36.4 ^a	42.7 ^{ab}	46.8 ^{ab}	48.7 ^a	51.9 ^a	31.2 ^a	20 ^b	0.062 ^a	47.5 ^a	43.1 ^a	40.6 ^a	
شیر شیرین <i>M. Officinalis</i>	25.3 ^a	31.5 ^a	38 ^a	45.1 ^a	49.9 ^a	51.1 ^a	54.6 ^a	32.5 ^a	21.50 ^a	0.058 ^{ab}	47.4 ^a	43.3 ^a	41 ^a	
پوداران <i>A. Repens</i>	22.1 ^c	26.9 ^{bc}	31.9 ^{bc}	37.2 ^{cd}	41.4 ^{cd}	42.4 ^b	44.7 ^b	27.6 ^c	17.2 ^c	0.045 ^{cd}	39.6 ^c	35.8 ^c	33.9 ^{cd}	
تلخه <i>A. Millefolium</i>	23.9 ^b	28.6 ^b	33.5 ^b	39.3 ^{bc}	43.2 ^{bc}	43.9 ^b	46.9 ^b	29.4 ^b	18.6 ^c	0.050 ^{cb}	42.9 ^b	38.8 ^b	36.7 ^b	
ریش قوش <i>C. Sancta</i>	18.9 ^e	22.9 ^{ef}	26.8 ^d	31 ^c	34 ^c	36.9 ^c	38.1 ^c	23.2 ^c	14.7 ^e	0.031 ^e	32.2 ^e	28.9 ^e	27.4 ^e	
علف باغ <i>D. Glomerata</i>	21 ^{cd}	25.4 ^{cd}	31.4 ^c	35.9 ^{cde}	40.4 ^{cd}	42.2 ^b	44.5 ^b	26.3 ^{cd}	16.6 ^d	0.038 ^{de}	37.3 ^{cd}	33.6 ^{cd}	31.8 ^{cd}	
دم روهایی <i>A. Myosuroides</i>	20.2 ^d	24.7 ^{de}	30.1 ^c	34.2 ^{cde}	38.2 ^{de}	40.1 ^{bc}	43 ^b	25.4 ^d	15 ^e	0.048 ^{bcd}	36 ^d	32.8 ^d	31.1 ^d	
علف پشمکی <i>B. Tectorum</i>	18.6 ^e	22.2 ^f	26.6 ^d	31.8 ^{de}	34.5 ^e	35.8 ^c	37.2 ^c	23.2 ^e	14 ^e	0.030 ^e	31.6 ^e	28.4 ^e	27 ^e	
میانگین خنثای استاندارد	0.328	0.359	0.368	0.973	0.950	0.980	0.783	0.985	1.853	0.0059	1.340	1.179	1.094	
SEM														
سطح معنی‌داری	0.001	0.001	0.001	0.0002	0.001	0.0001	0.001	0.0001	0.0009	0.0003	0.0002	0.0003	0.0001	
P-value														

۱- Means within the same column with different superscript letters were significantly different (p<0.05).

۱- حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد است.

جدول ۷- میانگین ناپدید شدن ماده خشک (درصد) و فراسنجه‌های مربوطه برای تیره‌های علوفه‌ای مورد مطالعه^۱Table 7- Average disappearance of dry matter (%) and related parameters of the studied forage family¹

خانواده/ زمان (ساعت) Time(h) /family	بقولات Fabaceae	گندمیان Poaceae	کاسنی Asteraceae	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح معنی داری p-value
0	24.74±0.93 ^a	19.9±1.2 ^b	21.6±2.34 ^b	1.69	0.0001
2	31.03±1.26 ^a	24.1±1.81 ^b	26.1±2.62 ^b	2.06	0.0001
12	37.18±1.47 ^a	30±2.31 ^b	30.7±3.17 ^b	2.53	0.0001
24	43.92±5.12 ^a	33.99±2 ^b	35.8±3.88 ^b	3.677	0.0001
48	48.33±4.62 ^a	37.7±2.66 ^b	39.5±4.32 ^b	3.86	0.0001
72	50.16±4.79 ^a	39.4±2.87 ^b	41.1±3.29 ^b	3.57	0.0001
96	53.29±4.05 ^a	41.6±3.57 ^b	43.3±4.02 ^b	3.86	0.0001
فراسنجه‌های تجزیه پذیری Degradability parameters					
بخش محلول (درصد) Soluble fraction (%)	31.9±1.61 ^a	25±1.59 ^b	26.8±2.78 ^b	2.13	0.0001
بخش کند تجزیه پذیر (درصد) Slowly degradable fraction (%)	20.8±1.03 ^a	15.2±1.25 ^b	16.9±1.87 ^b	1.47	0.001
نرخ ثابت تجزیه (درصد در ساعت) Degradation rate (% / h)	0.06±0.005 ^c	0.039±0.009 ^a	0.042±0.10 ^b	0.009	0.0007
نرخ عبور (درصد در ساعت) Passage rate (% / h)	تجزیه پذیری موثر (%) Effective degradability (%)				
r =0.02	47.5±1.74 ^a	35±2.73 ^b	38.2±4.81 ^b	3.52	0.0001
r =0.05	43.2±1.82 ^a	31.6±2.55 ^b	34.5±4.49 ^b	3.31	0.0001
r =0.08	40.8±1.81 ^a	29.9±2.37 ^b	32.7±4.19 ^b	3.10	0.0001

۱- حروف غیر یکسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

1- Means within the same raw with different superscript letters were significantly different (p<0.05)

مراحل انکوباسیون از نظر عملکرد تجزیه پذیری در شکمبه با یونجه برابری می‌کند. به نظر می‌رسد دلیل بالا بودن بخش محلول و فراهم بودن مواد مغذی سهل الوصول برای باکتری‌ها، در ابتدای آزمایش تجزیه سریع علوفه‌ها انجام شده و در ادامه هضم باقی آن که بیشتر دیواره سلولی بوده دچار نقصان شده و با روند کندتری ادامه یافته است، لذا در این علوفه‌ها بخش دارای تجزیه پذیری آهسته نسبتاً بیش از سایر گونه بود. البته نایستی از این واقعیت چشم پوشی نمود که به دلیل قابلیت هضم بالای ماده آلی این علوفه‌ها در مقایسه با سایر گونه‌های مورد آزمایش (جدول ۴)، طبیعی است که سهم قابل توجهی از آنها در طول زمان و با روند کندتری تجزیه شوند. همانطور که انتظار می‌رفت علف پشمکی کمترین میزان ثابت نرخ تجزیه پذیری (c) را بین علوفه‌های مورد آزمایش دارا بود ضمن اینکه کمترین میزان بخش محلول و کند تجزیه را نیز دارا بود (جدول ۶) ($P<0.05$). طباطبائی و همکاران (۳۴) دلیل پایین بودن تجزیه پذیری برخی علوفه‌ها را به غلظت بالای NDF مرتبط می‌دانند و معتقدند که با افزایش غلظت NDF قابلیت هضم آن کاهش می‌یابد. این محققین عنوان نمودند غلظت بالای NDF مانع از شکسته شدن آن و در

به نظر می‌رسد این تفاوت ناشی از کمتر بودن NDF و بیشتر بودن میزان کربوهیدرات‌های قابل تخمیر شیدر شیرین و یونجه باشد تفاوتی که در ابتدای آزمایش یعنی در زمان صفر به وجود آمده تا انتهای زمان هضم یعنی تا ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون ادامه یافت به طوری که در ساعت آخر انکوباسیون، شیدر شیرین و علف پشمکی به ترتیب بیشترین و کمترین تجزیه پذیری را دارا بودند ($P<0.05$). در طول مدت انکوباسیون روند رو به رشد ناپدید شدن ماده خشک در بین گونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تغییر جمعیت باکتری‌های شکمبه در طول انکوباسیون و به دنبال آن افزایش نرخ تجزیه و هضم نمونه‌های آزمایشی می‌باشد. بخش سریع‌التجزیه ماده خشک (a) در خانواده بقولات مورد بررسی یعنی شیدر شیرین و یونجه به طور معنی داری بیشتر از سایر گونه‌های مورد آزمایش بود (جدول ۷) ($P<0.05$). این امر می‌تواند به دلیل کمتر بودن میزان NDF و ADF در این گونه‌ها باشد. البته باید در نظر داشت که قسمت عمده‌ای از این بخش را مواد محلول تشکیل می‌دهند. همچنین شیدر شیرین به همراه یونجه بیشترین میزان بخش دارای تجزیه پذیری آهسته (b) را دارا بودند. شیدر شیرین در تمام

اول در جیره حیوانات پر تولید استفاده نمود چرا که سطوح بالای مصرف خوراک در این حیوانات را به دلیل تجزیه‌پذیری موثر پایین، محدود نموده و لذا حیوان نخواهد توانست پتانسیل تولیدی خود را نشان دهد (جدول ۷).

در نهایت نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که برخی از علفهای هرز از جمله شبدر شیرین و تلخه می‌تواند از نظر ارزش تغذیه‌ای هم ردیف با یونجه قرار گیرند. نتایج حاصل از ترکیبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری به روش آزمایشگاهی و روش تولید گاز نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای نسبتاً بالای این گیاهان و نزدیک به یونجه است. این تحقیق نشان داد گیاهانی که تحت عنوان علف هرز در مزارع یونجه وجود دارند می‌توانند به عنوان بخشی از علوفه توسط حیوانات مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرد اما برای تعیین سطح مناسب مصرف این علوفه‌ها و میزان عملکرد و بازده تولیدی دام آزمایشات حیوانی مورد نیاز است.

نتیجه سبب کاهش نفوذ میکروبی می‌گردد. هر چه میزان نرخ عبور یا (I) مواد از شکمبه افزایش می‌یابد، میزان تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک گونه‌های مورد آزمایش کاهش می‌یابد. این امر کاملاً طبیعی است چراکه زمان دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به مواد غذایی و در نتیجه هضم آنها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به‌طور کاملاً مشخصی نرخ عبور تحت تأثیر سطح غذای مصرفی می‌باشد. میزان نرخ عبور برای مصرف خوراک در حد نگهداری برابر 0.02 و در حد دو برابر نگهداری 0.05 و اگر غذای مصرفی به میزان بیشتر از دو برابر نیاز نگهداری باشد، سرعت خروجی مواد از شکمبه برابر 0.08 خواهد بود. بقولات در تمامی نرخ‌های عبور، تجزیه‌پذیری مؤثر بالاتری از سایر تیره‌های علوفه‌ای دارا بودند (جدول ۷) ($P < 0.05$). این به این مفهوم است در حیوانات پرتولید که ضرورت دارد از علوفه با کیفیت بالا استفاده شود این تیره گیاهی برای حیوان مناسب‌تر است. با توجه به گستردگی علف‌های هرز در مزارع یونجه، و به دلیل قابلیت هضم پایین این علوفه‌ها در مقایسه با یونجه، نبایستی از علوفه‌های چین

منابع

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th edition. Association of official analytical chemists Washington, D.C.
2. Arzani, H., A. Ahmadi, H. Azarniv, and A. A. Jafari. 2007. Determination and composition of forage quality of five species in different phenological stages. Journal of Agricultural Science, 37(2):303-311. (In Persian).
3. Arzani, H., M. Basiri, F. Khatibi, and G. Ghorbani. 2006. Nutritive value of some zagros mountain rangeland species. Small Ruminant Research, 65: 128-135.
4. Arzani, H., N. Charehsaz, A. A. Jafari, and H. Azarnivan. 2011. Survey of the impact of the form and growth stage on forage quality of nine range species in central Alborz (case study: Taleghan). Watershed Management Research Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 87: 81-87. (In Persian).
5. Burns J. C., D. S. Fisher, and H. F. Mayland. 2007. Diurnal shifts in nutritive value of alfalfa harvested as hay and evaluated by animal intake and digestion. Crop science, 47: 2490.
6. Coblenz, W. K., S. E. Nellis, P. C. Hoffman, B. Hallm, P. J. Weimer, N. M. Esser, and G. M. Bertram. 2013. Unique interrelationships between fiber composition, water soluble carbohydrates, and *in vitro* gas production for fall-grown oat forages. Journal of Dairy Science, 96: 7195-7209.
7. Datt, C. and G. Singh. 1995. Effect of protein supplementation on *in vitro* digestibility and gas production of wheat straw. Indian Journal of Dairy Science, 48: 357-361.
8. Elizalde, J. C., N. R. Merchen, and O. B. Faulkner. 1999. *In situ* dry matter and crude protein degradation of fresh forages during the spring growth. Journal of Dairy Science, 82: 1978-1990.
9. Fedorak, P. and D. Hruddy. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. Environmental Technology Letters, 4 (10): 425-432.
10. Getachew, G., G. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishna moorthy, B. Singh, and M. Spanghero. 2002. Laboratory variation of 24h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 102 (1-4): 169-180.
11. Holechek J. L., C. H. Herbel, and R. D. Pieper. 2001. Rang Management. West View Press, USA. 520.
12. Hasannejad, S. 2010. Weed identification and mapping of alfalfa East Azerbaijan province using Geographical Information System (GIS). University of Tehran. PhD thesis.
13. Heshmati, G. A., M. Baghani, and O. Bazrafshan. 2007. Comparison of nutritional values of 11 rangeland species in eastern part of Golestan province. Pajouhesh and Sazandegi, 73: 90-95. (In Persian).
14. Hoseinnejad, Z., M. Yousefeli, and H. Fazaeli. 2013. Determination of nutritive value of five dominant species of halophyte plants in Sistan. Journal of Animal Science of Iran, 43(1): 1-10. (In Persian).
15. Jafarzadeh, A. A. 1999. Detailed studies of 26 acres of land and soils. Agricultural Research Station, University of Tabriz. College of Humanities and Social Sciences. 2, 3 and 4: 16-29.
16. Karimi, H. 1995. Iran weeds. Center of Academic Publishing, First edition.
17. Kilic, U. and B. Z. Saricicek. 2008. Potential nutritive value of some forage used in ruminant nutrition in Northern

- Turkey. Livestock Research for Rural Development, 20(5).
18. McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, C. A. Morgan, L. A. Sinclair, and R. G. Wilkinson. 2012. Animal Nutrition. 6th edition. (Translated by Rashid Soofi Siawash). Amidi Publication, Tabriz. 655-678.
 19. McDougall, E. I. 1948. The composition and output of sheep in saliva. Biochemical Journal, 43:99-109.
 20. Mafi, H. 2014. Agricultural Engineering- cultivation. Director of Agro-Industry and Animal Husbandry plain Zrnngyn. <http://www.crop.blogsky.com/category/cat-11>. (In Persian).
 21. Mansouri, H., A. Nikkhah, M. Rezaeian, M. Moradi, and S. A. Mirhadi. 2003. Determination of forage degradation and gas production technique using nylon bags. Journal of Agricultural Sciences of Iran, 32(2):495-507. (In Persian).
 22. Maheri, N., A. R. Safaei, A. Mirzaei Aghsaghli, A. M. Aghazadeh, and M. R. Dastoori. 2007. Use of *in vitro* gas production technique to compare nutritive value of quackgrass and for ruminants. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6 (12): 1351-1356.
 23. Mertens, D. R. 1993. Kinetics of cell wall digestion and passage in ruminants. American Society of Agronomy, pp. 535-570
 24. Norton, B. W. 2003. The nutritive value of tree legumes. In: Forage tree legumes in tropical agriculture (Ed. R. C. Gutteridge and H. M. Shelton) pp:1-10. Available in website: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/publicat/gutt-shel/x5556e0j.htm>.
 25. Orskov, E. R. and M. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92: (2) 499-503.
 26. Ozzie abaye, A., S. Guillermo, and T. Chris. 2009. The Nutritive Value of Common Pasture Weeds and Their Relation to Livestock Nutrient Requirements .Virginia Cooperative Extension, Virginia State University.
 27. Paya, H. 2007. Determine the digestion of some foods with methods of *in vivo*, *in situ* and *in vitro*. MSc Thesis, University of Tabriz. (In Persian).
 28. Rabii, M. 2012. Identification of range plants. Payam Nour Publications. Pp 124.
 29. Radosevich, S. R., J. S. Holt, and C. M. Ghersa. 2007. Ecology of weeds and invasive plants. John Wiley and Sons, Inc. Third edition.
 30. Riasi, A., A. A. Resani, H. Naimipour, and M. H. Fathi. 2010. Comparison of two methods for analyzing the forages and by-products neutral detergent fiber and acid detergent fiber. Journal of Animal Science Research, 19 (1): 91-103. (In Persian).
 31. Saadat-Noori, M. and Siah-Mansoor, S. 1992. Sheep Husbandry and Management. Ashrafi Publication, Tehran, PP.135-136.
 32. SAS Institute Inc. 2003. SAS Users Guide. SAS Institute, Cary, NC.
 33. Shafiee Varzaneh, H. Nutrition of livestock and poultry. <http://salimin.blogfa.com/8808.aspx>. Accessed Feb 1, 2017.
 34. Shawrang, P., and A. Nikkhah. 2008. The estimation of dry matter and cell wall degradability some of range forages using gas production and nylon bags techniques. Journal of Agricultural Sciences of Iran. 38 (1): 57-66. (In Persian).
 35. Shikhahmadi, H., A. Azafar, and S. Mohammadzadeh. 2013. Chemical compositions, energy contents and *in situ* dry matter, crude protein and organic matter degradability of second harvest alfalfa samples from Kurdistan province. Journal of Animal Science Research, 23. 3. 88-99.
 36. Steingass H, K. P. Aiple, and W. Drochner. 1979. Estimation of organic matter digestibility and ME content in ruminant feeds from *in vitro* gas production. Session 17- forage quality. Institute of Animal Nutrition (450) Hohenheim University, D-70593 Stuttgart, Germany. ID NO. 1169. Pp: 17-79.
 37. Taghizadeh A, 2004. Determination of fermentation characteristics of forage source with the nylon bag and gas production technique. Proceeding of the Canadian Society of Animal Science, p: 134.
 38. Taghizadeh, A., H. Janmohamadi, and M. Besharati. 2012. Estimation of degradation and fermentation Characterization of some feedstuffs using *in situ* and *In vitro* techniques. Journal of Animal Science Research, 23.2(4): 1-16. (In Persian).
 39. Tabatabaee, S. M. M., B. Najafnejad, P. Zamani, A. Taghizadeh, A. Ahmadi, and H. A. Arab. 2011. Estimate of chemical composition, degradability and gas production of Persian clover in different harvesting stages. Journal of Animal Science Research, 21. 2: 255-264. (In Persian).
 40. Wang, Y., P. Frotus, M. Y. Gruber, H. Ray, and T. A. McAllister, 2006. *In vitro* ruminal digestion of anthocyanidin-containing alfalfa transformed with the miazec regulatory gene. Canadian Journal of Plant Science, 86: 1119-1130
 41. Walter. R. 1984. Rationnement Pratique de la Vache laitiere, de la chevre et des ovins. Translated by Houshang Saedi. University of Tehran Publications. Pp, 156.
 42. Voth, K. S. 2009. Demonstrating how trained, weed-eating cattle train herd mates as a tool to enhance weed management. GLCI Final Report. Available at: <http://www.livestockforlandscapes.com/GLCI>.



Determination of Nutritive Value of Seven Species of Alfalfa Weeds Using *in vitro* Techniques

M. Dadashi¹ - A.Hosseinkhani^{2*} - H. Mohammadzadeh³

Received: 12-03-2017

Accepted: 08-11-2017

Introduction: Weeds constantly invade crop fields and pastures. It is frequently assumed that weeds have low nutritive value and livestock will not eat weeds, so expensive and time consuming methods are often used for their control. Some weeds are toxic or poisonous for livestock, and certain weeds are unpalatable – causing a reduction in total intake. Weeds also compete with cultivated crops and forages for moisture, light, and nutrients, but many weeds are nutrient-rich and digestible. There are large numbers of weeds which are consumed by animals as forage. A study with geographic information system (GIS) in the east Azerbaijan province of Iran, showed that *Bromus tectorum*, *Crepis sancta*, *Alopecurus myosuroides*, *Dactylis glomerata* and *Acroptilon repens* were found in 77.8, 66.7, 67.7, 33.3 and 22.2 percent of alfalfa fields respectively. Based on this report only five species of the mentioned weeds consist of about 15 percent of total forages production area at the first cut of alfalfa fields which are harvested and used in the farms as livestock feed. Nonetheless, preliminary results suggest that weeds can play a significant role in livestock industry if their chemical composition and nutritional quality is well known. The main goal of present study was to evaluate nutritional value of seven common species of alfalfa field weeds using *in vitro* techniques.

Material and methods: Seven species of alfalfa field weeds including: *Crepis sancta*, *Achillea millefolium* and *Acroptilon repens* from family of Asteraceae, *Melilotus officinalis* (L.) Pall. from family of Fabaceae and *Bromus tectorum*, *Dactylis glomerata* and *Alopecurus myosuroides* from family of poaceae were harvested from alfalfa field at 10 percent blooming. The samples were dried in 60° oven for 48 hours and grounded to pass through a 2-mm screen. Chemical composition of weeds was determined according to prescribed procedures of AOAC (2003). Neutral detergent fiber (NDF) was measured by method of Van-Soest et al. 1991. Rumen fluid was obtained from three fistulated ghezel male lambs before morning feeding. The lambs were fed twice daily at maintenance level. Dry matter fermentation of each weed was determined using *in vitro* gas production technique. Potential of gas production, organic matter digestibility, small chain fatty acid production and net energy of lactation (NEL) were calculated from the results of gas production. *In vitro* disappearance of forages was measured.

Result and discussion: Alfalfa and *Alopecurus myosuroides* had the highest and lowest crude protein (CP) content respectively (14.3 vs 8.4 %) ($P<0.05$). *Alopecurus myosuroides* and *Melilotus officinalis* (L.) Pall had the highest and lowest NDF content respectively (58.7 vs 33.8 %) ($P<0.05$) and *Crepis sancta* and *Acroptilon repens* had the highest and lowest ADF content respectively (28.8 vs 19.5 %) ($P<0.05$). *Alopecurus myosuroides* had the highest amount of ether extract (i.e. 10.99) and Ash (11.83%) and lowest organic matter content (88.17 % of DM) among the studied forages. Fermentation experiment revealed that *fabaceae* family had the highest potential of gas production (252 ml/g DM), organic matter digestibility (68.3%), short chain fatty acid production (0.82 mmol) and NE_l (5.2 MJ $Kg^{-1}DM$) ($P<0.05$). Conversely, *Asteraceae* family had the lowest amount of organic matter digestibility (54.1%), short chain fatty acid production (0.55 mmol) and NE_l (3.7 MJ $Kg^{-1}DM$) ($P<0.05$). Among the individual forages and weeds after the alfalfa, *Melilotus officinalis* had the highest potential of gas production (227 ml/g DM), organic matter digestibility (67.8%), short chain fatty acid production (0.77 mmol) and NE_l (5.7 MJ $Kg^{-1}DM$) ($P<0.05$), however many of weeds had the same fractional rate of gas production with alfalfa. Accordingly based on the *in vitro* disappearance experiment, the mentioned family had the highest degradability parameters including soluble and slowly degradable fractions (31.8 and 20.8 % respectively), degradation rate (0.06 % / h) and effective degradability (47.4 %) ($P<0.05$).

Conclusion: According to the results of the present research, it seems that the studied plants can be use as

1- MSc graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

2- Associated professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

3- Assistant professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

(* - Corresponding author email: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir)

part of ration for ruminant animals. But due to low digestibility and higher NDF content, these forages may limit voluntary feed intake. Maximizing dry matter intake is one of the main goals especially in high producing animals. Therefore considering that many alfalfa field have high proportion of weeds in the first cut, it is recommended that first cut of alfalfa not used in the ration of high producing animals.

Key words: Alfalfa field weeds, Chemical composition, Degradation, *In vitro* digestibility

اثرات اسید چرب لینولئیک کونژوگه (CLA) در جیره مرغان تخم‌گذار بر عملکرد تولید و صفات کیفی تخم‌مرغ در دما و زمان‌های مختلف نگهداری آن

سیدعلی میرقلنج^{۱*} - لیلا فتح الله زاده^۲ - روح الله کیانفر^۳ - مجید علیایی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۳

چکیده

در آزمایشی، اثرات سطوح مختلف اسید چرب لینولئیک کونژوگه^۴ در جیره مرغان تخم‌گذار پس از دوره تولک بری بر عملکرد تولید و صفات کیفی تخم‌مرغ در دما و زمان‌های مختلف نگهداری تخم‌مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش اول، تعداد ۶۰ قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن در سن ۷۸ هفتگی در قالب طرح کاملاً تصادفی به ۳ تیمار با ۵ تکرار اختصاص داده شدند. در جیره شاهد، از CLA استفاده نشد ولی در جیره‌های ۲ و ۳ به ترتیب از ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد CLA خالص استفاده شد. نتایج نشان داد در کل دوره (۴ هفته)، درصد تولید و توده تخم‌مرغ پرنده‌گانی که با ۰/۵ درصد CLA تغذیه شده بودند، نسبت به تیمارهای دیگر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ولی صفات کیفی تخم‌مرغ‌ها تحت تأثیر قرار نگرفت. در آزمایش دوم، نمونه‌هایی از تخم‌مرغ در دماهای اتاق و یخچال در زمان‌های مختلف نگهداری و بررسی کیفیت داخلی آنها نشان داد با افزایش سطح CLA و کاهش دما و زمان نگهداری، واحد هاو افزایش و pH سفیده کاهش یافت. اثرات متقابل سطح CLA با زمان و دمای نگهداری روی pH سفیده معنی‌دار بود و در تخم‌مرغ‌هایی که در دما و مدت زمان بالای نگهداری، از CLA در جیره استفاده شده بود، pH سفیده پایین‌تر از تیمارهای بدون CLA بود. نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از CLA تا سطح ۰/۵ درصد جیره در دوره پس از تولک، توانست علاوه بر تأثیر مثبت بر عملکرد تولید، تغییرات pH و واحد هاو تخم‌مرغ‌ها را در طول دما و زمان‌های مختلف تا حدودی کنترل کند.

واژه‌های کلیدی: تولک بری، دمای نگهداری، لینولئیک کونژوگه، مرغ تخم‌گذار، واحد هاو

مقدمه

لبنی دارای بیشترین مقادیر CLA می‌باشند که این CLA از محصولات حد واسط بیهیدروژناسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر غیراشباع است که توسط باکتری‌های موجود در شکمبه مانند باکتری بی‌هوازی بوتیری و بی‌ریوفیبروسولونس انجام می‌شود (۲۵). یکی از چالش‌های اصلی در زمینه CLA، ابداع روشی مناسب برای تولید انبوه ایزومرهای CLA است. اسید لینولئیک کونژوگه تجاری حاصل از ایزومریزاسیون قلیایی لینولئیک اسید در شرایط تجاری است که می‌تواند در محیط‌های آبی و یا در مجاورت حلال‌های مختلف با استفاده از کاتالیزور تولید شود. گزارشات محدودی در مورد اثرات سطوح مختلف CLA بر عملکرد تولید در مرغان تخم‌گذار وجود دارد. چریان و همکارانش (۸) نشان دادند استفاده از ۰/۲۵ درصد CLA در جیره مرغان تخم‌گذار نتوانسته تأثیری بر عملکرد تولید تخم‌مرغ داشته باشد ولی برخی دیگر از تحقیقات اثرات مثبت آن را بر صفات تخم‌گذاری مرغان تخم‌گذار گزارش کرده‌اند (۱). در مورد اثرات استفاده از CLA بر صفات کیفی تخم‌مرغ مرغان تخم‌گذار نیز محققانی مانند بلوک باشی و ارهان (۵) تغییرات معنی‌داری را در

لینولئیک اسید کونژوگه یا CLA به گروهی از ایزومرهای موضعی و هندسی اسید چرب لینولئیک (۶-۱۸:۲ n) گفته می‌شود که پیوندهای دوگانه به‌وسیله یک پیوند منفرد از یکدیگر جدا می‌شوند. ایزومرهای سیس-۹، ترانس-۱۱ و ترانس-۱۰، سیس-۱۲ از اهمیت بیشتری برخوردارند (۱۴). برای مثال فعالیت ضد سرطانی سیس-۹، ترانس-۱۱ تولیدشده توسط بیفیدوباکتریوم بریو بر سرطان روده بزرگ به اثبات رسیده است (۹). فرآورده‌های دامی مانند شیر و محصولات

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه (استادیار سابق گروه علوم دامی دانشگاه تبریز)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه طیور دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*) نویسنده مسئول: Email: a_mirghelenj@yahoo.com

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.60928
4- Conjugated linoleic acid (CLA)

و ۳ به ترتیب از ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد CLA خالص استفاده شد. کلیه جیره‌های آزمایشی نیز به مدت ۴ هفته در اختیار مرغان تخم‌گذار قرار گرفت.

روشنایی سالن حدود ۳۰ لوکس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود و مرغ‌ها روزانه در دو نوبت بر اساس انرژی قابل متابولیسم دریافتی یکسان برای همه جیره‌ها، جیره‌های آزمایشی را دریافت کردند. هر هفته پس از جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها، مصرف خوراک، درصد تولید تخم‌مرغ، میانگین وزن و توده تخم‌مرغ رکوردبرداری شد. در انتهای دوره، پس از جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها، درصد تولید تخم‌مرغ، میانگین وزن و توده تخم‌مرغ رکوردبرداری شد. هر دو هفته یکبار نیز تخم‌مرغ‌ها جهت بررسی کیفیت داخلی تخم‌مرغ‌ها جمع‌آوری شد. برای محاسبه درصد زرده و سفیده، ابتدا باید زرده و سفیده هر تخم‌مرغ توزین می‌شد. برای توزین زرده، باید زرده از شالاز و سفیده کاملاً جداسازی می‌شد. بدین منظور شالاز توسط گیره گرفته شده و به صورت دستی، سفیده جدا شده و توزین شد و سپس توسط ترازوی الکترونیکی، وزن زرده محاسبه و سپس بر اساس وزن تخم‌مرغ اولیه، درصد وزن سفیده و زرده تعیین شد. پس از تعیین وزن دقیق هر تخم‌مرغ، تخم‌مرغ شکسته و زرده و سفیده آنها جدا و سفیده‌ها به درون بشقاب صاف و تمیز منتقل شدند و سپس توسط نوک ارتفاع‌سنج (دستگاه هاو) در فاصله یک سانتی‌متری از انتهای زرده قرار گرفته و ارتفاع متناسب سفیده محل برخورد با انتهای سه پای تنظیم و عدد مربوطه قرائت و برحسب میلی‌متر گزارش گردید. پس از تعیین ارتفاع سفیده و بر اساس وزن همان تخم‌مرغ، طبق رابطه (۱) زیر واحد هاو محاسبه شد (۱۱):

$$\text{رابطه ۱: } \text{HU} = \log (\text{AH} - 1.7 \text{EW}^{0.37} + 7.57)$$

HU واحد هاو، AH ارتفاع سفیده بر حسب میلی‌متر، EW وزن تخم‌مرغ بر حسب گرم

رنگ زرده تخم‌مرغ با استفاده از مقیاس رنگ رش ارزیابی شد. این وسیله دارای تعدادی برگه رنگ استاندارد از زرد روشن تا قرمز نارنجی و شماره‌گذاری شده از ۱ تا ۱۵ است. پس از شکستن تخم‌مرغ‌ها و جدا کردن زرده و سفیده، زرده تخم‌مرغ‌ها داخل بشقاب صاف قرار داده شده و بودند رنگ آنها بر اساس مقیاس رش تعیین شد (۳). برای تعیین pH زرده و سفیده نیز ابتدا pH متر توسط بافر ۷ و ۱۱ کالیبره و سپس حدود ۲ گرم زرده را در داخل بشر ریخته و ۹ برابر آن آب مقطر ریخته شد. در واقع زرده ۱۰ برابر رقیق شد و سپس توسط همزن برقی پنج دقیقه به هم زده شد تا یکنواخت شود، سپس زمانی که کف ایجاد شده در بالای زرده تقریباً از بین رفت سنسور pH متر در داخل آن قرار گرفته و زمانی که عدد موجود در pH ثابت شد آن عدد گزارش گردید.

صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ‌ها در اثر افزودن ۰/۵ درصد CLA به جیره، گزارش نکردند. برخی از محققان نیز تأثیر مثبت CLA را در بر حفظ کیفیت داخلی تخم‌مرغ، در مدت زمان‌های نگهداری تخم‌مرغ در دمای اتاق گزارش کرده‌اند (۱). بهترین شرایط برای نگهداری تخم‌مرغ، نگهداری به مدت حداکثر ۲ روز پس از تولید فارغ از دمای نگهداری و یا نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال است که در دمای یخچال نیز افت واحد هاو یا کیفیت تخم‌مرغ از روز سوم وجود دارد ولی شیب آن کند است (۱). افزایش دما و زمان نگهداری، می‌تواند از طریق پروتئولیز پروتئین سفیده، از دست دادن آب و شکستن برخی از پیوندهای دی‌سولفیدی بین پروتئین‌های سفیده منجر به کاهش ارتفاع سفیده و واحد هاو شود (۱۲، ۱۳ و ۱۷). تخم‌مرغ pH سفیده در تخم‌مرغ تازه گذاشته شده بین ۷/۶ تا ۸/۵ است. با افزایش طول مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ در انبار، pH می‌تواند حتی تا ۹/۷ افزایش یابد و این افزایش pH به دلیل خروج گاز دی‌اکسید کربن از روزنه‌های پوسته تخم‌مرغ است. با افزایش pH، قوام سفیده غلیظ کمتر شده و کیفیت داخلی تخم‌مرغ نیز کاهش می‌یابد. گزارش شده که استفاده از CLA در جیره مرغ تخم‌گذار می‌تواند سرعت روند این تغییرات pH و کیفیت سفیده را کندتر کند (۱، ۶ و ۱۳). چون مرغان تخم‌گذار پس از دوره تولک دچار افت عملکرد تولید و کیفیت داخلی تخم‌مرغ می‌شوند، فرض این تحقیق بر این است که استفاده از اسید چرب کنژوگه، اثر مثبت بر کاهش افت عملکرد و مخصوصاً کیفیت داخلی تخم‌مرغ مرغان تخم‌گذار نژاد لگهورن سویه Hy-Line داشته باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو آزمایش استفاده شد. در آزمایش اول، ۶۰ قطعه مرغ تخم‌گذار بالغ لگهورن سویه Hy-line پس از دوره تولک بری و در سن ۷۸ هفتگی و به مدت ۴ هفته استفاده شد. به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش، مرغ‌ها به دان پایه مورد استفاده و شرایط آزمایشی و قفس‌ها عادت‌دهی شدند و در این مدت یکنواخت‌سازی وزن مرغ‌ها در قفس انجام گرفت. یکنواخت‌سازی مرغ‌ها بر اساس وزن مرغ، وضعیت تاج و فاصله استخوان‌های عانه صورت گرفت. در شروع آزمایش نیز ۶۰ قطعه مرغ در قالب طرح کاملاً تصادفی به ۱۵ گروه به صورت ۳ تیمار با ۵ تکرار و به داخل هر قفس نیز ۴ مرغ اختصاص داده شد. مکمل خالص CLA محصول شرکت Reflex nutrition تهیه شد. این محصول با خلوص بالای ۹۰ درصد دارای ۵۰ درصد ایزومر سیس-۹-ترانس ۱۱ و ۵۰ درصد ترانس ۱۰-سیس ۱۲ است. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت-کنجاله سویا مطابق توصیه‌های مندرج در کاتالوگ سویه Hy-line فرموله شد (جدول ۱) به‌طوری‌که در جیره شاهد، از CLA استفاده نشد ولی در جیره‌های ۲

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

Table 1- Feed ingredients and composition of experimental diets

اجزای جیره (%)	صفر CLA % (شاهد)	CLA % +/۲۵	CLA % +/۵
Feed ingredients (%)	0 % CLA (control)	0.25 % CLA	0.5 % CLA
دانه ذرت	60.16	60.16	60.16
Corn grain			
کنجاله سویا	23.01	23.01	23.01
Soybean meal			
سیوس گندم	3.36	3.36	3.36
Wheat bran			
روغن سویا	1.47	1.22	0.97
Soy oil			
مکمل CLA	0	0.25	0.5
CLA supplement			
دی کلسیم فسفات	1.36	1.36	1.36
Dicalcium phosphate			
صدف معدنی	9.52	9.52	9.52
Oyster shells			
نمک معمولی	0.22	0.22	0.22
Common salt			
بی‌کربنات سدیم	0.1	0.1	0.1
Sodium bicarbonate			
دی ال-متیونین	0.19	0.19	0.19
DL-Methionine			
ال- لیزین هیدروکلراید	0.01	0.01	0.01
L-Lysine HCL			
پیش مخلوط ویتامینی ^۱	0.3	0.3	0.3
Vitamin premix			
پیش مخلوط مواد معدنی ^۲	0.3	0.3	0.3
Mineral premix			
ترکیب شیمیایی			
Chemical composition			
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری بر کیلوگرم)	2700	2700	2700
ME (kcal/kg)			
پروتئین خام (%)	16	16	16
Crude protein (%)			
کلسیم (%)	4.00	4.00	4.00
Calcium (%)			
فسفر قابل دسترس (%)	0.38	0.38	0.38
Available phosphorus			
متیونین (%)	0.45	0.45	0.45
Methionine (%)			
متیونین+سیستین (%)	0.72	0.72	0.72
Met+Cys (%)			
لیزین (%)	0.79	0.79	0.79
Lysine (%)			
ترئونین (%)	0.58	0.58	0.58
Threonine (%)			
تریپتوفان (%)	0.22	0.22	0.22
Tryptophan (%)			
تبادل آنیون-کاتیون جیره (میلی‌اکی والان بر کیلوگرم)	204	204	204
Dietary anion cation balance (Meq/kg)			

^۱ میزان ویتامین‌های تأمین شده در هر کیلوگرم خوراک: A، ۱۰۰۰۰ IU، D3، ۲۵۰۰ IU، E، ۱۰ IU، B1، ۲/۲ میلی‌گرم؛ B2، ۴ میلی‌گرم؛ B3، ۸ میلی‌گرم؛ B6، ۲ میلی‌گرم؛ B9، ۰/۵۶ میلی‌گرم؛ B12، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۲۰۰ میلی‌گرم.

^۲ میزان مواد معدنی تأمین شده در هر کیلوگرم خوراک: منگنز، ۸۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۰ میلی‌گرم؛ روی، ۶۰ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲ میلی‌گرم؛ ید، ۱ میلی‌گرم؛ و سلنیوم، ۰/۱۵ میلی‌گرم.

^۱ Supplied vitamins per kilogram of diet: mg: A, 10000 IU, D3 2500 IU, E 10 IU, B1 2.2 mg, B2 4 mg, B3 8mg, B6 2 mg, B9 0.56 mg, B12, 0.015 mg, Cholin 200mg.

^۲ Supplied minerals per kilogram of diet: Mn, 80 mg, Fe 50 mg, Zn 60 mg, Cu 12 mg, Se 0.15 mg.

ε_{ijk} = خطای آزمایشی با میانگین صفر و واریانس می‌باشند.
فاکتور A همان سطح CLA، فاکتور B همان دمای نگهداری و
فاکتور C همان زمان نگهداری بود.
در پایان، داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2
(۱۹) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه تفاوت بین
میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده گردید.

نتایج و بحث

عملکرد تولید

اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولک بری مرغان
تخم‌گذار بر شاخص‌های عملکرد تولید در کل دوره در جدول ۲ نشان
داده شده است. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که درکل دوره تولید،
درصد تولید تخم‌مرغ و توده تخم‌مرغ پرندگانی که در جیره آنها از ۰/۵
درصد CLA استفاده شده بود نسبت به جیره‌های شاهد و ۰/۲۵
درصد CLA به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0/05$). در صورتی‌که
مصرف خوراک و وزن تخم‌مرغ پرندگان تحت تاثیر درصد CLA
جیره قرار نگرفت ($P > 0/05$). چریان و همکاران (۸) گزارش کردند
که استفاده از ۰/۲۵ درصد CLA در جیره مرغان تخم‌گذار جوان
توانست تاثیر معنی‌داری بر عملکرد تولید تخم‌مرغ داشته باشد.
کچال‌دورا و همکاران (۷) با استفاده از ۰/۳ درصد CLA در جیره
مرغان تخم‌گذار جوان تاثیر معنی‌داری بر عملکرد تولید تخم‌مرغ
گزارش نکردند ولی آن و همکاران (۱) نشان دادند که با استفاده از
۱/۵ درصد CLA در جیره مرغان تخم‌گذار جوان، عملکرد تولید
تخم‌مرغ به‌طور معنی‌داری بهبود یافت که موافق نتایج آزمایش ما
است. آنها گزارش کردند که حتی با بالا بردن سطح آن به ۳ درصد
جیره، تولید تخم‌مرغ کاهش یافت که این امر نشان‌دهنده اثرات منفی
این اسید چرب در سطوح بالاتر است. با توجه به اینکه ثابت شده که
CLA یک خاصیت ضدلیپوژنیک دارد که این کار را از طریق کاهش
لیپوپروتئین لیپاز و پروتئین باندکننده اسیدچرب اعمال می‌کند و باعث
می‌شود جذب و انتقال اسیدهای چرب کاهش یابد، بدین ترتیب انتقال
چربی‌ها از کبد به تخمدان برای زرده‌سازی تخم‌مرغ کاهش می‌یابد
(۱۶). دو دلیل احتمالی برای این بهبود عملکرد وجود دارد یکی اینکه
CLA استفاده شده در این آزمایش خلوص بسیار بالایی داشته (بالای
۹۰ درصد) در صورتی‌که خلوص CLA در تحقیقات مختلف پایین و
در حدود ۶۰ درصد بوده است. ثانیاً تحقیقات گذشته عملکرد مرغان
جوان یا قبل از دوره تولک را مورد بررسی قرار داده‌اند، در حالی که در
تحقیق حاضر از مرغ‌های مسن تخم‌گذار و در دوره پس از تولک
استفاده شده است. با توجه به اینکه تولک‌بری اجباری می‌تواند با

pH سفیده نیز مانند pH زرده، اندازه گرفته شد و شاخص زرده
نیز از تقسیم ارتفاع زرده به عرض زرده ضربدر ۱۰۰ حاصل شد (۱۰).
برای اندازه‌گیری درصد وزن پوسته در پایان دوره آزمایش ۳ تخم‌مرغ
از هر تکرار به آزمایشگاه انتقال داده و بعد از توزین به دقت شکسته و
پوسته‌ها به خوبی جدا و شسته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای
محیط و سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در
داخل آون نگهداری شد پس از بیرون آوردن از آون و سرد شدن وزن
پوسته‌ها اندازه‌گیری شد و وزن به‌دست آمده بر وزن اولیه تخم‌مرغ
تقسیم گردید تا درصد وزن پوسته به‌دست بیاید. تخم‌مرغ‌های که در
مرحله قبلی وزن پوسته آنها به‌دست آمده بود، از مقطع (سر و ته و
وسط) به‌وسیله دستگاه میکروسنج مخصوص با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر
ضخامت پوسته اندازه‌گیری شد و میانگین سه عدد به‌دست آمده
به‌عنوان ضخامت پوسته آن تخم‌مرغ ثبت شد. مدل آماری برای
تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش اول به‌صورت رابطه ۲ است:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad \text{رابطه ۲:}$$

مقدار هر مشاهده Y_{ij}

میانگین مشاهدات μ

اثر تیمار T_i

اشتباه آزمایشی مربوط به مشاهده e_{ij}

در آزمایش دوم، برای بررسی اثرات CLA بر ماندگاری کیفیت
داخلی تخم‌مرغ‌ها در دما و زمان‌های مختلف نگهداری، در پایان دوره
آزمایشی، نمونه‌های تخم‌مرغ از تکرارهای گروه شاهد و گروهی که
اثرات مفیدی در عملکرد تولید تخم‌مرغ داشت (سطح ۰/۵ درصد
CLA) جمع‌آوری و در دماهای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و یخچال
(۴ درجه سانتی‌گراد)، در زمان‌های مختلف (یک روز، یک هفته و یک
ماه پس از تولید)، نگهداری و مهم‌ترین صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ
شامل ارتفاع سفیده، واحد‌ها، ارتفاع زرده، pH سفیده و زرده
اندازه‌گیری شد. برای آزمایش تعیین کیفیت تخم‌مرغ‌ها در دما و
زمان‌های مختلف نیز مدل آماری به‌صورت زیر است:

$$y_{ijk} = \mu + A_i \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$+ B_j + C_k + (AB)_{ij} + (BC)_{jk} + (AC)_{ik} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} = k امین مشاهده مربوط به j امین سطح فاکتور B و i امین

سطح فاکتور A

$$A_i = \text{اثر } i \text{ امین سطح عامل A}$$

$$B_j = \text{اثر } j \text{ امین سطح عامل B}$$

$$(AB)_{ij} = \text{اثر متقابل عامل A و B}$$

$$(BC)_{jk} = \text{اثر متقابل عامل B و C}$$

$$(AC)_{ik} = \text{اثر متقابل عامل A و C}$$

$$(ABC)_{ijk} = \text{اثر متقابل عامل A و B و C}$$

افزایش استرس، عملکرد سیستم تخم‌گذاری مرغ را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش تخم‌گذاری شود (۲۱). استفاده از ۰/۵ درصد CLA در جیره مرغان تخم‌گذار پس از دوره تولک‌بری، توانسته

این ضعف تخم‌گذاری را پوشش داده و تولید تخم‌مرغ نسبت به گروه شاهد را افزایش دهد.

جدول ۲- اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولک مرغان تخم‌گذار بر عملکرد تولید در کل دوره (۴ هفته)

Table 2- Effects of different levels of CLA in post-molting diet of laying hens on production performance in total period (4 weeks)

سطوح CLA جیره (%) Dietary CLA levels (%)	Egg production (%) درصد تولید تخم‌مرغ (%)	Egg weight (g) وزن تخم‌مرغ (گرم)	Egg mass (g) توده تخم‌مرغ (گرم)	Feed intake (g/b/d) مصرف خوراک (گرم/پرند/روز)	FCR (g/g) ضریب تبدیل غذایی (گرم/گرم)
صفر % CLA (شاهد) 0 % CLA (control)	70.25 ^b	63.85	44.92 ^b	101.65	2.28 ^a
CLA % ۰/۲۵ 0.25% CLA	68.09 ^b	65.58	45.01 ^b	101.45	2.26 ^a
CLA % ۰/۵ 0.5% CLA	74.55 ^a	65.57	48.88 ^a	101.85	2.09 ^b
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.332	0.594	0.917	0.271	0.044
سطح معنی‌داری P-value	P<0.05	0.061	P<0.05	0.489	P<0.05

^{a,b} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0.05$).

^{a,b} Means within same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

حتی در سطوح بالاتر CLA نیز کاهش مصرف خوراک پرندگان را گزارش نکرده‌اند (۸ و ۱۸) ولی آن و همکاران (۱) و شانگ و همکاران (۲۱) کاهش مصرف خوراک پرندوها را با افزایش میزان CLA جیره گزارش کرده‌اند.

صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ

نتایج اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولک مرغان تخم‌گذار بر صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ در دو هفته اول و دوم در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که در هیچ‌یک از دوره‌های تولیدی پس از دوره تولک‌بری، استفاده از CLA تا سطح ۰/۵ درصد جیره مرغان تخم‌گذار، نتوانسته بر درصد زرده و سفیده، pH زرده و سفیده، ارتفاع زرده، واحد هاو، رنگ زرده و شاخص زرده تاثیر معنی‌داری داشته باشد ($P>0.05$) با اینکه نتایج جدول نشان می‌دهد که با افزایش میزان CLA در جیره، ارتفاع واحد هاو از ۷/۷۲ در گروه شاهد به ۸/۳۷ در گروه ۰/۵ درصد CLA رسید ولی این اثر معنی‌دار نبود.

در این آزمایش، میزان pH سفیده نیز که یکی از معیارهای صفت کیفی داخلی تخم‌مرغ بوده و با افزایش زمان نگهداری تخم‌مرغ دچار تغییر می‌شود، با افزایش میزان CLA در جیره، تغییر معنی‌داری نشان

در این آزمایش، در کل دوره تولید، میان وزن تخم‌مرغ پرندگانی که در جیره آنها از ۰/۲۵ یا ۰/۵ درصد CLA استفاده شده بود نسبت به جیره شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($P>0.05$). بلوک باشی و ارهان در سال ۲۰۰۵ (۶) گزارش کردند که استفاده از ۰/۵ درصد CLA در جیره توانست وزن تخم‌مرغ مرغان تخم‌گذار را در سن بالا به‌طور معنی‌داری افزایش دهد و کی و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۱۸) گزارش کردند که سطح بالای ۱ درصد CLA جیره وزن تخم‌مرغ را کاهش می‌دهد ولی در بیشتر تحقیقات، سطوح بالاتر CLA نیز نتوانسته تاثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ داشته باشد (۱) و (۶). توده تخم‌مرغ نیز حاصل ضرب درصد تولید در وزن تخم‌مرغ است. با توجه به اینکه اختلاف بین درصد تولید گروه دریافت‌کننده ۰/۵ درصد CLA با دیگر تیمارها معنی‌دار بود ولی وزن تخم‌مرغ بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت، مشاهده شد که در کل دوره، اختلاف معنی‌داری بین توده تخم‌مرغ تیمارهای مختلف مشاهده شد ($P<0.05$) و توده تخم‌مرغ پرندگانی که جیره حاوی ۰/۵ درصد CLA دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد و گروه ۰/۲۵ درصد CLA افزایش معنی‌داری نشان داد. در این آزمایش، مصرف خوراک پرندگان نیز تحت تاثیر درصد CLA جیره قرار نگرفت ($P>0.05$) و ضریب تبدیل غذایی پرندگانی که جیره حاوی ۰/۵ درصد CLA دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد و گروه ۰/۲۵ درصد CLA کاهش معنی‌داری نشان داد. برخی از تحقیقات، موافق با این آزمایش

جدول ۳- اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولد مرغان تخم‌گذار بر صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ

Table 3- Effects of different levels of CLA in post-molting diet of laying hens on egg internal quality traits

صفات Traits	صفر % CLA (شاهد) 0 % CLA (control)	CLA % ۰/۲۵ 0.25% CLA	CLA % ۰/۵ 0.5% CLA	SEM اشتباه استاندارد میانگین	P-value سطح معنی‌داری
	دو هفته اول First two weeks				
درصد سفیده Albumen percent	59.01	58.70	58.21	2.32	0.97
درصد زرده Yolk percent	27.59	27.03	27.57	1.61	0.375
pH سفیده Albumen pH	9.12	9.05	9.03	0.104	0.191
pH زرده Yolk pH	6.25	6.27	6.28	0.053	0.932
ارتفاع زرده (میلی‌متر) Yolk height (mm)	1.58	1.56	1.56	0.029	0.859
واحد هاو Haugh unit	86.46	85.38	84.51	0.619	0.125
مقیاس رش Roche scale	9.00	9.00	8.90	0.079	0.329
شاخص زرده Yolk index	37.1	37.3	36.9	0.549	0.911
صفات Traits	دو هفته دوم Second two weeks				
درصد سفیده Albumen percent	55.8	58.1	57.4	1.89	0.610
درصد زرده Yolk percent	28.17	28.73	29.25	1.72	0.841
pH سفیده Albumen pH	9.34	9.36	9.36	0.097	0.712
pH زرده Yolk pH	6.34	6.35	6.38	0.053	0.712
ارتفاع زرده (میلی‌متر) Yolk height (mm)	1.61	1.62	1.58	0.032	0.262
واحد هاو Haugh unit	72.7	74.1	78.3	0.611	0.194
مقیاس رش Roche scale	10.2	10.1	10.1	0.085	0.388
شاخص زرده Yolk index	34.1	36.9	38.1	0.712	0.555

^{a-b} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

^{a-b} Means within same column with different superscripts were different ($P < 0.05$).

در درصد سفیده، درصد زرده، pH سفیده و pH زرده و رنگ زرده (مقیاس رش) تخم‌مرغ مشاهده نشد ($P > 0.05$). اگرچه شانگ و همکاران (۲۱) گزارش کردند که با افزایش CLA جیره در مرغان تخم‌گذار، درصد سفیده و زرده تخم‌مرغ، به‌طور خطی کاهش می‌یابد ولی در این آزمایش تغییر معنی‌داری در درصد سفیده و زرده تخم‌مرغ

بلوک باشی و ارهان (۶) نشان دادند که با افزایش سطح CLA به ۰/۵ درصد جیره، تغییرات معنی‌داری در درصد سفیده، درصد زرده، pH سفیده و pH زرده تخم‌مرغ مشاهده نگردید که موافق با نتایج آزمایش حاضر است که با افزایش سطح CLA به ۰/۵ درصد جیره، در هیچ‌یک از دوره‌های اول و دوم ارزیابی کیفی، تغییرات معنی‌داری

گروه‌های مختلف مشاهده نگردید.

نتایج اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولک مرغان تخم‌گذار بر برخی از صفات کیفی خارجی تخم‌مرغ در دو هفته اول و دوم در جدول ۴ نشان داده شده است.

صفات کیفی خارجی تخم‌مرغ

جدول ۴- اثرات سطوح مختلف CLA در جیره پس از تولک مرغان تخم‌گذار بر صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ

Table 4- Effects of different levels of CLA in post-molting diet of laying hens on egg external quality traits

صفات Traits	CLA % صفر (شاهد) 0 % CLA(control)	CLA % ۰/۲۵ 0.25 % CLA	CLA % ۰/۵ 0.5 % CLA	SEM اشتباه استاندارد میانگین	P-value سطح معنی‌داری
	دو هفته اول First two weeks				
طول تخم‌مرغ (سانتی‌متر) Egg length (cm)	5.92	5.93	5.92	0.051	0.998
عرض تخم‌مرغ (سانتی‌متر) Egg width (cm)	4.41	4.45	4.38	0.039	0.493
سطح تخم‌مرغ (میلی‌متر مربع) Egg surface (mm ²)	199.4	203.9	205.0	2.26	0.211
وزن مخصوص تخم‌مرغ (گرم بر سانتی‌متر مکعب) Egg specific gravity (g/cm ³)	1.088	1.086	1.086	0.003	0.859
درصد پوسته (%) Shell percent (%)	10.14	10.18	10.13	0.083	0.459
ضخامت پوسته (میلی‌متر) Shell thickness (mm)	0.632	0.716	0.710	0.024	0.055
صفات Traits	دو هفته دوم Second two weeks				
	Second two weeks				
طول تخم‌مرغ (سانتی‌متر) Egg length (cm)	5.78	5.70	5.92	0.085	0.227
عرض تخم‌مرغ (سانتی‌متر) Egg width (cm)	4.30	4.34	4.40	0.062	0.537
سطح تخم‌مرغ (میلی‌متر مربع) Egg surface (mm ²)	195.1	193.3	202.2	3.30	0.169
وزن مخصوص تخم‌مرغ (گرم بر سانتی‌متر مکعب) Egg specific gravity (g/cm ³)	1.09	1.09	1.08	0.001	0.396
درصد پوسته (%) Shell percent (%)	10.36	10.31	10.09	0.102	0.215
ضخامت پوسته (میلی‌متر) Shell thickness (mm)	0.780	0.866	0.908	0.022	0.072

^{a-b} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P < 0.05$).

^{a-b} Means within same column with different superscripts were different ($P < 0.05$).

ضخامت پوسته تخم‌مرغ یکی از شاخص‌های اصلی در نگهداری سالم تخم‌مرغ خوراکی در انبار است و با افزایش آن، علاوه بر اینکه تبخیر آب به کندی صورت می‌گیرد بلکه از نظر حمل و نقل سالم این ماده خوراکی نیز حائز اهمیت است. بلوک باشی و ارهان در سال ۲۰۰۵ (۶) نشان دادند با افزودن ۰/۵ درصد CLA به جیره مرغان تخم‌گذار، وزن پوسته تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد که این موافق با نتایج آزمایش حاضر است.

نتایج نشان می‌دهد در هیچ‌یک از دوره‌های تولیدی پس از دوره تولک‌بری، استفاده از CLA تا سطح ۰/۵ درصد جیره مرغان تخم‌گذار نتوانست بر طول و عرض تخم‌مرغ، وزن مخصوص تخم‌مرغ، حجم و سطح تخم‌مرغ، وزن پوسته و ضخامت پوسته تاثیر معنی‌داری داشته باشد. ولی با افزایش میزان CLA در جیره، ضخامت پوسته تخم‌مرغ روند افزایشی نشان می‌دهد که این نشانگر اثر غیر معنی‌دار این اسیدچرب بر ضخامت پوسته تخم‌مرغ پس از دوره تولک است.

صفات کیفی تخم مرغ در دما و زمان های مختلف نگهداری

اثرات اصلی سطح کنژوگه (۲ سطح)، زمان نگهداری (۳ زمان) و دمای نگهداری (۲ دما) تخم مرغ بر مهم ترین صفات کیفی تخم مرغ ها در جدول ۵ ارائه شده است. سفیده تخم مرغ، حاوی مقدار بالایی آب (حدود ۹۰ درصد) بوده و نشان داده شده است که در طی نگهداری تخم مرغ در انبار و با گذشت زمان نگهداری به دلیل از دست دادن آب از طریق پوسته، مقدار آب سفیده کاهش و در نتیجه درصد سفیده در کل تخم مرغ کمتر می شود. از طرفی نیز هرچه دمای نگهداری افزایش یابد، این کاهش آب و درصد سفیده، بیشتر کاهش می یابد (۱۲ و ۲۲). استفاده از اسیدچرب لینولئیک کنژوگه، به دلیل نفوذ در

غشای زرده و افزایش نفوذپذیری آن نسبت به برخی از یون ها و آب، باعث جابه جایی مقدار بیشتری از آب از سفیده به زرده شده و این نیز به نوبه خود، درصد آب و در نتیجه درصد سفیده تخم مرغ را بیشتر کاهش می دهد (۵). نتایج جدول ۵ نیز نشان می دهد که با افزایش زمان نگهداری، به دلیل تیخیر آب از پوسته، درصد سفیده به طور معنی داری کاهش یافته است ($P<0/05$) و با افزایش سطح CLA در جیره نیز، اگرچه درصد سفیده به طور عددی کاهش نشان داده است ولی معنی دار نمی باشد. این نتایج مطابق با نتایج آن و همکاران (۱) است.

جدول ۵- اثرات اصلی سطوح CLA، مدت زمان نگهداری و دمای نگهداری بر صفات کیفی داخلی تخم مرغ

Table 5- Effects of main effects of CLA levels, storage duration times and temperatures on egg internal quality traits

تیمار Treatment	درصد سفیده (%) Albumen percent (%)	واحد هاو Haugh unit	pH سفیده Albumen pH	ارتفاع زرده Yolk height (cm)	pH زرده Yolk pH
اثر اصلی سطح CLA Main effects of CLA					
0 % CLA صفر درصد CLA	43.34	67.05	9.20 ^a	1.38 ^a	6.50 ^b
0.5 % CLA 0.5 درصد CLA	42.73	69.66	9.10 ^b	1.43 ^b	6.64 ^a
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.12	1.02	0.022	0.013	0.027
سطح معنی داری p-value	0.702	0.105	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$
اثر اصلی مدت زمان نگهداری Main effects of storage duration time					
۱ روز پس از تولید 1day after storage	57.08 ^a	76.79 ^a	9.15 ^c	1.55 ^a	6.36 ^b
۷ روز پس از تولید 7day after storage	40.37 ^b	61.20 ^b	9.22 ^b	1.47 ^b	7.59 ^a
۳۰ روز پس از تولید 30day after storage	31.65 ^c	59.78 ^c	9.36 ^a	1.21 ^c	7.79 ^a
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.37	1.24	0.028	0.016	0.039
سطح معنی داری p-value	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$
اثر اصلی دمای نگهداری Main effects of storage temperature					
۴ درجه سانتی گراد 4°C	42.54	76.50 ^a	9.20 ^b	1.62 ^a	6.46 ^b
۲۷ درجه سانتی گراد 27°C	43.50	55.21 ^b	9.28 ^a	1.20 ^b	6.70 ^a
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.12	1.02	0.022	0.013	0.026
سطح معنی داری p-value	0.539	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$

^{a,b,c} میانگین های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی داری دارند ($P<0/05$).

^{a,b,c} Means within same column with different superscripts were different ($P<0.05$).

ارتفاع سفیده، یکی از عوامل بسیار مهم در تعیین کیفیت داخلی یک تخم‌مرغ می‌باشد ولی مولفه‌های به‌وجود آورنده و تغییردهنده آن به‌طور کامل درک نشده است (۲۶). اگرچه کاهش مقدار آن با افزایش زمان نگهداری تخم‌مرغ به تأیید رسیده است (۱۷ و ۲۲). به دلیل تأثیر مستقیم وزن تخم‌مرغ بر ارتفاع سفیده، برای ارزیابی کیفیت داخلی تخم‌مرغ، از واحد هاو به‌جای ارتفاع سفیده استفاده می‌شود تا بر اساس وزن تخم‌مرغ تصحیح شود (۱۱). با گذشت زمان ذخیره تخم‌مرغ، ارتفاع سفیده و واحد هاو تخم‌مرغ کاهش می‌یابد که در این صورت سفیده تخم‌مرغ به دلیل قوام نداشتن سفیده همانند آب روی می‌ز پخش می‌شود (۲۲). نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد اثرات اصلی سطوح CLA بر واحد هاو سفیده معنی‌دار نیست ولی با افزایش زمان و دمای نگهداری تخم‌مرغ، واحد هاو به‌طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد ($P<0/01$) که این امر نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار زمان و دما بر پروتئولیز اووموسین و شکستن برخی از پیوندهای دی‌سولفیدی بین پروتئین‌های سفیده است که منجر به کاهش ارتفاع سفیده می‌گردد (۱۷ و ۲۴) ولی نفوذ اسیدهای چرب کنژوگه جیره در غشای زرده و انتقال یون و آب بین زرده و سفیده، اگرچه باعث افزایش عددی واحد هاو شد، ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. افزایش سطح CLA، باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع زرده شد (جدول ۵) که احتمالاً نفوذ آب از سفیده به زرده، ارتفاع آن را افزایش داده است. مقدار pH سفیده در تخم‌مرغ تازه گذاشته شده بین ۷/۶ تا ۸/۵

است. با افزایش طول مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ در انبار، pH تخم‌مرغ می‌تواند تا ۹/۷ یا حتی بیشتر افزایش یابد و این افزایش pH به دلیل خروج گاز دی‌اکسیدکربن از روزنه‌های پوسته تخم‌مرغ است (۱). برخی از محققان گزارش کردند که در زمان‌های نگهداری طولانی‌مدت تخم‌مرغ در انبار، به‌دلیل انتقال یون‌ها بین سفیده و زرده تخم‌مرغ و تغییرات pH زرده و سفیده، احتمالاً کیفیت داخلی تخم‌مرغ می‌تواند کاهش یابد (۱ و ۲۳) ولی استفاده از CLA در جیره مرغ تخم‌گذار می‌تواند سرعت روند این تغییرات را کندتر کند (۱ و ۱۵). داده‌های مرتبط با اثرات اصلی درجدول ۵ نشان داد که اثرات اصلی سطح CLA روی pH سفیده و pH زرده معنی‌دار است ($P<0/01$) و با افزایش سطح CLA جیره، pH سفیده کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. افزایش دما و زمان نگهداری نیز باعث افزایش معنی‌داری pH سفیده شده و کیفیت تخم‌مرغ کاهش یافته است. پس در این آزمایش، با افزایش میزان CLA جیره، pH سفیده کاهش و pH زرده افزایش نشان داد ولی با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ، pH سفیده و زرده افزایش و با افزایش دمای نگهداری نیز، pH زرده و سفیده هر دو افزایش یافتند که این نتایج مطابق با نتایج آزمایش بلوک باشی و ارهان (۶) بود. آنها نیز طی آزمایشی نشان دادند که در سطح ۰/۵ درصد CLA جیره، با نگهداری تخم‌مرغ‌ها، درصد سفیده کاهش، pH سفیده کاهش و pH زرده افزایش یافت.

جدول ۶- اثرات متقابل سطوح CLA و مدت زمان نگهداری بر صفات کیفی داخلی تخم‌مرغ

Table 6- Interaction effects of CLA levels and storage times on egg internal quality traits

تیمار Treatment	درصد سفیده (%) Albumen percent (%)	واحد هاو Haugh unit	pH سفیده Albumen pH	ارتفاع زرده Yolk height (cm)	pH زرده Yolk pH
صفر درصد CLA*۱روز 0% CLA*1d	65.96	73.24	9.12 ^c	1.54 ^a	6.34 ^c
صفر درصد CLA*۷روز 0% CLA*7d	40.09	63.44	9.14 ^c	1.36 ^b	6.65 ^{bc}
صفر درصد CLA*۳۰روز 0% CLA*30d	32.98	62.46	9.35 ^a	1.26 ^c	6.76 ^b
۰/۵ درصد CLA*۱روز 0.5% CLA*1d	57.22	78.34	9.11 ^c	1.57 ^a	6.39 ^c
۰/۵ درصد CLA*۷روز 0.5% CLA*7d	40.65	68.96	9.11 ^c	1.58 ^a	6.43 ^c
۰/۵ درصد CLA*۳۰روز 0.5% CLA*30d	30.32	66.95	9.28 ^b	1.16 ^d	7.31 ^a
استبانه استاندارد میانگین SEM	1.94	1.76	0.019	0.023	0.053
سطح معنی‌داری p-value	0.665	0.082	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.05$

a,b,c,d میانگین میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0/05$).

a,b,c Means within same column with different superscripts were different ($P<0.05$).

جدول ۷- اثرات متقابل سطوح CLA و دمای نگهداری بر صفات کیفی داخلی تخم مرغ

Table 7- Interaction effects of CLA levels and storage temperature on egg internal quality traits

تیمار Treatment	درصد سفیده (%) Albumen percent	واحد هاو Haugh unit	pH سفیده Albumen pH	ارتفاع زرده Yolk height (cm)	pH زرده Yolk pH
صفر درصد CLA*۴ درجه سانتی گراد 0% CLA*4°C	40.89	78.72	9.21 ^b	1.62 ^a	6.44
صفر درصد CLA*۲۷ درجه سانتی گراد 0% CLA*27°C	45.79	55.31	9.37 ^a	1.15 ^c	6.60
۰/۵ درصد CLA*۴ درجه سانتی گراد 0.5% CLA*4°C	44.20	74.27	9.20 ^b	1.62 ^a	6.49
۰/۵ درصد CLA*۲۷ درجه سانتی گراد 0.5% CLA*27°C	41.26	65.06	9.20 ^b	1.25 ^b	6.80
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.58	1.44	0.032	0.019	0.047
سطح معنی داری p-value	0.517	0.157	P<0.05	P<0.05	0.086

^{a,b,c} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0.05$).

^{a,b,c} Means within same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

جدول ۸- اثرات متقابل زمان و دمای نگهداری بر صفات کیفی داخلی تخم مرغ

Table 8- Interaction effects of storage time and temperature on egg internal quality traits

تیمار Treatment	درصد سفیده (%) Albumen percent	واحد هاو Haugh unit	pH سفیده Albumen pH	ارتفاع زرده Yolk height	pH زرده Yolk pH
۱ روز*۴ درجه سانتی گراد 1d * 4°C	56.40	78.04 ^a	9.14 ^b	1.54 ^b	6.37 ^d
۱ روز*۲۷ درجه سانتی گراد 1d * 27°C	57.77	75.54 ^a	9.15 ^b	1.57 ^b	6.36 ^d
۷ روز*۴ درجه سانتی گراد 7d * 4°C	40.98	75.75 ^a	9.11 ^b	1.61 ^{ab}	6.50 ^c
۷ روز*۲۷ درجه سانتی گراد 7d * 27°C	39.77	46.92 ^b	9.33 ^a	1.33 ^c	6.68 ^b
۳۰ روز*۴ درجه سانتی گراد 30d * 4°C	30.26	75.71 ^a	9.36 ^a	1.71 ^a	7.53 ^a
۳۰ روز*۲۷ درجه سانتی گراد 30d * 27°C	33.04	44.44 ^b	9.36 ^a	1.71 ^a	7.55 ^a
اشتباه استاندارد میانگین SEM	1.38	1.37	0.053	0.035	0.026
سطح معنی داری p-value	0.584	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.01

^{a,b,c,d} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0.05$).

^{a,b,c,d} Means within same column with different superscripts were different ($P<0.05$).

بودند، استفاده از CLA به میزان ۰/۵ درصد جیره، نتوانست تغییر معنی‌داری در درصد سفیده و احتمالاً تغییر آب سفیده داشته باشد. همچنین نتایج جداول ۶ و ۷ و ۸ نشان داد که اثرات متقابل سطح CLA با مدت زمان نگهداری و سطح CLA با دمای نگهداری بر روی واحد هاو نیز معنی‌دار نیست ($P>0.05$) و در تخم‌مرغ‌هایی که

با نگاهی به جداول ۶، ۷ و ۸ می‌توان مشاهده نمود که هیچ‌یک از اثرات متقابل سطح CLA با مدت زمان، سطح CLA با دمای نگهداری و زمان نگهداری با دمای نگهداری روی درصد سفیده معنی‌دار نبوده است ($P>0.05$) که این امر نشانگر این موضوع است که در تخم‌مرغ‌هایی که در دما و زمان‌های متفاوتی نگهداری شده

اسیدهای چرب فسفولیپیدهای تشکیل‌دهنده غشاء، نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. آیدین و همکاران نیز (۴) اشاره کردند زمانی که تخم‌مرغ‌های حاوی CLA در دمای یخچال نگهداری می‌شوند تغییراتی در pH زرده و سفیده مشاهده می‌گردد که دلیل آن احتمالاً این است که CLA با تأثیر بر متابولیسم اسیدهای چرب در بدن پرندگان، مقدار اسیدهای چرب اشباع غشای زرده را افزایش می‌دهد و بنابراین با نگهداری تخم‌مرغ در هوای سرد یخچال، غشای زرده پاره شده و باعث نشت مواد معدنی و آب از سفیده به زرده می‌شود. برخی از تحقیقات نشان داده‌اند که مقدار یون‌های آهن، کلسیم، روی، منیزیم، سدیم و کلرید زرده و سفیده تخم‌مرغ‌های حاصل از مرغ‌های تغذیه شده با CLA، که به مدت ۱۰ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، نسبت به تخم‌مرغ‌های گروه شاهد، دارای تغییرات زیادی بودند (۴). در آزمایش دیگری، شانگ و همکارانش (۲۱) نشان دادند که سدیم، پتاسیم و منیزیم زرده تخم‌مرغ‌ها با افزایش سطح CLA جیره، افزایش می‌یابند. این تغییراتی که در سفیده یا زرده تخم‌مرغ و به دنبال آن کیفیت داخلی تخم‌مرغ در مرغ‌های تغذیه شده با CLA اتفاق می‌افتد، می‌تواند به دلیل افزایش نفوذپذیری غشای زرده و در نتیجه افزایش مقدار آب زرده، جابه‌جایی یون‌ها بین زرده و سفیده یا تغییرات pH زرده در طول نگهداری در هوای سرد باشد (۱). نتایج اثرات متقابل سه‌گانه سطح CLA، زمان نگهداری و دمای نگهداری نیز در جدول ۹ ارائه شده‌اند. نتایج اثرات متقابل سه‌گانه این آزمایش نشان می‌دهد که اثرات متقابل سطح CLA، زمان نگهداری و دمای نگهداری بر روی pH زرده و ارتفاع زرده معنی‌دار بوده ($P < 0/01$) و بیشترین ارتفاع زرده مربوط به تخم‌مرغ تیمارهایی بود که در کمترین زمان نگهداری، در دمای پایین‌تر و همراه با CLA بودند و کمترین pH زرده نیز در تخم‌مرغ‌های تیمارهایی مشاهده گردید که علاوه بر نداشتن CLA در جیره‌هایشان، در دمای پایین‌تر و طول مدت کوتاه‌تری نیز نگهداری شده بودند.

نتیجه‌گیری کلی

از این آزمایش چنین نتیجه‌گیری می‌شود که در دوره پس از تولد بزرگ اجباری مرغان تخم‌گذار سویه‌های لاین، استفاده از اسیدچرب CLA خالص تا سطح ۰/۵ درصد جیره، می‌تواند علاوه بر تأثیر مثبت بر صفات تولید تخم‌مرغ، تغییرات pH یا به‌طور کلی کیفیت داخلی تخم‌مرغ را در طول نگهداری تا حدودی حفظ کند.

در دما و زمان‌های متفاوتی نگهداری شده بودند، استفاده از CLA به میزان ۰/۵ درصد جیره، نتوانست تغییر معنی‌داری در ارتفاع سفیده و واحد هاو داشته باشد که احتمالاً نفوذ اسیدهای چرب کونژوگه جیره در غشای زرده نتوانسته باعث تغییری در واحد هاو شود ولی اثرات متقابل دما و زمان‌های نگهداری بر روی واحد هاو معنی‌دار بود که این امر نشان می‌دهد که با افزایش زمان نگهداری (خصوصاً در زمان‌های ۷ و ۳۰ روز)، کاهش دما به‌خوبی می‌تواند تغییرات واحد هاو را تحت تأثیر قرار داده و کاهش دهد. همچنین می‌توان فهمید که اثرات متقابل سطح CLA با مدت زمان، سطح CLA با دمای نگهداری و زمان نگهداری با دمای نگهداری بر روی ارتفاع زرده معنی‌دار است و این نشان می‌دهد که نفوذپذیری غشای ویتلین و افزایش آب زرده، ارتفاع زرده را نسبت به ارتفاع سفیده بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد.

نتایج جدول ۶، ۷ و ۸ نشان می‌دهد که اثرات متقابل سطح CLA با مدت زمان، سطح CLA با دمای نگهداری و زمان نگهداری با دمای نگهداری بر روی pH سفیده معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$) که این امر نشانگر این موضوع است که در تخم‌مرغ‌هایی که در دما و زمان‌های متفاوتی نگهداری شده بودند، استفاده از CLA به میزان ۰/۵ درصد جیره، نتوانست pH سفیده را تحت تأثیر قرار دهد. با نگاهی به جدول می‌توان دریافت که در تخم‌مرغ‌هایی که در زمان طولانی‌تر (۳۰ روز) نگهداری شده بودند، استفاده از ۰/۵ درصد CLA در جیره، نتوانست به‌طور معنی‌داری pH سفیده را تحت تأثیر قرار داده و کاهش دهد ($P < 0/05$) (جدول ۶) و به‌طور مشابه در تخم‌مرغ‌هایی که در دمای بالاتر (۲۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده بودند نیز استفاده از ۰/۵ درصد CLA در جیره، نتوانست به‌طور معنی‌داری pH سفیده را کاهش دهد ($P < 0/01$) (جدول ۷) و کمترین مقادیر pH سفیده مربوط به تخم‌مرغ تیمارهایی است که در مدت زمان کمتر نگهداری، در دماهای کمتر (۴ درجه سانتی‌گراد) ولی همراه با CLA بالاتر جیره باشند. این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت CLA بر کیفیت داخلی تخم‌مرغ در طول مدت نگهداری است. جدول ۸ نیز نشان داد با افزایش زمان نگهداری تخم‌مرغ، کاهش دما می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر pH سفیده داشته باشد و آن را کاهش دهد. مقادیر pH زرده نیز تحت تأثیر زمان و دمای نگهداری بود و در تخم‌مرغ‌هایی که در زمان طولانی‌تر (۳۰ روز) و دمای بالاتر (۲۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده بودند، pH زرده بالا بود. آن و همکاران (۱) گزارش کردند که استفاده از CLA در جیره مرغان تخم‌گذار باعث می‌شود در طول مدت نگهداری تخم‌مرغ، انتقال یون‌ها بین زرده و سفیده بیشتر شود چون CLA و ایزومرهای ترانس، با افزایش اندازه فضای بین زنجیره‌های

جدول ۹- اثرات متقابل سه گانه سطح CLA، زمان نگهداری و دمای نگهداری بر صفات کیفی داخلی تخم مرغ

Table 9- Interaction effects of CLA level, storage time and temperature on egg internal quality traits

			درصد سفیده (%)	واحد هاو	pH سفیده	ارتفاع زرده	pH زرده
تیمار			Albumen percent	Haugh unit	Albumen pH	Yolk height	Yolk pH
سطح	زمان	دمای					
CLA	نگهداری	نگهداری					
(%)	(روز)	(سانتی گراد)					
CLA	Storage time	Storage					
Leve	(day)	temperature					
(%)		(°C)					
صفر درصد	1	4	55.80	77.74	9.18	1.52 ^a	6.34 ^c
	1	27	58.11	72.73	9.18	1.46 ^{ab}	6.35 ^c
	7	4	38.76	80.06	9.14	1.51 ^a	6.42 ^c
0% CLA	7	27	41.43	46.82	9.48	1.43 ^{ab}	6.67 ^b
	30	4	28.11	78.38	9.31	1.24 ^b	6.74 ^b
	30	27	37.84	46.55	9.35	1.08 ^c	6.88 ^b
۵/۰ درصد	1	4	57.01	78.34	9.14	1.56 ^a	6.40 ^c
	1	27	57.43	78.34	9.15	1.55 ^a	6.38 ^c
	7	4	43.20	71.43	9.08	1.42 ^{ab}	6.67 ^b
	7	27	38.11	46.49	9.39	1.34 ^b	6.79 ^b
	30	4	34.40	73.05	9.28	1.01 ^c	6.87 ^b
0.5% CLA	30	27	28.25	40.34	9.35	0.94 ^c	7.22 ^a
	اشتباه استاندارد						
میانگین			2.74	2.49	0.056	0.033	0.072
SEM							
سطح معنی داری			0.313	0.426	0.158	P<0.01	P<0.01
p-value							

^{a-b} میانگین‌های با حداقل یک حرف غیر مشابه در هر ستون، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارند ($P<0.05$).^{a-b} Means within same column with different superscripts were different ($P<0.05$).

منابع

- Ahn, D. U., J. L. Sell, C. Chamrusspollert, M. Jo, and M. Jeffery. 1999. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the quality characteristics of chicken eggs during refrigerated storage. *Poultry Science*, 78: 922-928.
- Alvers, R., R. Van der Wielen, E. J. Brink, H. F. Hendriks, V. N. Dorovska-Taran, and I. C. Mohede. 2003. Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57: 595-603.
- Ashton, H.E. and D. A. Fletcher. 1962. Development and use of color standards for egg yolks. *Poultry Science*. 41: 1903-1909.
- Aydin, R., M. W. Pariza, and M. E. Cook. 2001. Olive oil prevents the adverse effects of dietary conjugated linoleic acid on chick hatchability and egg quality. *Journal of Nutrition*, 131: 800-806.
- Aydin, R. 2006. Effect of storage temperature on the quality of eggs from conjugated linoleic acid-fed laying hens. *South African Journal of Animal Science* 36: 13-19.
- Bolukbasi, S. C. and M. K. Erhan. 2005. Effect of dietary conjugated linoleic acid on laying hen performance, egg yolk fatty acid composition and egg quality during refrigerated storage. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 14: 685-693.
- Cachldra, P., J. C. DeBlAas, P. Garcia-Rebollr, C. Alvarez, J. Mendez. 2005. Short communication: Effects of type and level of supplementation with dietary n-3 fatty acids on yolk fat composition and n-3 fatty acid retention in hen eggs. *Spanish Journal of Agriculture Research*, 3: 209-212.
- Cherian, G., M. G. Traber, M. P. Goege, and S. W. Leonard. 2007. Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: Effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during Storage. *Poultry Science*, 86: 953-958.

9. Cook, R. K., D. Root, C., Miller, E. Reisler, and P. A. Rubenstein. 1993. Enhanced stimulation of myosin subfragment 1 ATPase activity by addition of negatively charged residues to the yeast actin NH2 terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 2410-2415.
10. Funk, E. M. 1948. The relation of yolk index determined in natural position to the yolk index as determined after separating the yolk from the albumen. *Poultry Science*, pp. 367.
11. Haugh, R. R. 1937. The Haugh unit for measuring egg quality. *The U.S. egg & poultry magazine*. 43:522-555.
12. Hossieni Siyar, S. A., A. Saki, M. M. Tabatabaei, H. A. Aliarabi, A. Ahmadi, and N. Ashori. 2010. Effect of storage condition and hen age on egg quality parameters. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 2: 1-10.
13. Jin, Y. H., K. T. Lee, W. I. Lee, and Y. K. Han. 2011. Effects of Storage Temperature and Time on the Quality of Eggs from Laying Hens at Peak Production. *Asian Australian Journal of Animal Science*, 24:279-284.
14. Lee, K. N., D. Kritchevsky, and M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 108: 19-25.
15. Ntambi, J. M., Y. Choi, and Y. Kim. 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by conjugated linoleic acid. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid*. Vol. 1. Eds. Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Nelson, G. & Pariza, M.W., AOCS Press, Champaign, IL. pp. 340-347.
16. Park, Y., J. M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, and M. W. Pariza. 1999. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*. 34: 235-241.
17. Pasquol, C. M., L. Evilda, P. M. Juliana, N. K. O. Wanessa, and E. N. Joaquim. 2012. Egg quality of laying hens in different conditions of storage, ages and housing densities. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41:2064-2069.
18. Qi, X., S. Wu, H. Zhang, H. S. Yue, F. Ji and G. Qi. 2011. Effects of dietary conjugated linoleic acids on lipid metabolism and antioxidant capacity in laying hens *Archives of Animal Nutrition*, 65: 354-65.
19. SAS User's Guide. 2009. Version 9.2 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
20. Siegel, H. S. 1980. Physiological stress in birds. *Biological Sciences*, 30:529-533.
21. Shang, X. G., F. L. Wang, D. F. Li, J. D. Yin, and J. Y. Li. 2004. Effects of dietary conjugated linoleic acid on the productivity of laying hens and egg quality during refrigerated storage. *Poultry Science*, 83: 1688-1685.
22. Silversides, F. G. and T. A. Scott. 2001. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science*, 80:1240-1245.
23. Silversides, F. G. and K. Budgell. 2004. The relationship among measures of egg albumen height, pH and whipping volume. *Poultry Science*, 83: 1619-1623.
24. Stevens, L. 1996. Egg proteins: What are their functions. *Scientific Program*, 79:65-87.
25. Viviani, R. O. M. 1970. Metabolism of long-chain fatty acids in the rumen. *Advances in lipid research*, 8:267.
26. Williams, K. C. 1992. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. *World's Poultry Science Journal*, 48:5-16.
27. Zhang, H. J., Y. M. Gao., Y. D. Tian, and J. M. Yuan. 2008. Dietary conjugated linoleic acid improves antioxidant capacity in broiler chicks. *British Poultry Science*, 49:213-221.



Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Post- molting Diet of Laying Hens on Egg Production Performance and Egg Quality during Different Storage Times

S. A. Mirghelenj^{1*}-L. Fathollahzadeh²- R Kianfar³- M Olyae³

Received: 13-12-2016

Accepted: 03-06-2017

Introduction CLA is a mixture of several geometrical and positional conjugated isomers of linoleic acid (C 18:2 cis-9, cis-12). Ruminant products, such as milk, meat, and cheese, are major CLA sources in human diets, but foods obtained from non-ruminants, contain much less CLA. Some reports showed positive effects of CLA on production performance of layer hens. Egg internal quality traits may be depressed during storage, but incorporation of CLA, may increase the permeability of the yolk membrane due to the cis-trans arrangements of CLA, therefore ion movement between the yolks and albumen through the yolk membrane, restrict some changes in egg internal quality traits, therefore an experiment was conducted to evaluate the effects of different levels of CLA in post-molting phase of laying hens on production performance and egg quality in different storage times and temperatures.

Material and Methods In this experiment, sixty W-36 White leghorn laying hens in post-molting phase (78 week) were assigned to 3 treatments with 5 replications and 4 birds each based on completely randomized design. The purity of CLA source used in this study was above 90% with mixture of 50% c9-t11 and 50% c10-t12 isomers. Experimental diets were 1) Control diet (basal diet containing 0% CLA), 2) basal diet+0. 25% pure CLA and 3) basal diet+0.5% pure CLA and after adaptation period, diets were fed for 4 weeks. During the experiment, hens were provided feed and water *ad-libitum*. Egg production, egg weight, feed consumption, egg mass and feed conversion ratio were recorded weekly and reported as total period. Every two weeks, internal and external quality traits such as albumen percent, yolk percent, albumen pH, yolk pH, Haugh unit, yolk height, yolk Roche scale, yolk index, egg size, egg surface, specific gravity, shell strength, shell percent and thickness were evaluated. The eggs from treatments having best production performance (0.5 %) collected and stored in different temperatures (4 and 27° C) and duration times (1 day, 1 week and 1 month after production) then evaluated their internal quality.

Results and Discussion Results showed that egg production performance and egg mass of birds fed 0.5 % CLA was significantly higher than control or those fed 0.25 % during whole experimental period, but egg weight and feed consumption were not affected significantly by dietary CLA level and feed conversion ratio of birds fed 0.5 % CLA was significantly ($P<0.05$) lower than control or those fed 0.25 %. In the end of experiment, the internal egg quality traits such as albumen percent, yolk percent, albumen pH, yolk pH, Haugh unit, yolk height, yolk Roche scale, yolk index were not affected by dietary CLA levels ($P>0.05$). Also the external egg quality traits such as egg size, egg surface, specific gravity, shell strength, shell percent and thickness were not affected significantly. Results of egg quality traits during different times and temperatures showed that main effects of CLA levels, storage times and storage temperatures were significant ($P<0.05$) on most important egg internal quality traits such as Haugh unit and pH of albumen. Interaction effects of CLA levels with storage times and temperatures were significant ($P<0.05$) and in eggs kept within higher temperatures and longer times, albumen pH of eggs for birds fed 0.5 % CLA, were lower compared to albumen pH of eggs for birds fed control diet containing 0 % CLA. These results indicate that ion movement between the yolks and albumen through the yolk membrane in eggs from hens fed 0.5 % CLA was greater than that in the control eggs and caused to restrict pH increase during storage. It is speculated that the incorporation of CLA, most of which was in the trans form, could have increased the permeability of yolk membrane because of the cis-trans arrangements of CLA, which would have increased membrane fluidity and sizes of space between the fatty acid chains of phospholipids that constitute the membrane bilayer.

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (former assistant professor of university of Tabriz)

2- MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(* Corresponding author email: a_mirghelenj@yahoo.com)

Conclusion It is concluded that use of 0.5 % CLA in post-molting diet of laying hens improved egg production performance of birds and restricted fluctuations in pH and Haugh unit changes of eggs keep during high storage temperatures and duration times, therefore it is suggested to adding 0.5 % pure CLA in post-molted laying hen diets.

Key words: Conjugated Linoleic Acid, Haugh Unit, Molting, Layers, Storage temperature



ارزیابی صفات عملکردی، کیفی و کلسترول تخم مرغ، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و تعادل آنی اکسیدانی مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با تفاله هسته انار و مولتی آنزیم

سید جواد حسینی واشان^{۱*} - طاهره غزنوی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱

چکیده

هدف تحقیق حاضر مطالعه اثر تفاله هسته انار و مولتی آنزیم بر صفات عملکردی، کیفی و کلسترول تخم مرغ، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و وضعیت آنی اکسیدانی مرغ‌های تخم‌گذار در مرحله اوج تولید بود. در این تحقیق از تعداد ۲۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه‌های - لاین W-36 در مرحله اوج تولید با سن ۳۲ هفتگی در ۴ تیمار و ۵ تکرار و ۱۰ قطعه مرغ در هر تکرار استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه دوره ۲۸ روزه به مدت ۱۲ هفته اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح صفر، ۴، ۷ و ۱۰ درصد تفاله هسته انار به همراه ۵۰ گرم مولتی آنزیم رویو در هر تن خوراک بود. تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاله انار درصد تولید، وزن تخم مرغ، توده تخم مرغ و ضریب تبدیل خوراک را بهبود بخشید. صفات کیفی تخم مرغ نیز شامل شاخص شکل تخم مرغ، شاخص زرده، شاخص رنگ زرده، وزن نسبی پوسته و وزن مخصوص تحت تأثیر تفاله انار قرار نگرفتند ولی تفاله انار واحد هاو و وزن نسبی سفیده را افزایش داد و سطح ۴ درصد تفاله هسته انار نیز ضخامت پوسته و مقاومت پوسته را افزایش داد با افزایش سطح تفاله هسته انار سطوح تری گلیسرید، LDL تخم مرغ و کلسترول خون و غلظت مالون دی آلدئید خون به طور معنی داری کاهش یافت. بنابراین، افزودن تفاله هسته انار همراه با مولتی آنزیم تأثیر منفی بر عملکرد و صفات تولیدی و صفات کیفی تخم مرغ ندارد بلکه در مواردی باعث بهبود تولید و کاهش هزینه جیره نیز می شود و می تواند تا سطح ۱۰ درصد همراه با آنزیم به جیره مرغ تخم‌گذار در جهت کاهش کلسترول خون و بهبود وضعیت ضد اکسیدانی خون افزوده شود.

واژه‌های کلیدی: تفاله انار، عملکرد، کیفیت تخم مرغ، مالون دی آلدئید، واحد هاو

مقدمه

خوراکی محسوب می‌شود و ایران با تولید سالانه ۷۵۲۳۲۱ تن انار، از جمله مهمترین کشورهای تولیدکننده این میوه در جهان می‌باشد (۲). در تولید صنعتی فرآورده‌هایی نظیر کنسانتره، آب انار، رب و شربت و انار مقادیر زیادی ضایعات به‌ویژه تفاله هسته انار تولید می‌شود که تفاله دانه انار حاوی هسته، پوسته خارجی و مقدار اندکی پوست است که محصول فرعی کارخانجات آبیگری دانه انار است (۲۸). براساس آخرین آمارها، میزان تولید تفاله انار بیش از ۵۰ هزار تن در سال است (۲). تفاله دانه انار دارای ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، الیاف خام و خاکستر به ترتیب به میزان ۹۱/۸۵، ۱۱/۰۱، ۱۰/۲۷، ۳۳/۷۴ و ۴/۶۹ درصد است. میزان AMEn، TME، AMEn و TME تفاله دانه انار برابر ۲۴۶۹/۳۶ و ۲۴۶۷/۵۲، ۲۵۴۷/۷۸ و ۲۵۴۶/۳۲ کیلوکالری بر کیلوگرم گزارش شده است (۱۳). براساس پژوهش‌های پیشین چربی تفاله هسته انار از ۶ تا ۱۹ درصد (براساس ماده خشک) تغییر می‌کند ولی ۷۵ درصد اسیدهای چرب آن را اسید پونیسیک تشکیل می‌دهد که خواص ضدسرطانی دارد (۱). تفاله دانه انار حاوی

در پرورش طیور بازده استفاده از مواد خوراکی از اهمیت بالایی برخوردار است تا بتواند با حداکثر نمودن راندمان مصرف خوراک هزینه‌های تولید را کاهش دهد یا این که با استفاده از مواد خوراکی ارزان تر و تولید داخلی، هزینه تمام شده هر کیلو خوراک را کاهش دهد. در جهت حصول این نتیجه، استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعتی می‌تواند در کاهش میزان تولید پسماندها و آلودگی زیست محیطی و کاهش هزینه تولید و در مواردی بهبود کیفیت تولید موثر باشد (۱۰). از جمله این ضایعات غنی از مواد مغذی تفاله دانه انار است. گیاه انار متعلق به خانواده پونیکاسه^۱، از قدیمی ترین میوه‌های

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند

(*) نویسنده مسئول: (Email: jhosseini@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.62691

3- Punicaceae

مولتی آنزیم استفاده شده است (۲۷). تعداد مطالعات مربوط به استفاده از تفاله دانه انار در جیره مرغ تخم‌گذار محدود است و اثرات آن بر تغییرات میزان اکسیداسیون چربی‌ها بررسی نشده است. بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی اثر تفاله هسته انار همراه با مولتی آنزیم تجاری بر فراسنجه‌های عملکردی، فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و صفات کیفی و کلسترول تخم‌مرغ و وضعیت آنتی‌اکسیدانی مرغ‌های تخم‌گذار در اوج تولید بود.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام آزمایش حاضر، تفاله هسته انار از شرکت قائن سرشک تهیه شد ترکیبات شیمیایی و انرژی قابل متابولیسم این تفاله به شرح جدول ۱ است (۱۳). در این تحقیق از تعداد ۲۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذارهای -۳۶ W در مرحله اوج تولید (۳۲ هفته) در قالب ۴ تیمار و هر تیمار دارای ۵ تکرار با ۱۰ قطعه مرغ استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح ۰، ۴، ۷ و ۱۰ درصد تفاله هسته انار بود. به تیمارهای حاوی تفاله هسته انار، به میزان ۲۰ سی‌سی مولتی آنزیم تجاری روایو (ساخت شرکت آدیسو فرانسه^۳) در هر ۱۰۰ کیلو خوراک اضافه شد هر لیتر آنزیم روایو حاوی ۱۱۰۰ واحد (FTU) آنزیم بتا ۱-۴ زایلاناز، ۱۰۰ واحد ۱ و ۳ یا ۴ بتاگلوکناز و ۵۰۰ واحد فیتاز است و آنزیم‌های سلولاز، پکتیناز پروتئاز و ماناز نیز به مقدار کم در آن وجود دارد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در قالب سه دوره ۲۸ روزه متوالی یعنی ۳۶-۳۳ هفته‌گی، ۴۰-۳۷ هفته‌گی و ۴۴-۴۱ هفته‌گی اجرا شد. جیره‌ها برای تأمین احتیاجات مواد مغذی توصیه شده مرغ‌های تخم‌گذار سویه‌های -لایین W-۳۶ پس از اوج تولید (۳۴) تهیه شدند (جدول ۲). پرندگان قبل از شروع آزمایش به مدت ۱۲ روز به منظور عادت‌دهی با جیره حاوی تفاله هسته انار تغذیه شدند. دمای سالن در محدوده 2 ± 20 درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد. برنامه نوری بر پایه ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و برنامه رطوبت نیز مطابق پیشنهادات سویه انجام شد. دسترسی پرندگان به آب و غذا به صورت آزاد بود. سایر نکات مربوط به دوره پرورش، مطابق پیشنهادات سویه‌های -لایین W-۳۶ انجام شد.

تخم‌مرغ‌های تولیدی روزانه جمع‌آوری و توزین شد. داده‌های مربوط به عملکرد شامل درصد تخم‌گذاری (جمع‌آوری تخم‌مرغ روزانه)، خوراک مصرفی، میانگین وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ تولیدی، ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های سنی ۳۶-۳۳ هفته‌گی،

ترکیبات پلی‌فنولی شامل اسید الاجیک و مشتقات آن، پونیکالاجین و پونیکالین بوده که به ترتیب اسیدهای الاجیک و اسید گالیک محسوب می‌شوند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۶). بیشترین مقدار پونیکالاجین در انار وجود دارد که بر طبق گزارشات ارائه شده توسط محققین پونیکالاجین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدان، ضدقارچی و ضد میکروبی است (۵ و ۲۵). به دلیل افزایش آثار سمی و بیماری‌های سرطانی که در اثر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به وجود می‌آید، استفاده از گیاهان دارویی و یا ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاهی برای کاهش و یا به تأخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌ها و بهبود سیستم ایمنی پرندگان افزایش یافته است (۲۲). استفاده از فرآورده‌های فرعی انار مانند تفاله هسته انار، می‌تواند مزایای قابل توجهی داشته باشد (۳۳). افزودن تفاله دانه انار تا سطح ۹ درصد به جیره جوجه گوشتی، بعضی شاخص‌های عملکردی جوجه‌های گوشتی را بهبود بخشید (۱۴). حسینی و اشکان و همکاران (۱۵) گزارش نمودند افزودن تفاله انار به جیره جوجه گوشتی تأثیری بر مصرف خوراک و وزن بدن نداشت ولی ضریب تبدیل کاهش یافت. از طرف دیگر درصد چربی بطنی در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تفاله انار کاهش یافت و سامانه ایمنی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تفاله انار بهبود یافت (۱۵). افزودن تفاله انار به جیره جوجه‌های گوشتی (تا سطح ۱۰ درصد جیره) باعث کاهش غلظت کلسترول، لیپوپروتئین با دانسیته پایین (^۱LDL)، و تری‌گلیسرید خون شد و غلظت لیپوپروتئین با دانسیته بالا (^۲HDL) خون را در سرم خون جوجه‌های گوشتی افزایش داد (۱۱). در جوجه‌های تحت تنش گرمایی، افزودن تفاله انار تأثیری بر غلظت تری‌گلیسرید خون نداشت ولی غلظت کلسترول، LDL، سرم را کاهش و غلظت HDL خون جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی تغذیه شده با سطوح ۷ و ۱۰ درصد تفاله انار افزایش یافت و باعث کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید خون به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی گردید (۱۵). افزودن تفاله انار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار نیز نشان داد که تفاله انار در سطوح ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد تأثیری بر فراسنجه‌های عملکردی و کیفیت تخم‌مرغ ندارد (۲۳ و ۲۷). تفاله هسته انار دارای ۳۳/۷۴ درصد فیبر خام است و درصد قابل توجهی تانن دارد که در صورت استفاده از آن بدون آنزیم ممکن است قابلیت گوارش‌پذیری و جذب پایینی داشته باشد (۱۳ و ۲۷). تفاله هسته انار درصد قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنلی از جمله تانن‌ها، اسید الاجیک، پونیکالاجین و ترکیبات آلکالوئیدی و فلاونوئیدی است که در طیور می‌تواند بر مصرف خوراک و صفات تولیدی اثرگذار باشد، به همین دلیل در مطالعات پیشین نیز از تفاله هسته انار به همراه

3- Rovabio® Max LC, a concentrated liquid solution containing xylanase, β -glucanase and phytase as main activities, extracted from fermentation broths of *PENICILLIUM FUNICULOSUM* and *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*, Adisseo France SAS

1- Low density lipoprotein
2- High density lipoprotein

جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. صفات کیفی تخم مرغ شامل میانگین وزن تخم مرغ، واحد هاو، شاخص ارتفاع زرده، شاخص رنگ زرده، شاخص شکل، وزن نسبی زرده، سفیده، پوسته، وزن مخصوص اندازه‌گیری شدند (۱۲).

۳۷-۴۰ هفتگی، ۴۱-۴۴ هفتگی و کل دوره (۳۳-۴۴ هفتگی) محاسبه و بررسی شدند. توده تخم مرغ نیز از حاصل ضرب درصد تولید تخم مرغ روزانه در میانگین وزن تخم مرغ‌های تولیدی (گرم) همان روز به دست آمد. به منظور بررسی صفات کیفی تخم مرغ، در انتهای دوره‌های ۲۸ روزه، از هر تکرار تعداد ۴ نمونه تخم مرغ

جدول ۱- ترکیب شیمیایی تفاله هسته انار

Table 1- The chemical composition of pomegranate pulp

انرژی متابولیسمی (کیلوکالری/کیلوگرم) Metabolizable Energy (Kcal/Kg)	کلسیم (درصد) Calcium (%)	فسفر کل (درصد) Phosphorous (%)	خاکستر (درصد) Ash (%)	فیبر خام (درصد) Crude Fiber (%)	چربی خام (درصد) Ether extract (%)	پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)
2453.4	2.29	0.73	4.59	33.88	10.16	11.01

این جدول از حسینی و اشان و غزنوی (۲۰۱۶) اقتباس شده است (۱۳)

This table is adapted from Hosseini-Vashan and Ghaznavi (2016), (13)

معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تحلیل قیمتی جیره‌ها نشان داد که با افزودن تفاله هسته انار، قیمت جیره کاهش می‌یابد (جدول ۱) قیمت جیره از ۱۳۲۸ شاهد به ۱۲۸۱ تومان در جیره حاوی ۱۰ درصد تفاله هسته انار کاهش یافت. داده‌های مربوط به اثر تفاله هسته انار بر فراسنجه‌های عملکردی مرغ تخم‌گذار در اوج تولید در جدول ۳ ارائه شده است. تحلیل داده‌ها نشان داد استفاده از تفاله هسته انار در سطح ۱۰ درصد به همراه آنزیم باعث بهبود درصد تولید تخم مرغ (۹۴/۰۵) در مقایسه با شاهد (۹۱/۳۰) می‌گردد ($P < 0/05$). همانطور که در جدول ۱ نیز نشان داده شده است تفاله هسته انار دارای بیش از ۱۱ درصد پروتئین خام و ۲۴۵۰ کیلوکالری انرژی سوخت و ساز است و با توجه به ترکیبات پلی فنلی می‌تواند نقش موثری در تأمین احتیاجات پرنده و بهبود عملکرد داشته باشد. توده تخم مرغ تولیدی و میانگین وزن تخم مرغ نیز در پرندگان تغذیه شده با تفاله هسته انار و آنزیم در مقایسه با شاهد بالاتر بود ($P < 0/05$). میزان مصرف خوراک پرندگان آزمایشی در هیچ‌یک از دوره‌ها تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی تغییر معنی‌داری نشان نداد. پرندگان تغذیه شده با سطوح ۷ و ۱۰ درصد تفاله هسته انار و آنزیم از ضریب تبدیل خوراک پایین‌تری در مقایسه با شاهد برخوردار بودند. عباسی و همکاران نیز عدم تغییر معنی‌دار در هنگام تغذیه مرغ‌ها را گزارش نمودند (۱). ساکی و همکاران نیز گزارش نمودند افزودن تفاله انار به جیره مرغ تخم‌گذار تا سطح ۱۵ درصد اثر منفی بر صفات عملکردی ندارد (۲۷). هرچند مطالعات زیادی در زمینه استفاده از تفاله دانه انار در جیره مرغ تخم‌گذار گزارش نشده است.

به منظور مطالعه فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و وضعیت ضداکسیدانی خون مرغ‌های تخم‌گذار، در انتهای آزمایش پنج سی‌سی خون از ورید بال دو پرند از هر تکرار در لوله‌های هپارین‌دار اخذ شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ و پلاسما جمع‌آوری شد. نمونه‌های پلاسما در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در زمانی مشخص توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اتوانالایزر (مدل جسان چم ۲۰۰) فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون شامل تری‌گلیسریدها، پروتئین تام، کلسترول، لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا و پایین به کمک کیت‌های بیوشیمیایی پارس آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد.

به منظور بررسی وضعیت سامانه ضداکسیدانی جوجه‌های گوشتی، غلظت مالون دی آلدئید (MDA^1) پلاسمای خون جوجه‌های گوشتی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین میزان MDA یا شاخص $TBARS^2$ پلاسمای خون جوجه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتری (CECIL، آکواریوس، کمبریج، لندن) استفاده شد. برای این منظور ابتدا معرف لازم را از طریق مخلوط نمودن تری کلرواستیک اسید (دو میلی‌مول/لیتر)، MDA و اسید کلریدریک آماده نموده و سپس پلاسما به آن اضافه شد و پس از تکان دادن بوتانول اضافه نموده و تکان داده و بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمودن با دور ۳۰۰۰ در دقیقه، از محلول سطحی جهت قرائت نمودن غلظت MDA استفاده می‌شود. سپس محلول آماده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد (۳۲).

داده‌های حاصل با نرم‌افزار اکسل پردازش و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ رویه خطی عمومی مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و میانگین‌ها به کمک آزمون توکی در سطح

1- Malondialdehyde

2- Tiobarbituric acid reaction score (TBARS)

جدول ۲- اجزاء مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی حاوی تفاله انار

Table 2- The ingredients and chemical composition of experimental diets contained Pomegranate pulp

مواد خوراکی (%) Ingredients (%)	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)			
تفاله هسته انار (%) Pomegranate pulp (%)	0	4	7	10
ذرت Corn	54.53	51.25	48.61	46.34
کنجاله سویا Soybean meal	24.34	23.67	23.21	22.51
روغن Oil ¹	1.00	1.20	1.30	1.40
جو barely	8.68	8.52	8.43	8.33
دی کلسیم فسفات Dicalcium Phosphate(DCP)	1.75	1.75	1.75	1.75
پودر صدف Oyster shell	8.67	8.69	8.68	8.66
مکمل ویتامینه Vitamin Premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30
مکمل معدنی Mineral Premix ¹	0.30	0.30	0.30	0.30
دی ال - متیونین DL-Methionine	0.12	0.12	0.12	0.12
مولتی آنزیم روابیو Rovabio Multi-enzyme	-	0.002	0.002	0.002
نمک Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
قیمت جیره Cost	1327	1310	1292	1281
مقادیر مواد مغذی محاسبه شده Calculated Nutrient composition				
انرژی قابل متابولیسمی (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolisable Energy(kcal/kg)	2700	2700	2700	2700
پروتئین خام (%) Crude protein %	16.00	16.00	16.00	16.00
لیزین (%) Lysine (%)	1.09	1.09	1.09	1.09
متیونین + سیستین (%) Met +Cys (%)	0.76	0.76	0.76	0.76
کلسیم (%) Calcium (%)	3.90	3.90	3.90	3.90
فسفر قابل دسترس (%) Available Phosphorous (%)	0.50	0.50	0.50	0.50
فیبر خام (%) Crude Fiber (%)	2.65	3.76	4.56	5.41

هر کیلوگرم جیره حاوی: ۲۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D، ۱۲/۵ گرم ویتامین E، ۲/۵ گرم ویتامین K، ۱ میلی‌گرم ویتامین B_۱، ۸ میلی‌گرم ویتامین B_۲، ۳ میلی‌گرم ویتامین B_۶، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم ویتامین B_{۱۲}، ۰/۰۲۵ میلی‌گرم اسید فولیک، ۱۷/۵ میلی‌گرم اسید نیکوتینیک، ۱۲/۵ میلی‌گرم پنتوتنات کلسیم، ۸۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۸۰ میلی‌گرم منگنز، ۰/۱۵ میلی‌گرم سلنیم، ۰/۳۵ میلی‌گرم ید.

Supplied the following per kilogram of diet: Vit A, 25000 IU; Vit D, 5000 IU; Vit E, 12.5 IU; Vit K, 2.5 IU; Vit B₁, 1mg; Vit B₂, 8mg; Vit B₆, 3 mg; Vit B₁₂, 0.015 mg; Folic acid, 0.025 mg; nicotinic acid, 17.5 mg; calcium pantothenate, 12.5 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Mn, 80 mg; Se, 0.15 mg; I, 0.35 mg.

جدول ۳- اثر تفاله هسته انار بر فراسنجه های عملکردی مرغ تخم گذار در اوج تولید

Table 3- Effect of Pomegranate pulp on performance parameters of laying hens at peak production

صفات Traits	هفته Weeks	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)				SEM	P-Value
		0	4	7	10		
درصد تولید تخم مرغ Egg production (%)	33-36	93.35	90.14	94.71	93.14	1.526	0.230
	37-40	90.85 ^b	92.57 ^{ab}	94.21 ^{ab}	95.07 ^a	0.837	0.013
	41-44	90.28	90.92	92.85	92.78	0.859	0.116
	کل دوره Whole period	91.30 ^b	91.24 ^b	93.92 ^{ab}	94.05 ^a	0.870	0.027
	33-36	60.39 ^b	62.12 ^{ab}	61.51 ^{ab}	62.31 ^a	0.456	0.037
میانگین وزن تخم مرغ (گرم) Egg weight (g)	37-40	60.71 ^b	63.54 ^a	62.79 ^a	63.15 ^a	0.399	0.0006
	41-44	61.05 ^b	62.79 ^a	62.66 ^a	62.71 ^a	0.252	0.0004
	کل دوره Whole period	60.72 ^b	62.82 ^a	62.32 ^a	62.72 ^a	0.279	0.0002
	33-36	56.38	56.04	58.26	58.01	1.127	0.421
	37-40	55.17 ^b	58.81 ^a	59.15 ^a	60.03 ^a	0.593	0.0001
توده تخم مرغ تولیدی (گرم در روز) Egg mass (g/day)	41-44	55.11 ^b	57.11 ^{ab}	58.19 ^a	56.81 ^{ab}	0.651	0.030
	کل دوره Whole period	55.56 ^b	57.32 ^{ab}	58.53 ^a	58.28 ^a	0.645	0.020
	33-36	111.40	110.16	111.14	111.76	0.856	0.600
	37-40	106.58	105.98	106.87	109.65	2.034	0.599
	41-44	109.78	109.96	111.52	112.52	0.710	0.044
مصرف خوراک (گرم) Feed intake (g)	کل دوره Whole period	109.26	108.70	109.86	111.30	0.930	0.267
	33-36	1.979	1.980	1.909	1.928	0.044	0.587
	37-40	1.935	1.804	1.801	1.807	0.035	0.042
	41-44	1.993	1.927	1.918	1.883	0.035	0.210
	کل دوره Whole period	1.969 ^a	1.904 ^{ab}	1.876 ^b	1.872 ^b	0.022	0.021

SEM: اشتباه معیار میانگین؛ P-Value: سطح معنی داری؛ ^{a-b} تفاوت میانگین ها با حرف غیرمشترک در هر ردیف معنی داری است ($P < 0.05$).

SEM: standard error of mean; ^{a-b} Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.05$).

تفاله هسته انار، شاخص شکل تخم مرغ، شاخص زرده، شاخص رنگ زرده، وزن نسبی زرده و سفیده در جدول ۴ ارائه شده است. بررسی داده ها نشان می دهد افزودن تفاله هسته انار به جیره مرغ تخم گذار باعث افزایش واحد هاو در سطح ۷ درصد تفاله هسته انار در دوره سوم تغذیه گردید ($P < 0.05$). هرچند شاخص شکل تخم مرغ، شاخص زرده و رنگ زرده تحت تأثیر سطح تفاله هسته انار تغییر معنی داری نشان ندادند ($P > 0.05$) و اوزان نسبی زرده و سفیده در دوره سوم (۴۱-۴۴ هفتگی) مرغان تغذیه شده با سطح ۱۰ درصد تفاله هسته انار به ترتیب کاهش و افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). افزایش وزن نسبی سفیده و کیفیت سفیده تخم مرغ در مرغ های تغذیه شده با تفاله هسته انار احتمالاً به ترکیبات پلی فنلی آن مربوط باشد. زیرا در بعضی منابع گزارش شده است که ترکیبات پلی فنلی اثر مثبت بر سوخت و ساز پروتئین در سلول حیاتی دارد و باعث افزایش پروتئین خون می گردد. از طرف دیگر ترکیبات پلی فنلی بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش تأثیر می گذارد و با تغییر جمعیت میکروبی به سمت افزایش لاکتوباسیلوس ها، زمینه بهبود جذب مواد مغذی را فراهم

تفاله هسته انار به دلیل داشتن درصد قابل توجه چربی و پروتئین خام دارای ارزش غذایی قابل توجهی است. هرچند تفاله هسته انار دارای درصد بالاتری فیبر خام است که می تواند بر مصرف خوراک پرند اثر گذار باشد ولی یافته های مطالعه حاضر نشان داد این سطح از فیبر، بر مصرف خوراک در مرغ تخم گذار اثر نخواهد گذاشت که به طور مشابه مطالعات دیگر در زمینه استفاده از تفاله هسته انار در جیره مرغ تخم گذار نشان می دهد استفاده از تفاله هسته انار تا ۱۰ درصد بر مصرف خوراک اثر منفی نمی گذارد (۲۳ و ۲۷). حسینی و اشان و همکاران (۱۴) گزارش نمودند استفاده از تفاله هسته انار و آنزیم در جیره جوجه گوشتی باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک می گردد. ترکیبات شیمیایی فعال انار شامل فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها، آلکالوئیدها، تانن ها، پلی استرهای اسید گالیک و الاجیک احتمالاً بر فرآیندهای هضم و جذب مواد مغذی در پرند اثر گذاشته و از اثرات منفی فیبر بالا کاسته اند (۲۱).

از صفات مهم در صنعت پرورش مرغ تخم گذار، صفات کیفی تخم مرغ است. داده های مربوط به اثر تفاله هسته انار بر کیفیت سفیده

که شاید دلیل تفاوت یافته‌ها به سن مرغ‌های تخم‌گذاری مورد استفاده مربوط باشد که در این مطالعات مسن‌تر بودند و در این سنین، راندمان جذب مواد مغذی پایین‌تر است.

می‌نمایند (۱۹ و ۲۶). بنابراین با افزایش جذب مواد مغذی، غلظت ترکیبات سفیده افزایش یافته و در نتیجه سفیده تخم‌مرغ غلیظ‌تر خواهد شد. هرچند رابط و همکاران (۲۳) و ساکی و همکاران (۲۷) گزارش نمودند که تفاله هسته انار بر صفات کیفی تخم‌مرغ اثر ندارد

جدول ۴- اثر تفاله هسته انار بر فراسنجه‌های کیفی تخم‌مرغ تخم‌گذار در اوج تولید

Table 4- Effect of Pomegranate pulp on egg quality parameters of laying hens at peak production

صفت Traits	هفته Weeks	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)				SEM	P-Value
		0	10	10	10		
واحد هاو Haugh Unit	33-36	90.39	96.80	95.20	89.20	5.224	0.691
	37-40	92.82	92.82	93.75	94.12	2.578	0.961
	41-44	90.93 ^b	98.97 ^{ab}	99.57 ^a	99.17 ^{ab}	2.118	0.029
	کل دوره Whole period	91.38	96.79	96.18	94.06	1.848	0.197
شاخص شکل تخم‌مرغ Egg Shape	33-36	73.57	72.26	73.28	72.01	0.859	0.520
	37-40	68.83	72.47	72.11	71.68	1.114	0.126
	41-44	70.71	70.79	71.70	71.12	0.781	0.803
	کل دوره Whole period	71.04	71.84	72.36	71.60	0.607	0.504
شاخص زرده Yolk Index	33-36	0.244	0.236	0.237	0.234	0.005	0.602
	37-40	0.238	0.224	0.228	0.224	0.009	0.668
	41-44	0.240	0.238	0.239	0.235	0.004	0.869
	کل دوره Whole period	0.241	0.233	0.235	0.231	0.003	0.227
شاخص رنگ زرده Yolk Colour index	33-36	6.40	5.70	5.70	5.20	0.308	0.091
	37-40	5.10	5.60	5.60	5.50	0.226	0.376
	41-44	5.10	4.70	5.60	5.10	0.259	0.153
	کل دوره Whole period	5.46	5.33	5.63	5.26	0.152	0.367
وزن نسبی زرده Relative weight of Yolk	33-36	25.26	27.05	26.13	24.53	0.779	0.161
	37-40	26.88	26.75	26.32	27.06	0.467	0.718
	41-44	27.23 ^a	27.30 ^a	26.86 ^{ab}	24.88 ^b	0.577	0.029
	کل دوره Whole period	26.45	27.03	26.44	25.49	0.403	0.096
وزن نسبی سفیده Relative weight of White	33-36	61.62	60.66	61.83	62.67	0.938	0.529
	37-40	60.457	59.94	60.92	60.455	0.542	0.655
	41-44	58.70 ^b	59.42 ^{ab}	59.51 ^{ab}	61.86 ^a	0.655	0.020
	کل دوره Whole period	60.26	60.01	60.75	61.66	0.448	0.085

SEM: اشتباه معیار میانگین؛ P-Value: سطح معنی‌داری؛ ^{a-b} تفاوت میانگین‌ها با حرف غیرمشترک در هر ردیف معنی‌داری است ($P < 0.05$).

SEM: standard error of mean; ^{a-b} Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.05$).

تفاله هسته انار اگرچه دارای درصد قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنلی است ولی میزان فیبرخام آن نیز بالاست. شاید دلیل آن که اثر تفاله انار بر کیفیت پوسته در سطح ۴ درصد از سطوح بالاتر بهتر بوده است به‌خاطر افزایش درصد فیبر خام جیره در سطوح بالاتر باشد که احتمالاً با اثر منفی بر جذب مواد معدنی، باعث اثرگذاری محدودتر بر کیفیت پوسته شده است (۱۲). ساکی و همکاران (۲۷) و رابط و همکاران (۲۳) گزارش نمودند افزودن تفاله هسته انار به جیره مرغ تخم‌گذار اثری بر فراسنجه‌های کیفی پوسته ندارد که دلیل احتمالی آن سطوح بالاتر

داده‌های مرتبط با اثر تفاله هسته انار و مولتی‌آنزیم روایو WX بر فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ شامل وزن مخصوص تخم‌مرغ، وزن نسبی پوسته ضخامت پوسته، و مقاومت پوسته در جدول ۵ ارائه شده است. تفاله هسته انار بر وزن مخصوص و وزن نسبی پوسته تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) ولی ضخامت پوسته و مقاومت پوسته در مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با سطح ۴ درصد تفاله هسته انار به‌طور معنی‌داری بالاتر بود و در سطوح بالاتر تفاله هسته انار، ضخامت پوسته به‌طور عددی در مقایسه با ۴ درصد کاهش یافت.

تفاله هسته انار در مطالعات (۲۰ درصد) باشد. در این مطالعه نیز در سطوح بالا، اثر معنی‌داری بر کیفیت پوسته مشاهده نشد.

جدول ۵- اثر تفاله هسته انار بر فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم مرغ تخم‌گذار در اوج تولید

Table 5- Effect of Pomegranate pulp on eggshell quality parameters of laying hens at peak production

صفت Traits	هفته Weeks	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)				SEM	P-Value
		0	4	7	10		
وزن نسبی پوسته تخم مرغ Relative weight of eggshell	33-36	11.58	12.28	12.02	12.48	0.349	0.334
	37-40	12.66	13.30	12.75	12.47	0.324	0.340
	41-44	14.06	13.27	13.62	13.25	0.397	0.462
	کل دوره Whole period	12.76	12.95	12.79	12.73	0.162	0.793
	33-36	0.3346	0.3470	0.3532	0.3562	0.007	0.227
ضخامت پوسته تخم مرغ (میلی‌متر) Eggshell Thickness (mm)	37-40	0.337 ^b	0.369 ^a	0.365 ^{ab}	0.361 ^{ab}	0.007	0.038
	41-44	0.333 ^b	0.391 ^a	0.388 ^a	0.380 ^{ab}	0.013	0.024
	کل دوره Whole period	0.335 ^b	0.369 ^a	0.369 ^a	0.366 ^a	0.007	0.010
	33-36	1.088	1.086	1.085	1.088	0.001	0.6704
	37-40	1.079	1.082	1.084	1.085	0.001	0.182
وزن مخصوص تخم مرغ (گرم در سانتی‌متر مکعب) Specific gravity of Egg (g/cm ³)	41-44	1.079	1.082	1.083	1.146	0.034	0.458
	کل دوره Whole period	1.081	1.083	1.084	1.107	0.011	0.368
	33-36	7.274	7.883	7.710	7.989	0.184	0.066
	37-40	8.00	8.77	8.21	8.14	0.265	0.223
	41-44	8.00	8.72	8.47	8.65	0.403	0.597
مقاومت پوسته (نیوتن) Eggshell Resistance (Nioton)	کل دوره Whole period	7.75 ^b	8.45 ^a	8.13 ^{ab}	8.25 ^{ab}	0.160	0.044

SEM: اشتباه معیار میانگین؛ P-Value: سطح معنی‌داری؛ ^{a-b} تفاوت میانگین‌ها با حرف غیرمشترک در هر ردیف معنی‌داری است ($P < 0.05$).

SEM: standard error of mean; ^{a-b} Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.05$).

متابولیسم سنتز کلسترول و اثرگذاری بر فعالیت آنزیم هیدروکسی متیل گلوکوزیل کوآستتاز است.

در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است که افزایش فیبر جیره یکی از راهکارهای کاهش کلسترول است (۷ و ۳۰). فیبر نامحلول جیره باعث کاهش میزان کلسترول و LDL خون می‌گردد (۳ و ۲۹). آندرسون و همکاران (۴) گزارش نمودند فیبر بالا باعث افزایش دفع کلسترول و اسیدهای صفراوی می‌گردد و از طریق کاهش میزان ابقای کلسترول و کاهش میزان پیش‌سازهای آن (غلظت اسیدهای صفراوی)، میزان کلسترول خون را کاهش می‌دهند. به‌طور مشابه، سایر محققین نیز گزارش نمودند که فیبر جیره باعث کاهش میزان کلسترول و LDL می‌گردد (۶ و ۲۹). از طرف دیگر در تفاله هسته انار درصد قابل توجهی ترکیبات پلی‌فنلی از جمله تانن‌ها، اسید الایک، پونیکالاجین و ترکیبات آلکالوئیدی و فلاونوئیدی وجود دارد که در مطالعات پیشین گزارش شده است باعث کاهش کلسترول می‌گردند (۲۴).

کیفیت چربی زرده تخم مرغ و به‌ویژه میزان کلسترول تخم مرغ یکی از مهمترین شاخص‌های خطرپذیری قلب و عروق در انسان است به همین دلیل از مهمترین صفات مورد مطالعه در پژوهش‌های مرتبط با مرغ تخم‌گذار، تغییرات لیپیدها و کلسترول زرده تخم مرغ است. داده‌های مرتبط با تغییرات لیپیدهای زرده تخم مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با سطوح تفاله هسته انار در جدول ۶ ارائه شده است. تحلیل داده‌های لیپیدهای خونی نشان می‌دهد که تفاله هسته انار باعث کاهش میزان تری‌گلیسرید و LDL زرده تخم مرغ گردید ($P < 0.05$). غلظت HDL زرده تخم مرغ نیز در مرغ‌های تغذیه شده با تفاله هسته انار افزایش یافت. از طرف دیگر تغییرات لیپیدی سرم خون نیز نشان داد که افزودن تفاله هسته انار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار باعث کاهش غلظت کلسترول خون گردید (جدول ۷). تفاله هسته انار بر غلظت LDL و HDL سرم خون اثر نداشت. این داده‌ها نشان می‌دهد افزودن تفاله هسته انار به جیره مرغ تخم‌گذار باعث کاهش کلسترول خون و کلسترول بد تخم مرغ می‌گردد. احتمال می‌رود کاهش میزان کلسترول و LDL به دلیل فیبر بالاتر تفاله هسته انار و ترکیبات پلی‌فنلی آن باشد. منج و همکاران (۱۸) گزارش نمودند تأثیر فیبر جیره بر کاهش کلسترول از طریق تأثیر بر چرخه

جدول ۶- اثر تفاله هسته انار بر نیمرخ لیپیدی تخم مرغ تخم‌گذار در اوج تولید

Table 6- Effect of Pomegranate pulp on lipid profiles of egg in laying hens at peak production

صفت Traits	واحد Units	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)				SEM	P-Value
		0	4	7	10		
کلسترول Cholesterol	mg/g yolk	27.52	21.56	23.52	24.18	2.289	0.351
تری‌گلیسرید Triglyceride	mg/g yolk	154.14 ^a	125.00 ^b	125.12 ^b	131.44 ^b	5.204	0.003
LDL	mg/g yolk	31.92 ^a	26.26 ^b	26.52 ^b	28.10 ^b	0.930	0.002
HDL	mg/g yolk	1.10 ^b	1.26 ^{ab}	1.50 ^{ab}	1.90 ^a	0.171	0.024

SEM: اشتباه معیار میانگین؛ P-Value: سطح معنی‌داری؛ ^{a-b} تفاوت میانگین‌ها با حرف غیرمشترک در هر ردیف معنی‌داری است ($P < 0.05$).
SEM: standard error of mean; ^{a-b} Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.05$).

و میزان سنتز تری‌گلیسرید را کاهش داده و باعث افزایش لیپولیز می‌شوند (۱۷). بنابراین با توجه به ترکیبات پلی‌فنلی و فیبر تفاله هسته انار، افزودن آن به جیره مرغ تخم‌گذار باعث کاهش میزان کلسترول و LDL و افزایش HDL خواهد شد با توجه به این نکته که این ترکیبات بر میزان بروز بیماری‌های قلبی-عروقی در انسان و بروز سکتها و مرگ ناگهانی در طیور اثر دارند باعث کاهش بروز این بیماری‌ها خواهند شد (۳۲ و ۳۳).

در مطالعات پیشین گزارش شده است که آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها از مسیرهای مختلفی بر سوخت و ساز چربی‌ها در کبد و بافت چربی بدن تأثیر می‌گذارند ۱- با تأثیر بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش، بر گوارش‌پذیری و جذب لیپیدها اثر می‌گذارند (۱۶)، ۲- پلی‌فنل‌ها با افزایش بتا‌اکسیداسیون، میزان در دسترس بودن چربی‌ها را به‌عنوان منبع انرژی افزایش می‌دهند (۳۱)، ۳- ترکیبات پلی‌فنلی بر تمایز سلول‌های آدیپوسایت دستگاه گوارش تأثیر گذاشته

جدول ۷- اثر تفاله هسته انار بر سرم خون مرغ تخم‌گذار در اوج تولید

Table 7- Effect of Pomegranate pulp on lipid profiles of blood laying hens at peak production

صفت Traits	واحد Units	درصد تفاله هسته انار Pomegranate pulp (%)				SEM	P-Value
		0	4	7	10		
کلسترول Cholesterol	mg/dl	192.58 ^a	133.72 ^b	138.26 ^b	115.62 ^b	12.25	0.003
تری‌گلیسرید Triglyceride	mg/dl	1769.8	1663.6	1662.5	1344.00	129.57	0.151
LDL	mg/dl	90.34	87.63	86.54	69.74	6.23	0.095
HDL	mg/dl	75.34	63.38	67.44	84.10	8.62	0.368
پروتئین تام Total protein	mg/dl	5.88	6.06	6.13	5.50	0.162	0.062
MDA	μg/l	0.873 ^a	0.331 ^b	0.336 ^b	0.297 ^b	0.073	<.0001

SEM: اشتباه معیار میانگین؛ P-Value: سطح معنی‌داری؛ ^{a-b} تفاوت میانگین‌ها با حرف غیرمشترک در هر ردیف معنی‌داری است ($P < 0.05$).
SEM: standard error of mean; ^{a-b} Means with different letters in a row differ significantly ($P < 0.05$).
Malondialdehyde, MDA

کاهش می‌دهد در این مطالعه نیز میزان MDA پلاسمای خون کاهش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی انار به دلیل حضور اسید آسکوربیک و ترکیبات پلی‌فنلی آن از قبیل پونیکالاجین، پونیکالین، اسید گالیک، مشتقات اسید الایک و آنتوسیانین‌ها گزارش شده است (۹ و ۲۰)، این ترکیبات از طریق جذب رادیکال‌های آزاد باعث کاهش میزان اکسیداسیون لیپیدها می‌شوند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی انار از میوه‌هایی مثل سیب، انگور، به و گلابی بیشتر است. در مطابقت با این یافته‌ها امامی و همکاران (۸) گزارش نمودند که افزودن تفاله انار به

افزودن تفاله هسته انار با آنزیم به جیره مرغ تخم‌گذار اثر معنی‌داری بر غلظت پروتئین خون نداشت (جدول ۷). ولی غلظت مالون دی‌آلدئید خون مرغ‌ها تخم‌گذار تغذیه شده با تفاله هسته انار به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کاهش یافت ($P < 0.05$). غلظت مالون دی‌آلدئید پلاسمای خون به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب شناخته می‌شود بنابراین هرچه این شاخص بالاتر باشد نشان‌دهنده پراکسیده شدن بیشتر لیپیدها خواهد بود. تفاله هسته انار به‌دلیل داشتن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، میزان اکسیداسیون لیپیدها را

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد تفاله هسته انار تا سطح ۱۰ درصد می‌تواند با کاهش هزینه جیره مرغ‌های تخم‌گذار، بدون اثر منفی بر صفات عملکردی و کیفی تخم مرغ افزوده شود از طرف دیگر افزودن تفاله هسته به جیره مرغ‌های تخم‌گذار باعث کاهش لیپیدهای خون پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش کلسترول تخم مرغ خواهد شد.

جیره بزغاله باعث کاهش میزان MDA گردید همچنین حسینی و اشان (۱۵) گزارش نمود افزودن تفاله هسته انار به جیره جوجه گوشتی تحت تنش گرمایی باعث کاهش میزان MDA می‌شود که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری کلی

منابع

- Abbasi, H., K. Rezaei, and L. Rashidi. 2008. Extraction of essential oils from the seeds of extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1): 83-89.
- Animal Science Research institute, 2015. Introduce the technologies of extraction 5 million ton agricultural wastes in the animal husbandry industry. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Publisher, Iran, Tehran. 28-30. (In Persian).
- Aman, P. 2006. Cholesterol-lowering effects of barley dietary fibre in humans: scientific support for a generic health claim. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50 (4): 173-176.
- Anderson J. W. 1985. Physiological and metabolic effects of dietary fiber. *Federation proceedings*, 44:2902-2906.
- Ashoush, I. S., O. I. El-Batawy, and G. A. El-Shourbagy. 2012. Antioxidant activity and hepatoprotective effect of pomegranate peel and whey powders in rats. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(1): 27-32
- Brown, L., B. Bernard, W. W. Willett, and F. M. Sacks. 1999. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:30-42.
- Elkin, R. G., Z. Yan, Y. Zhong, S. S. Donkin, K. K. Buhman, J. A. Story, J. J. Turek, R. E. Porter, M. Nderson, R. Homan, and R. S. Newton. 1999. Select 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma vLDL composition. *Journal of Nutrition*, 129: 1010-1019.
- Emami, A., M. Ganjkhanelou, M. F. Nasri, A. Zali, and L. Rashidi. 2015. Pomegranate seed pulp as a novel replacement of dietary cereal grains for kids. *Small Ruminant Research*, 123:238-245.
- Gil, M. I., F. A. Tomás-Barberán, B. Hess-Pierce, D. M. Holcroft, and A. A. Kader. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4581-4589.
- Golian, A. Gh. and M. Salarmoeini. 2008. Poultry Nutrition (Translation), The education and research of Kowsar economic organization. Iran, Tehran, 20-30. (In Persian).
- Hosseini-Vashan, S. J. 2016. Antioxidant status, plasma lipid of broilers fed diets contained pomegranate pulp with enzyme. XXV Worlds Poultry Science congress. Beijing, China, September. 2016.
- Hosseini-Vashan, S. J., N. Afzali, M. Mallekaneh, M. A. Naseri, and A. Allahresani. 2008. The effect of different concentrations of safflower seed on laying hen's performance, yolk and blood cholesterol and immune system. *International Journal of Poultry Science*, 7(5): 470-473.
- Hosseini-Vashan, S. J. and T. Ghaznavi. 2016. Determination Metabolizable energy content and nutritive value of pomegranate peel and pulp, using adult cockerels. *Animal production Journals (Aburihan Tehran)*, 18(3): 513-524. (Abstract in English).
- Hosseini-Vashan, S. J. and M. Raei-Moghadam, 2016. Plasma lipid profile, antioxidant status of broilers reared under high temperature fed pomegranate pulp and enzyme. XXV Worlds Poultry Science congress. Beijing, China, September. 2016.
- Hosseini-Vashan, S. J., M. Raei-Moghadam, and S. M. Hosseini. 2016. Effects of diets contained pomegranate pulp with enzyme on performance, carcass, abdominal fat and immune system of broiler chickens. XXV Worlds Poultry Science congress. Beijing, China, September. 2016.
- Hursel R. and M. S. Westerterp-Plantenga. 2013. Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6): 1682S-1693S.
- Karlsen, A., L. Retterstøl, P. Laake, and et al., 2007. Anthocyanins inhibit nuclear factor-κB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 137(8) 1951-1954.
- Menge, H., L. H. Littlefield, L. T. Frobish, and B. T. Weinland. 1974. Effect of cellulose and cholesterol on blood and yolk lipids and reproductive efficiency of the hen. *Journal of Nutrition*, 104: 1554-1566.
- Mosele, J. I., A. Macià, and M. J. Motilva. 2015. Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A Review. *Molecule*, 20: 17429-17468.
- Noda, Y., T. Kaneyuki, A. Mori, and A. Packer. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its

- anthocyanidin: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. Journal of Agriculture Food Chemistry, 50: 166-171.
- 21- Pedriali, C. A., A. U. Fernandes, P. A. dos Santos, M. M. da Silva, D. Severino, and M. B. da Silva. 2010. Antioxidant activity, cito- and phototoxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed pulp extract. Food Science and Technology (Campinas), 30(4): 1017-1021.
- 22- Rababah, T. M., K. I. Ereifej, M. A. Al-Mahasneh, and M.A. Al-Rababah. 2006. Effect of plant extracts on physicochemical properties of chicken breast meat cooked using conventional electric oven or microwave Poultry Science, 85: 148-154.
- 23- Rabet, M., A. A. Saki, P. Zamani, A. M. Vatankhah, and S. Mirzaei. 2012. Performance traits of laying hens response to pomegranate pulp and Multi-enzyme. The conference of Science and applied in Using of agricultural, Urbans and Industries in Ration of Animal, Poultry and Aquatic, Iran, Tabriz, University of Tabriz, 19.
- 24- Rajabian, T., H. Fallah Hoseini, M. Karami, A. Rasuli, and S. Faghihzadeh. 2007. Effects of pomegranate juice and seed oil on blood lipid levels and atherosclerosis in rabbits hypercholestrolemic. Journal of Medicare Plans, 25: 93-105.
- 25- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Animal Science, 73: 1516-1528.
- 26- Sadeghi, N., B. J. Jannat, M. R. Oveisi, M. Hajimahmoodi, and M. Photovat. 2009. The antioxidant activity of Iranian pomegranate (*punica granatum* L.) seed extracts. Agricultural Science, 11: 633-638.
- 27- Saki, A. A., M. Rabet, P. Zamani, and Y. Yosefi. 2014. The effect of different levels of pomegranate seed pulp with multi-enzyme on performance, egg quality and serum antioxidant in laying hens. Iranian Journal of Applied Animal Science, 4(4): 803-808.
- 28- Samadloiy, H. R., M. H. Azizi, and M. Barzegar. 2007. Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic components on soybean oil. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 14(4): (Abstract in English).
- 29- Schwartz, S. E., C. Starr, S. Bachman, Holtzapple, and G. Philip. 1984. Dietary fiber decreases cholesterol and phospholipid synthesis in rat intestine. Journal of Lipid Research, 24: 748-752.
- 30- Turk D. E., and B. D. Barnett. 1973. Diet and egg cholesterol content. Poultry Science, 52: 1881-1884.
- 31- Wang, S., N. Moustaid-Moussa, L. Chen, H. Mo, A. Shastri, R. Su, P. Bapat, I. S. Kwun, and C. L. Shen. 2014. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. Journal of Nutritional Biochemistry, 25(1): 1-18,
- 32- Yoshioka, T., K. Kawada, T. Shimada, and M. Mori. 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. American Journal of Obstet Gynecol, 135: 372-376.
- 33- Zahin, M., F. Aqil, and I. Ahmad. 2010. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* peel extracts. Mutation Research, 703(2): 99-107.



The Performance and Egg Quality Parameters Effect of Pomegranate Pulp on of Laying Hens in Peak Production

S. J. Hosseini-Vashan^{1*} - T. Ghaznavi²

Received: 17-02-2017

Accepted: 23-10-2017

Introduction: One of the main sections of charges in poultry production is the cost of the ration. Thus, the producers are continuously looking to find new compounds that using in poultry diets with low prices. Usage the agricultural and food industry by-products are new strategies to reduce the environmental contamination and animal diet costs. Pomegranate granatum is a fruit from the *punicaceae* family. The pomegranate pulp is a by-product that has valuable components for poultry nutrition involved protein, fat, Ash and bioactive compounds. Pomegranate pulp has punicallagin, ellagic acid, tannic acid, flavonoid and anthocyanin. The usage of antibiotic in poultry production was banned because they have several negative effects on poultry and human. Therefore, the medicinal herb contained flavonoid and polyphenolic compounds were extremely increased. An experiment was designed to evaluate the effects of pomegranate pulp and Multi- Enzyme on performance parameters, egg quality, eggshell parameters, egg lipid profiles, blood lipid profile, and the blood concentration of malondialdehyde in peak production of laying hens.

Materials and Methods: A total 200 of Hy-Line W-36 at peak production with 32 weeks were selected and allotted to 20 experimental units. The dietary treatments were included the levels of 0, 4, 7 and 10 % of pomegranate pulp with 5gr of multi-enzyme WX. The egg production, egg weight, egg mass feed intake, and feed conversion ratio were weekly recorded. The egg quality parameters involved egg shape, yolk index, yolk color index and haugh unit, the relative weight of yolk and white were determined three consecutive periods (each 28 days). As the same periods, the eggshell parameters such as; eggshell weight, eggshell thickness, specific gravity, and eggshell resistance were evaluated. The egg cholesterol was determined. At the end of experiments, the bloods of two birds from each replication were gathered. The blood plasma was prepared. The blood lipid, total protein, and malondialdehyde were determined by auto analyzer instrument. The data were analyzed with the general linear model by SAS software. The mean differences among treatments were studied by Tukey's test ($P < 0.05$).

Results and Discussion: The results revealed that pomegranate pulp did not affect feed intake. The diets contained 10 percentage of pomegranate pulp increased the egg production, egg weight, egg mass. The FCR decreased when birds received 10 % pomegranate pulp. Pomegranate pulp had a valuable percentage of protein and fat and also it has bioactive components involved ellagic acid, punicallagin and flavonoid that they could be affect the metabolism of birds and improved the performance traits. The egg quality parameters included egg shape, yolk index, and yolk colure index did not affect by the levels of pomegranate pulp. However, the haugh unit and the relative weight of white increased when birds fed 10% pomegranate pulp. Haugh unit is synthetized in the magnum of the oviduct. The concentration of nutrients in the blood may alter the white quality and haugh unit. The eggshell parameters involve eggshell thickness and resistance increased when the 4 percentage of pomegranate pulp were included to laying hen diets, however; the higher levels of pomegranate pulp has not the same effects. Thus, higher concentration of fiber in upper levels of pomegranate pulp may negative influence on the absorption of minerals. The egg yolk lipids included LDL, triglyceride was decreased, and the HDL was increased when pomegranate pulp was added to layer diets. The pomegranate pulp decreased the blood cholesterol. The previous studies were revealed that fiber and flavonoid or polyphenolic components have hypocholesterolemia effects. The pomegranate pulp suppressed the plasma malondialdehyde. The concentration of malondialdehyde is an index of lipid peroxidation. This antioxidant effects on the blood of birds is due to flavonoid, polphenolic, ellagic acid, punicallagin components in pomegranate pulp.

1, 2- Associate Professor and Graduate student of Animal Nutrition, Animal Science Department, University of Birjand, Birjand, Iran, respectively

(* - Corresponding author email: jhosseiniv@birjand.ac.ir)

Conclusion: It is concluded that pomegranate pulp may be combined with multi enzyme be included to laying hen diets with no any negative effects on performance and egg quality parameters; it also may improve the yolk cholesterol and antioxidant properties of laying hens.

Keywords: Egg quality, Layers, Malondialdehyde, Performance, Pomegranate pulp

برآورد اندازه مؤثر جمعیت گوسفند نژاد سنگسری با استفاده از روش‌های مختلف مبتنی بر تجزیه و تحلیل شجره

محمد رضا شیخلو^{۱*} - عین الله عبدی قزلجه^۱ - رشید صفری^۱ - ذبیح الله نعمتی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۳

چکیده

اندازه مؤثر جمعیت به علت رابطه مستقیم با نرخ افزایش همخونی و همچنین میزان کاهش تنوع ژنتیکی حاصل از رانش ژنتیکی، یکی از فراسنجه‌های مهم در ژنتیک جمعیت و حفظ ذخایر ژنتیکی به‌شمار می‌رود. در این تحقیق از اطلاعات شجره‌ای گوسفندان نژاد سنگسری که طی ۲۷ سال (۱۳۶۸-۱۳۹۴) در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد شهرستان دامغان جمع‌آوری شده بود جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از شش روش مختلف استفاده گردید. در این روش‌ها از منابع اطلاعاتی مختلفی چون تعداد والدین نر و ماده در هر سال، نرخ افزایش همخونی بین دام‌ها و والدین آنها، نرخ افزایش همخونی بین دام‌ها و نسل قبلی آنها، نرخ افزایش ضریب خویشاوندی افزایشی، ضریب رگرسیون همخونی بر سال تولد و افزایش همخونی فردی جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت استفاده گردید. برآوردهای به‌دست آمده توسط روش‌های مختلف با هم متفاوت بوده و از ۴۱ تا ۸۳۶۹ رأس متغیر بود. بهترین روش با توجه به برخی معیارها همچون بازه زمانی مورد استفاده، آزمون تشکیل یا عدم تشکیل زیرجمعیت‌ها، پایایی برآوردها و عدم برآورد منفی برای اندازه مؤثر جمعیت انتخاب گردید. با در نظر گرفتن معیارهای مورد نیاز، برآوردهای حاصل از روش افزایش همخونی فردی به‌عنوان بهترین برآورد از اندازه مؤثر جمعیت در این شجره انتخاب گردید. میانگین اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده با استفاده از این روش ۱۳۱ رأس بود. با توجه به بسته بودن این گله اصلاح نژادی و عدم ورود دام از دیگر گله‌ها، به‌کارگیری روش‌هایی جهت جلوگیری از کاهش اندازه مؤثر جمعیت همچون استفاده از روش مشارکت بهینه والدین توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اندازه مؤثر جمعیت، تجزیه و تحلیل شجره، گوسفند سنگسری، همخونی

مقدمه

طراحی می‌شوند با افزایش همخونی و کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت همراه هستند. امروزه حفظ تنوع ژنتیکی دام‌ها در جمعیت‌های بسته تحت انتخاب یکی از اساسی‌ترین چالش‌های محققین می‌باشد (۱۳). کاهش تنوع ژنتیکی باعث کاهش تنوع آلی و افزایش هموزیگوسیتی و ایجاد دام‌های همخون و به‌تبع آن کاهش عملکرد در صفات اقتصادی دام‌ها می‌گردد. یکی از معیارهای مهم سنجش سطح تنوع ژنتیکی جمعیت، اندازه مؤثر جمعیت N_e می‌باشد. این فراسنجه به علت رابطه مستقیم با سطح همخونی جمعیت، میزان شایستگی ژنتیکی و همچنین میزان کاهش تنوع ژنتیکی حاصل از رانش ژنتیکی، یکی از فراسنجه‌های مهم در ژنتیک جمعیت و حفظ ذخایر ژنتیکی به‌شمار می‌رود. به همین علت اندازه مؤثر جمعیت توسط فائو، IUCN^۳ و دیگر مراکز تحقیقاتی به‌عنوان یکی از معیارهای مهم بررسی خطر انقراض دام‌های اهلی به‌شمار می‌رود (۹ و ۳۲). به‌طور

گوسفند نژاد سنگسری یکی از مقاوم‌ترین نژادهای بومی کشور محسوب می‌شود که خاستگاه آن منطقه‌ای به نام سنگسر در شمال شهرستان سمنان می‌باشد. گوسفند سنگسری، به‌دلیل ظرفیت، قدرت زیاد و مقاومت در مقابل عوامل محیطی یکی از بهترین نژادهای گوشتی کشور می‌باشد. گوسفندان سنگسری از حیث پرورار بی‌نظیرند و محصول گوشت آنها تقریباً ۶۰٪ وزن گوسفند پیش از ذبح شدن است (۲۳). ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند سنگسری واقع در شهرستان دامغان با هدف شناسایی خصوصیات تولیدی و تولیدمثلی و اصلاح نژاد گوسفندان اصیل سنگسری و انتخاب بهترین قوچ‌ها جهت توزیع آنها در بین دامداران منطقه مشغول به فعالیت می‌باشد. معمولاً برنامه‌های انتخاب که در جمعیت‌های بسته جهت بهبود ژنتیکی دام‌ها

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
(Email: mr.sheikhlo@gmail.com)

(*)-نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.62343

2- Effective population size

3- International Union for Conservation of Nature

نسل‌های معادل کامل از طریق فرمول زیر برآورد گردید (۲۱):

$$CGE_i = \sum (1/2)^n$$

که در آن n تعداد نسل‌هایی است که حیوان را از هر والد معلومش جدا می‌کند. سپس میانگین شاخص تکامل شجره و تعداد نسل‌های معادل کامل دام‌های متولد شده در هر سال تولد محاسبه گردید.

اندازه مؤثر جمعیت

به‌طور خلاصه، اندازه مؤثر جمعیت عبارتست از تعداد افراد یک جمعیت ایده‌آل ژنتیکی که می‌تواند نرخ رانش ژنتیکی مشابه با جمعیت مورد بررسی داشته باشد (۷ و ۱۰). روش‌های مختلفی جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از داده‌های شجره ارائه شده‌اند. این در حالی است که بسته به شرایط جمعیت تحت مطالعه مانند تشکیل زیرجمعیت‌ها، سطح تکامل شجره و نمونه تحت بررسی از جمعیت، روش مناسب برآورد اندازه مؤثر جمعیت می‌تواند متفاوت باشد (۱۲ و ۱۸). در این تحقیق شش روش زیر برای برآورد اندازه مؤثر جمعیت مورد استفاده قرار گرفت:

۱- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از تعداد والدین و ماده (N_e-Census)

در این روش که ساده‌ترین روش تئوریک برآورد اندازه مؤثر جمعیت می‌باشد، از نسبت جنسی بین نرها و ماده‌ها و فرمول زیر جهت برآورد استفاده می‌گردد (۱۲ و ۳۶).

$$N_e = 4 * \frac{S_n * D_n}{S_n + D_n} * 0.7$$

که در آن S_n تعداد نرها در هر نسل و D_n تعداد ماده‌ها در هر نسل می‌باشد.

۲- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرخ افزایش همخوانی بین دام‌ها و والدین مستقیم آنها (N_e - ΔF_p)

در این روش ابتدا باید دو گروه^۱ از حیوانات در نسل t و نسل $t-1$ برای محاسبه نرخ افزایش همخوانی در نظر گرفته شوند. حیوانات متولد شده در یک سال به‌عنوان گروه t در نظر گرفته می‌شوند. والدین مستقیم تمام حیوانات گروه t به‌عنوان گروه $t-1$ در نظر گرفته می‌شوند. میانگین همخوانی دام‌ها در این گروه به‌عنوان F_{t-1} در نظر گرفته می‌شود. سپس نرخ افزایش همخوانی و اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از روابط زیر برآورد می‌گردد (۷):

کلاسیک، اندازه مؤثر جمعیت را می‌توان از افزایش همخوانی بین دو نسل متوالی برآورد نمود که استفاده از این روش محدود به گونه‌های جانوری آزمایشگاهی و یا گونه‌هایی است که بتوان حیوانات متعلق به نسل‌های مختلف را از هم تفکیک نمود. در حالی که در اکثر دام‌های اهلی به‌علت نسل‌های همپوشان و آمیزش بین حیوانات متعلق به نسل‌های مختلف تعریف دقیقی از نسل کنونی و پیشین وجود نداشته و به راحتی نمی‌توان دام‌ها را به نسل‌های مختلف نسبت داد. روش‌های مختلفی برای حل این مسئله و برآورد اندازه مؤثر جمعیت، همچون استفاده از واریانس اندازه خانواده‌ها، رگرسیون همخوانی دام‌ها بر واحد زمان و استفاده از افزایش همخوانی فردی ارائه شده‌اند (۱۵ و ۲۷). با این وجود استفاده از همه این روش‌ها جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت در هر جمعیتی امکان‌پذیر نبوده و در برخی موارد به علت ساختار خاص شجره و نحوه مدیریت ژنتیکی گله‌ها، برآوردهای اریب و یا غیر معقول (برآوردهای منفی) برای این پارامتر به‌دست می‌آید (۱۲ و ۱۸). از این رو، بسته به ساختار شجره و نحوه مدیریت ژنتیکی و سیستم پرورشی و آمیزشی به‌کار رفته در جمعیت، باید از روش مناسب جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت استفاده نمود. هدف از تحقیق حاضر برآورد اندازه مؤثر جمعیت دام‌های ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند سنگسری دامغان با به‌کارگیری روش‌های مختلف مبتنی بر تجزیه و تحلیل شجره و انتخاب بهترین روش جهت برآورد بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از فایل شجره گوسفندان نژاد سنگسری ایستگاه اصلاح نژاد دامغان حاوی ۷۳۱۱ رکورد شجره (۳۳۲۳ قوچ و ۳۹۸۸ میش) جمع‌آوری شده در طی سال‌های ۱۳۶۸ تا ۱۳۹۴ بود، جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از روش‌های مختلف استفاده گردید. قبل از انجام تجزیه و تحلیل شجره و برآورد اندازه مؤثر جمعیت ابتدا سطح تکامل شجره مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور ابتدا درصد حیوانات دارای پدر و مادر معلوم در فایل شجره برآورد گردید. سپس برای تمام حیوانات موجود در فایل شجره شاخص تکامل شجره با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد (۲۰):

$$PCI_{animal} = \frac{2C_{sire}C_{dam}}{C_{sire} + C_{dam}}$$

C_{dam} و C_{sire} به‌ترتیب مشارکت خط پدری و مادری حیوان بوده و از طریق رابطه زیر برآورد می‌گردد:

$$C = \frac{1}{d} \sum_{i=1}^d a_i$$

که در آن a_i نسبت اجداد معلوم در نسل i بوده و d تعداد نسل‌هایی است که در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق مقدار d پنج در نظر گرفته شد. همچنین برای هر حیوان موجود در شجره، تعداد

بین تمام آمیزش‌های ممکن بین دام‌های نر و ماده این گروه نیز محاسبه می‌گردد. سپس اندازه مؤثر جمعیت از رابطه زیر قابل برآورد خواهد بود:

$$\Delta f_g = \frac{f_t - f_{t-1}}{1 - f_{t-1}} \quad N_e = \frac{1}{2\Delta F}$$

که در آن f_t میانگین ضریب خویشاوندی ژنتیکی افزایشی افراد گروه t و f_{t-1} میانگین ضریب خویشاوندی ژنتیکی افزایشی افراد گروه $t-1$ می‌باشد (۱۲). انتظار می‌رود که روند میانگین ضریب خویشاوندی دام‌ها در یک جمعیت نوسانات کمتری نسبت به همخونی دام‌ها داشته باشد زیرا میانگین ضریب خویشاوندی دام‌ها بر اساس تمام آمیزش‌های فرضی ممکن برآورد می‌گردد.

۵- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از ضریب

$$(N_e - Ln)$$

پرز انسیزو (۲۷) از رابطه زیر جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت استفاده کرد:

$$1 - F_t = (1 - (\frac{1}{2N_e}))^t$$

با استفاده از رابطه فوق، ΔF را می‌توان از رگرسیون لگاریتمی $(1-F)$ بر شماره نسل به‌دست آورد. برای سهولت محاسبات می‌توان رگرسیون لگاریتمی $(1-F)$ را بر روی سال تولد محاسبه کرده و سپس آن را بر اساس فاصله نسلی تصحیح نمود:

$$\Delta F_{in} = (-1)bL$$

که در آن b ضریب رگرسیون لگاریتمی $(1-F)$ بر روی سال تولد و L فاصله نسلی می‌باشد. سپس اندازه مؤثر جمعیت از رابطه زیر قابل برآورد خواهد بود:

$$N_e = \frac{1}{\Delta F_{in}}$$

۶- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از افزایش

$$(N_e - Ecg)$$

در یک جامعه با تعداد افراد n که از لحاظ ژنتیکی در حالت جمعیت ایده‌آل به سر می‌برد میزان همخونی در نسل t از رابطه زیر قابل محاسبه است:

$$F_t = 1 - (1 - \Delta F)^t$$

با استفاده از معادله فوق و با برابر قرار دادن ضریب همخونی هر فرد با متوسط ضریب همخونی جمعیت ایده‌آل که در آن همه افراد، ساختار شجره یکسانی دارند ($F_t = F_i$) میزان افزایش همخونی فردی را می‌توان به‌صورت زیر نشان داد:

$$\Delta F_i = 1 - \sqrt[ecg]{1 - F_i}$$

$$\Delta F_p = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}} \quad N_e = \frac{1}{2\Delta F}$$

در این روش میانگین همخونی تنها گروه کوچکی از والدین (والدین حیوانات گروه t) در هر سال برای محاسبه نرخ افزایش همخونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نتیجه انتظار می‌رود که N_e برآورد شده با توجه به آمیزش‌هایی که منجر به تولد حیوانات گروه t در هر سال تولد گشته است، نوسان کند (۱۲). با این وجود مزیت این روش این است که برآوردهای حاصل از این روش منعکس‌کننده تغییرات اخیر اندازه مؤثر جمعیت می‌باشد.

۳- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرخ افزایش

$$(N_e - \Delta F_g)$$

در این روش نیز ابتدا باید دو گروه از حیوانات در نسل t و نسل $t-1$ برای محاسبه نرخ افزایش همخونی در نظر گرفته شوند. حیوانات متولد شده در یک سال به‌عنوان گروه t در نظر گرفته می‌شوند. سپس تمام حیوانات متولد شده در محدوده زمانی یک فاصله نسلی قبل از حیوانات گروه t ، به‌عنوان گروه $t-1$ در نظر گرفته می‌شوند. میانگین همخونی دام‌ها در این گروه به‌عنوان F_{t-1} در نظر گرفته می‌شود. سپس نرخ افزایش همخونی و اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از روابط زیر برآورد می‌گردد (۷ و ۱۲):

$$\Delta F_g = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}} \quad N_e = \frac{1}{2\Delta F}$$

نکته قابل توجه اینکه در این روش حیواناتی که هیچ رابطه‌ای با حیوانات گروه t ندارند نیز می‌توانند در گروه $t-1$ حضور داشته باشند و از سوی دیگر ممکن است تمام والدین گروه t در گروه $t-1$ حضور نداشته باشند. انتظار می‌رود برآوردهای حاصل از این روش در مقایسه با روش قبل پایاتر بوده و نوسانات کمتری داشته باشند (۱۲).

۴- برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از نرخ افزایش

$$(N_e - Coan)$$

نرخ تغییرات ضریب خویشاوندی افزایشی می‌تواند به جای نرخ تغییرات همخونی، در برآورد اندازه مؤثر جمعیت به‌کار برده شود. در این روش نیز ابتدا باید دو گروه از حیوانات در نسل t و نسل $t-1$ برای محاسبه نرخ افزایش ضریب خویشاوندی در نظر گرفته شوند. حیوانات متولد شده در یک سال به‌عنوان گروه t در نظر گرفته می‌شوند و خویشاوندی ژنتیکی افزایشی بین تمام آمیزش‌های ممکن بین دام‌های نر و ماده این گروه محاسبه می‌گردد. سپس تمام حیوانات متولد شده در محدوده زمانی یک فاصله نسلی قبل از حیوانات گروه t ، به‌عنوان گروه $t-1$ در نظر گرفته شده و خویشاوندی ژنتیکی افزایشی

جدول ۱- روش‌های برآورد اندازه مؤثر جمعیت (Ne)

Table 1- Methods for estimating effective population size

توضیحات Description	فرمول Formula	منبع Source	روش Method
S_n = number of sires per generation, D_n = number of dams per generation	$N_e = 4 * \frac{S_n * D_n}{S_n + D_n} * 0.7$	Wright (1984)	$N_e - Cens$ (1)
F_t = inbreeding coefficient of offspring, F_{t-1} = inbreeding coefficient of direct parents	$\Delta F_p = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$	Falconer & Mackay (1996)	$N_e - \Delta F_p$ (2)
F_{t-1} = inbreeding coefficient of the parents' generation	$\Delta F_g = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$	Falconer & Mackay (1996)	$N_e - \Delta F_g$ (3)
f_t = additive genetic relationship (AGR) of offspring, f_{t-1} = AGR of parents	$\Delta f_g = \frac{f_t - f_{t-1}}{1 - f_{t-1}}$	Falconer & Mackay (1996)	$N_e - Coan$ (4)
b = slope of the logarithmic regression of $\ln(1-F)$ on year of birth, L = generation interval	$\Delta F_{Ln} = (-1)bL$	Perez-Enciso (1995)	$N_e - Ln$ (5)
ecg = sum of all known ancestors with $(1/2)^n$, F_i = individual inbreeding coefficient	$\Delta F_i = 1 - \frac{ecg_i}{\sqrt{1 - F_i}}$	Gutierrez et al. (2009)	$N_e - Ecg$ (6)

گیرد استفاده از روند تغییرات همخونی یا ضریب خویشاوندی در برآورد اندازه مؤثر جمعیت می‌باشد. اگرچه در شرایط آمیزش تصادفی نتایج حاصل از هر دو روش می‌تواند یکسان باشد، با این وجود در شرایط تقسیم جمعیت به زیرجمعیت‌ها و انتخاب داخل زیرجمعیت‌ها و تبادل کم افراد بین زیرجمعیت‌ها، میانگین همخونی افراد داخل زیرجمعیت‌ها بالا خواهد بود. درحالی‌که میانگین ضریب خویشاوندی بین کل افراد جمعیت بسیار کمتر خواهد بود. در این شرایط استفاده از برآوردهایی که از روند تغییرات ضریب خویشاوندی استفاده می‌کنند، جهت پایش کاهش تنوع ژنتیکی در کل افراد جمعیت مناسب‌تر خواهد بود (۱ و ۳). چهار روش از شش روش مورد اشاره در جدول یک از روند تغییرات همخونی جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت استفاده می‌کنند در حالی‌که روش Ne-Coan از روند تغییرات ضریب خویشاوندی جهت برآورد استفاده می‌کند. بررسی وجود ساختار در جمعیت و تشکیل زیرجمعیت‌ها از طریق تفاوت بین میانگین برآوردهای حاصل از روش Ne-Coan و روش $N_e - \Delta F_g$ انجام می‌پذیرد. مقایسه بین دو برآورد حاصل از روش‌های فوق نشان‌دهنده چگونگی تفاوت سیستم آمیزشی موجود از حالت آمیزش تصادفی خواهد بود (۳ و ۱۲). اگر برآورد حاصل از روش Ne-Coan بسیار بیشتر از برآورد حاصل از روش $N_e - \Delta F_g$ باشد، می‌توان به تشکیل زیرجمعیت‌ها پی برده و برآورد حاصل از روش Ne-Coan را به‌عنوان برآوردی معتبر از اندازه مؤثر واقعی جمعیت مورد قبول قرار داد.

مسئله دیگر در انتخاب بهترین روش بازه زمانی مورد استفاده جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت می‌باشد. روش‌های مختلف برآورد

که در آن ecg مقدار تعداد نسل‌های معادل کامل^۱ می‌باشد (۱۵). بدین ترتیب مقادیر ΔF_i محاسبه شده برای همه افراد جمعیت تحت بررسی بدون نیاز به منسوب کردن افراد به نسل‌های مجزا و با توجه به عمق شجره آنها، می‌تواند برای برآورد Ne مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از میانگین مقادیر ΔF_i محاسبه شده برای افراد، می‌توان $\overline{\Delta F}$ را برای جمعیت تحت بررسی محاسبه نمود. سپس میانگین اندازه مؤثر تحقق یافته جمعیت را می‌توان با استفاده از رابطه زیر به‌دست آورد:

$$\overline{N_e} = \frac{1}{\overline{\Delta F}}$$

گوتیرز و همکاران (۱۴) با در نظر گرفتن تأخیر یک نسلی بین تغییر در فراوانی آلی ایجاد شده در اثر رانش ژنی تصادفی در نسل گذشته و همخونی فرزندان نسل کنونی، فرمول محاسبه افزایش همخونی فردی را به شکل زیر تغییر دادند:

$$\Delta F_i = 1 - \frac{ecg_i - 1}{\sqrt{1 - F_i}}$$

که با استفاده از فرمول اخیر، برآوردهای حاصل از این روش در جمعیت‌های واقعی بهبود یافت.

شش روش به‌کار رفته برای برآورد اندازه مؤثر جمعیت در این تحقیق و اطلاعات مورد استفاده در برآورد روند تغییرات همخونی و ضریب خویشاوندی به‌طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است.

انتخاب مناسب‌ترین روش

اولین مسئله‌ای که در انتخاب بهترین برآورد باید مورد توجه قرار

استفاده می‌کنند مرتب گردیده‌اند و سپس روش Ne-Cens به‌عنوان آخرین انتخاب که نامناسب‌ترین روش در نظر گرفته می‌شود در رتبه آخر قرار داده شده است.

اندازه مؤثر جمعیت از بازه‌های زمانی مختلفی جهت برآورد استفاده می‌کنند. روشی که کوتاه‌ترین بازه زمانی اخیر را جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت به کار می‌برد، مناسب‌ترین روش خواهد بود (۱۲). در جدول ۲ روش‌های مختلف بر اساس بازه زمانی که جهت برآورد

جدول ۲- روش‌های مورد استفاده جهت برآورد Ne با توجه به بازه زمانی اطلاعات مورد استفاده در هر روش

Table 2- Methods and time period of data used for estimating effective population size

Time period of data used for estimation	بازه زمانی اطلاعات مورد استفاده در برآورد	روش
Animals born in generation t	حيوانات متولد شده در نسل t	$N_e - Ln$
Animals and their parents born in generation t	حيوانات متولد شده در نسل t و والدین آنها	$N_e - \Delta F_p$
Animals born in generation t and t-1	حيوانات متولد شده در نسل t و نسل t-1	$N_e - \Delta F_g$
Animals born in generation t+1 and t	حيوانات متولد شده در نسل t+1 و نسل t	$N_e - Coan$
Animals with their complete ancestors born in generation t	حيوانات متولد شده در نسل t به همراه تمام اجداد موجود آنها در شجره	$N_e - Ecg$
Parents of animals born in generation t	والدین حيوانات متولد شده در نسل t	$N_e - Cens$

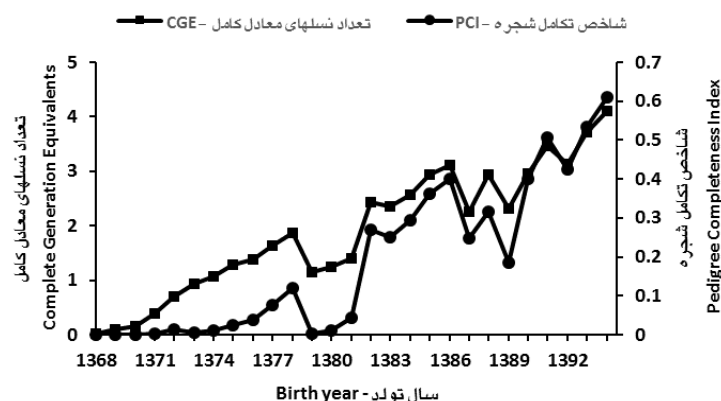
EVA نسخه ۱/۰۳، جهت برآورد تعداد نسل‌های معادل کامل از نرم‌افزار ENDOG نسخه ۴/۸ و جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت با استفاده از روش‌های مختلف از نرم‌افزار POPREP استفاده گردید (۲)، ۱۲ و ۱۶). لازم به ذکر است که نرم‌افزار POPREP معیارهای مورد نیاز جهت انتخاب بهترین روش را در فایل خروجی به همراه برآوردهای اندازه مؤثر جمعیت ارائه می‌دهد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل، ۷۰٪ حیوانات موجود در فایل شجره دارای پدر و مادر معلوم بودند. روند شاخص تکامل شجره و تعداد نسل‌های معادل کامل در طول سال‌های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است.

همانطوری که در جدول ۲ دیده می‌شود بازه زمانی مورد استفاده توسط روش‌های مختلف جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت متفاوت بوده و در نتیجه حساسیت آنها در پاسخ به تغییرات سریع در اندازه جمعیت متفاوت خواهد بود. بر اساس جدول ۲ و با در نظر گرفتن بازه زمانی مورد استفاده توسط روش‌های مختلف، بهترین روشی که ابتدا در نظر گرفته خواهد شد روش Ne-Ln خواهد بود. سپس برآوردهای حاصل از این روش از لحاظ احراز شرایط مورد نیاز جهت برآورد قابل قبول مورد بررسی قرار می‌گیرند. شرایط مورد نیاز جهت برآورد قابل قبول عبارتند از پایداری برآوردها و همچنین عدم برآورد منفی برای اندازه مؤثر جمعیت در بازه زمانی مورد استفاده جهت برآورد. اگر شرایط مورد نیاز جهت حصول برآورد قابل قبول برقرار نباشد روش بعدی یا همان $N_e - \Delta F_p$ در نظر گرفته می‌شود و به همین ترتیب ادامه خواهد یافت.

در این تحقیق جهت محاسبه شاخص تکامل شجره از نرم‌افزار



شکل ۱- روند شاخص تکامل شجره (PCI) و تعداد نسل‌های معادل کامل (CGE) در طول سال‌های مورد مطالعه

Figure 1- Evolution of pedigree completeness index (PCI) and complete generation equivalent (CGE) in the studied years

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، سطح تکامل شجره در سال‌های اولیه شروع به کار مرکز کم بوده و با ادامه روند ثبت مشخصات دام‌های متولد شده در هر سال، به تدریج میزان سطح تکامل شجره دام‌ها افزایش یافته است. میانگین شاخص تکامل شجره و تعداد نسل‌های معادل کامل دام‌های متولد شده در سال‌های انتهایی فایل شجره به ترتیب در حدود ۰/۶۱ و ۴/۱ بود که این مقادیر

جهت برآورد هم‌خونی و ضریب خویشاوندی دام‌ها و به تبع آن برآورد اندازه مؤثر جمعیت در سطح قابل قبولی قرار داشت. مقادیر اندازه مؤثر جمعیت (Ne) به دست آمده با روش‌های مختلف به همراه بازه زمانی مورد استفاده و اشتباه استاندارد برآوردها در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- مقادیر برآوردهای اندازه مؤثر جمعیت توسط روش‌های مختلف

Table 3- Effective population size estimated with different methods

Ne-Ecg	Ne-Ln	Ne-Coan	$N_e - \Delta F_g$	$N_e - \Delta F_p$	Ne-Cens	سال Year
153	126	41	91	-25628	98	1394
140	62	77	115	454	121	1393
120	332	-256	460	8369	112	1392
113	61	-391	258	237	115	1391
135	180	-168	1665	198	121	1390
146	-290	-259	432	139	138	1389
1368-1394	1391-1394	1391-1398	1387-1394	1387-1394	1387-1390	بازه زمانی مورد استفاده Data history
3.8	156.5	108.1	158.8	12101.1	9.9	اشتباه استاندارد Standard Error

برای اندازه مؤثر جمعیت به دست نیامده باشد. با توجه به نتایج جدول ۳، در برآوردهای حاصل از روش ۲ و ۴ مقدار عددی Ne برآورد شده برای برخی سال‌ها در بازه زمانی مورد استفاده جهت برآورد منفی می‌باشد که این اعداد نمی‌توانند به عنوان یک برآورد منطقی و قابل قبول مد نظر قرار گیرند.

یکی از معیارهایی که می‌تواند جهت بررسی میزان تغییرات Ne مورد استفاده قرار گیرد ریشه دوم واریانس باقی‌مانده‌ها پس از برازش خط رگرسیونی برآوردها بر سال تولد می‌باشد که در این تحقیق و بر اساس پیشنهاد نرم‌افزار مورد استفاده (POPREP) حداکثر مقدار قابل قبول این معیار ۲۰ در نظر گرفته شد (۱۲). با توجه به نتایج جدول ۳، مقدار این آماره برای روش‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ بیشتر از آستانه مورد نظر یعنی ۲۰ بود و در بین روش‌های به کار گرفته شده تنها برآوردهای حاصل از روش‌های ۱ و ۶ دارای اشتباه استاندارد کمتر از آستانه مورد نظر بودند که مقدار این پارامتر در روش ۶ از همه روش‌های دیگر کمتر بود.

با توجه به ساختار شجره مورد استفاده در این تحقیق و با در نظر گرفتن شرایط مورد نیاز جهت برآورد قابل قبول از اندازه مؤثر جمعیت، روش ۶ (Ne-Ecg) به عنوان بهترین روش برای برآورد اندازه مؤثر جمعیت گوسفندان نژاد سنگسری انتخاب گردید. میانگین برآوردهای Ne حاصل از این روش در بازه زمانی یک فاصله نسلی قبل از آخرین سال تولد حدود ۱۳۱ راس بود.

بر طبق پیشنهادات فائو (۸) اندازه مؤثر جمعیت حداقل باید ۵۰

با استفاده از برآوردهای جدول ۳ می‌توان جمعیت مورد نظر را از لحاظ تشکیل زیرجمعیت‌ها و آمیزش بین افراد داخل زیرجمعیت‌ها مورد بررسی قرار داد. در حالتی که آمیزش‌ها داخل افراد زیرجمعیت‌ها انجام بگیرد میانگین هم‌خونی افراد داخل زیرجمعیت‌ها به سرعت بالا خواهد رفت، در حالی که میانگین خویشاوندی ژنتیکی افزایشی بین تمام افراد جمعیت هنوز در سطح پایین‌تری از میانگین هم‌خونی جمعیت قرار خواهد داشت. برای بررسی تشکیل زیرجمعیت‌ها در داخل جمعیت، میانگین برآوردهای حاصل از روش ۴ با میانگین برآوردهای حاصل از روش ۲ مورد مقایسه قرار گرفت. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده، میانگین برآوردهای حاصل از روش ۴ از لحاظ عددی (۱۳۲/۲۵-) کمتر از میانگین برآوردهای حاصل از روش ۲ (۳۳۱) بود که نشان‌دهنده عدم تقسیم جمعیت به زیرجمعیت‌ها می‌باشد.

حداقل بازه زمانی مورد نیاز جهت برآورد اندازه مؤثر جمعیت در روش‌های مختلف به اندازه یک فاصله نسلی می‌باشد. در برخی موارد روند تغییرات هم‌خونی و ضریب خویشاوندی در طول بازه زمانی مورد استفاده جهت برآورد، به صورت نزولی می‌باشد که منجر به برآوردهای منفی برای اندازه مؤثر جمعیت خواهد گردید. این گونه برآوردها غیر منطقی و بی‌مفهوم بوده و نمی‌توانند به عنوان یک برآورد منطقی از اندازه مؤثر جمعیت مد نظر قرار گرفته شوند (۱۲ و ۱۵). بنابراین یکی از شرایط لازم جهت برآورد قابل قبول که توسط نتایج خود نرم‌افزار POPREP نیز مد نظر قرار گرفته می‌شود، عبارت‌است از اینکه در بازه زمانی که از آن جهت برآورد استفاده می‌گردد هیچ برآورد منفی

تحقیق (روش افزایش همخونی فردی) به‌ترتیب ۲۳۱، ۱۸۲، ۱۰۸، ۷۸، ۱۷۲ و ۱۵۴ رأس برآورد کردند. اندازه مؤثر جمعیت کمتر نژاد رومانو در مقایسه با نژادهای دیگر به پیش‌بینی ارزش ارثی و انجام آزمون نتاج و فشار انتخاب بیشتر در این نژاد نسبت به نژادهای دیگر نسبت داده شده است. لی و همکاران (۱۹) با استفاده از روش مشابه به‌کار رفته در تحقیق حاضر، اندازه مؤثر جمعیت گوسفند فینشیپ فنلاند را ۱۲۲ رأس گزارش کردند. همچنین اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده در این تحقیق با برآوردهای به‌دست آمده برای نژادهای گوسفند داخل کشور قابل مقایسه می‌باشد. اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده برای گوسفند نژاد سنگسری در محدوده برآوردهای حاصل برای برخی نژادهای گوسفند ایرانی از جمله گوسفندان نژاد بلوچی (۱۳۴)، کرمانی (۱۰۰) و لری بختیاری (۱۰۱) می‌باشد (۳۳، ۲۹ و ۲۴).

با توجه به بسته بودن این گله هسته اصلاح نژادی و با در نظر گرفتن عدم ورود دام از خارج گله به داخل، اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده برای این دام‌ها در سطح مطلوبی قرار دارد. با این وجود به علت بسته بودن جمعیت و همچنین وقوع رانش ژنتیکی تصادفی که از خصوصیات جمعیت‌های بسته می‌باشد، برای جلوگیری از کاهش اندازه مؤثر جمعیت در آینده می‌توان از روش‌های کنترل افزایش همخونی در این گله استفاده نمود. روش‌های مختلفی برای مدیریت اندازه مؤثر جمعیت در کنار برنامه انتخاب و بهینه کردن روند همخونی جمعیت و پیشرفت ژنتیکی ارائه شده است که در بین آنها تئوری مشارکت بهینه والدین بهترین نتایج را در گله‌های اصلاح نژادی ارائه داده است (۲۸، ۳۴ و ۳۵). در این روش پس از پیش‌بینی ارزش‌های ارثی دام‌ها، روابط خویشاوندی بین همه دام‌ها محاسبه می‌گردد و سپس با استفاده از مدل‌های ریاضی، دام‌ها به نحوی انتخاب می‌گردند که تا جایی که امکان دارد هم بهترین دام‌ها از نظر ارزش ارثی انتخاب گردند و هم پس از محاسبه میزان مشارکت والدین در تولید نسل بعد، میانگین همخونی فرزندان آن‌ها در حالت آمیزش تصادفی حداقل گردد (۲۸). به‌کارگیری روش مشارکت بهینه والدین در این گله دور از دسترس نبوده و با توجه به ثبت شجره دام‌ها و رکورددگیری صفات اقتصادی، استفاده از این روش به‌عنوان کارآمدترین روش مدیریت اندازه مؤثر جمعیت در گله‌های هسته تحت انتخاب در این گله نیز توصیه می‌گردد.

سیاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مصوب به شماره ۲۷/۳۳۸۸ص در نشست کمیسیون پژوهشی دانشگاه تبریز بوده و با حمایت مالی دانشگاه تبریز اجرا شده است که بدین‌وسیله از مساعدت و همکاری حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین نویسندگان، از مسئولین محترم ایستگاه

رأس باشد. این در حالی است که بر اساس پیشنهاد مویسن (۲۲) با در نظر گرفتن جهش و رانش ژنی میزان قابل قبول اندازه مؤثر جمعیت باید بین ۵۰ تا ۱۰۰ رأس در نظر گرفته شود. البته این حدود آستانه‌ای، اعداد قطعی برای جمعیت‌های اصلاحی نمی‌باشند، بلکه از تئوری‌های ژنتیک کمی و با در نظر گرفتن اینکه انتخاب طبیعی اثرات افت هم‌خونی را خنثی می‌نماید، استخراج شده‌اند (۲۶ و ۳۰). اگر کاهش واریانس پاسخ به انتخاب در اثر رانش ژنتیکی تصادفی به‌عنوان یک معیار و هدف در نظر گرفته شود میزان قابل قبول اندازه مؤثر جمعیت باید خیلی بیشتر از این مقادیر باشد (۱۰، ۱۱، ۲۵، ۲۸ و ۳۵). لروی و همکاران (۱۸) اندازه مؤثر جمعیت ۱۴۰ جمعیت شامل ۴۰ نژاد گوسفند، ۲۰ نژاد گاو، ۲۰ نژاد اسب و ۶۰ نژاد سگ را با استفاده از اطلاعات شجره و با شش روش مختلف مورد بررسی قرار دادند. بر طبق نتایج این محققین، تعیین یک حد آستانه‌ای مطلق به‌عنوان یک مقدار قابل قبول از اندازه مؤثر جمعیت امکان‌پذیر نبوده و اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده باید با در نظر گرفتن عواملی چون روش به‌کار گرفته شده جهت برآورد، گونه دامی و ساختار جمعیت تحت بررسی مورد تفسیر قرار گیرد.

با این وجود، برآورد به‌دست آمده در این تحقیق برای گوسفند نژاد سنگسری بالاتر از مقادیر بحرانی ۵۰ تا ۱۰۰ اعلام شده توسط فائو (۸) و مویسن (۲۲) می‌باشد. همچنین همانند اکثر نژادهای دیگر گوسفند، برآورد به‌دست آمده در این تحقیق در مقایسه با اعداد به‌دست آمده برای نژادهای گاو شیری وضعیت بهتری دارد. در اکثر نژادهای گاو شیری برخلاف تعداد زیاد جمعیت کنونی آنها، اندازه مؤثر جمعیت کمتر از مقادیر بحرانی می‌باشد. ویگل (۳۴) اندازه مؤثر جمعیت نژادهای آیرشایر، براون سویس، گرنزی، هلشتاین و جرسی را در ایالات متحده آمریکا به‌ترتیب ۱۶۱، ۶۱، ۶۵، ۳۹ و ۳۰ رأس گزارش نمود. وی خاطر نشان نمود که اندازه مؤثر کل جمعیت‌های این نژادها نمی‌تواند از مقادیر به‌دست آمده در کشور آمریکا بیشتر باشند، چرا که گاوهای نر معروف در اکثر کشورها به‌وفور مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برآوردهای اندازه مؤثر به‌دست آمده برای گاوهای شیری دانمارک، آلمان، فرانسه و کانادا تأییدی برای این ادعا می‌باشند (۵، ۱۷، ۱۸، ۲۱، ۳۰ و ۳۱).

در مقایسه با گاوهای شیری، نژادهای گوسفند از نظر اندازه مؤثر جمعیت در وضعیت بهتری به سر می‌برند که این وضعیت بهتر تا حدودی می‌تواند به عدم استفاده از تلقیح مصنوعی و در نتیجه عدم امکان ایجاد اختلاف زیاد در تعداد فرزندان قوچ‌ها مربوط گردد (۶). اندازه مؤثر جمعیت برآورد شده در این تحقیق در محدوده برآوردهای گزارش شده برای برخی نژادهای گوسفند فرانسه و نژاد فینشیپ فنلاند قرار دارد. دانچین برگ و همکاران (۶) اندازه مؤثر جمعیت نژادهای بلودومین، چارومایز، کنتین، رومانو، روسین دلاهاگو و سولوگوت فرانسه را با استفاده از روش مشابه به‌کار رفته در این

پرورش و اصلاح نژاد گوسفند سنگسری دامغان به دلیل در اختیار قرار دادن داده‌های مورد نیاز، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

منابع

1. Bartolomé, E., F. Goyache, A. Molina, I. Cervantes, M. Valera, and J.P. Gutiérrez. 2010. Pedigree estimation of the (sub) population contribution to the total gene diversity: the horse coat colour case. *Animal*, 4:867-870.
2. Berg, P., J. Nielsen, and M. K. Sørensen. 2006. EVA: realized and predicted optimal genetic contributions. Page 13-18 In *Proc. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
3. Cervantes, I., F. Goyache, A. Molina, M. Valera, and J. P. Gutiérrez. 2011. Estimation of effective population size from the rate of coancestry in pedigreed populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128:56-63.
4. Cervantes, I., F. Goyache, A. Molina, M. Valera, and J.P. Gutierrez. 2008. Application of individual increase in inbreeding to estimate realized effective sizes from real pedigrees. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125:301-310.
5. Danchin-Burge, C., S. J. Hiemstra, and H. Blackburn. 2011. Ex situ conservation of Holstein-Friesian cattle: comparing the Dutch, French, and US germplasm collections. *Journal of Dairy Science*, 94:4100-4108.
6. Danchin-Burge, C., I. Palhière, D. François, B. Bibé, G. Leroy, and E. Verrier. 2010. Pedigree analysis of seven small French sheep populations and implications for the management of rare breeds. *Journal of Animal Science*, 88:505-516.
7. Falconer, D.S., and T.F.C. Mackay. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Group Ltd., Edinburgh.
8. FAO. 2007. *The State of World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. United states Food and Agriculture Organization.
9. FAO. 2013. *In vivo conservation of animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 14. Rome.
10. Frankham, R., D. A. Briscoe, J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge.
11. Franklin, I., and R. Frankham. 1988. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, 1:69-70.
12. Groeneveld, E., B. D. Westhuizen, A. Maiwashe, F. Voordewind, and J. B. Ferraz. 2009. POPREP: a generic report for population management. *Genetic and Molecular Research*, 8:1158-1178.
13. Groeneveld, L. F., J. A. Lenstra, H. Eding, M. A. Toro, B. Scherf, D. Pilling, R. Negrini, E. K. Finlay, H. Jianlin, E. Groeneveld, and S. Weigend. 2010. Genetic diversity in farm animals - A review. *Animal Genetics*, 41:6-31.
14. Gutierrez, J. P., I. Cervantes, and F. Goyache. 2009. Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126:327-332.
15. Gutiérrez, J. P., I. Cervantes, A. Molina, M. Valera, and F. Goyache. 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating effective sizes from pedigrees. *Genetic Selection Evolution*, 40:359-378.
16. Gutiérrez, J. P., and F. Goyache. 2005. A note on ENDOG: A computer program for analysing pedigree information. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122:172-176.
17. Koenig, S., and H. Simianer. 2006. Approaches to the management of inbreeding and relationship in the German Holstein dairy cattle population. *Livestock Science*, 103:40-53.
18. Leroy, G., T. Mary-Huard, E. Verrier, S. Danvy, E. Charvolin, and C. Danchin-Burge. 2013. Methods to estimate effective population size using pedigree data: Examples in dog, sheep, cattle and horse. *Genetic Selection Evolution*, 45:1-8.
19. Li, M. H., I. Strandén, and J. Kantanen. 2009. Genetic diversity and pedigree analysis of the Finnsheep breed. *Journal of Animal Science*, 87:1598-1605.
20. MacCluer, J. W., A. J. Boyce, B. Dyke, L. R. Weitkamp, D. W. Pfenning, and C. J. Parsons. 1983. Inbreeding and pedigree structure in Standardbred horses. *Journal of Heredity*, 74:394-399.
21. Maignel, L., D. Boichard, and E. Verrier. 1996. Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. *Interbull Bulletin*, 14:49-54.
22. Meuwissen, T. 1999. Operation of conservation schemes. Pages 91-112 in *Genebanks and the Conservation of Farm Animal Genetic Resources*, Lelystad, Netherlands.
23. Miraei-Ashtiani, S. R., S. A. R. Seyedalian, and M. Moradi Shahrababak. 2007. Variance components and heritabilities for body weight traits in Sangsari sheep, using univariate and multivariate animal models. *Small Ruminant Research*, 73:109-114.
24. Mokhtari, M. S., M. M. Shahrababak, A. K. Esmailzadeh, R. Abdollahi-Arpanahi, and J. P. Gutierrez. 2013. Genetic diversity in Kermani sheep assessed from pedigree analysis. *Small Ruminant Research*, 114:202-205.
25. Nomura, T., T. Honda, and F. Mukai. 2001. Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 79:366-370.

26. Norberg, E., and A. C. Sørensen. 2007. Inbreeding trend and inbreeding depression in the Danish populations of Texel, Shropshire, and Oxford Down. *Journal of Animal Science*, 85:299-304.
27. Pérez-Enciso, M. 1995. Use of the uncertain relationship matrix to compute effective population size. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 112:327-332.
28. Pong-Wong, R., and J. a Woolliams. 2007. Optimisation of contribution of candidate parents to maximise genetic gain and restricting inbreeding using semidefinite programming. *Genetic Selection Evolution*, 39:3-25.
29. Sheikhlou, M., and M. A. Abbasi. 2016. Genetic diversity of Iranian Lori-Bakhtiari sheep assessed by pedigree analysis. *Small Ruminant Research*, 141:99-105.
30. Sørensen, A. C., M. K. Sørensen, and P. Berg. 2005. Inbreeding in Danish dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 88:1865-1872.
31. Stachowicz, K., M. Sargolzaei, F. Miglior, and F. S. Schenkel. 2011. Rates of inbreeding and genetic diversity in Canadian Holstein and Jersey cattle. *Journal of Dairy Science*, 94:5160-75.
32. Taberlet, P., A. Valentini, H. R. Rezaei, S. Naderi, F. Pompanon, R. Negrini, and P. Ajmone-Marsan. 2008. Are cattle , sheep , and goats endangered species ? *Molecular Ecology*, 17:275-284.
33. Tahmoorespur, M., and M. Sheikhlou. 2011. Pedigree analysis of the closed nucleus of Iranian Baluchi sheep. *Small Ruminant Research*, 99:1-6.
34. Weigel, K. A. 2001. Controlling inbreeding in modern breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 84:177-184.
35. Woolliams, J. A., P. Berg, B. S. Dagnachew, and T. H. E. Meuwissen. 2015. Genetic contributions and their optimization. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132:89-99.
36. Wright, S. 1984. *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press, Chicago.



Estimating the Effective Population Size of Sangsari Sheep Using Different Methods Based on Pedigree Analysis

M.R. Sheikhlou^{1*} - E. Abdi Ghezeljeh¹ - R. Safari¹ - Z. Nemati¹

Received: 10-02-2017

Accepted: 24-06-2017

Introduction: The practices that make breeding programs effective in generating genetic gain results the reduction in genetic diversity. The loss of diversity and the resulting increase in homozygosity may result in decreased production and fitness of inbred animals. One of the important parameters in assessing the level of genetic diversity of population is effective population size. Effective population size is a key parameter in population and conservation genetics due to its direct relationship with the rate of inbreeding and the amount of genetic variation lost because of random genetic drift. As a consequence, effective population size is usually considered as a useful criterion for classifying the livestock breeds according to the degree of endangerment. Classically, effective population size can be estimated from the rate of inbreeding between two successive generations. However, in real populations with overlapping generations, the definition of a 'previous' generation is quite difficult to establish and assignment of animals to various generations is not simple. A number of methods are available to estimate the effective population size on the basis of pedigree in livestock populations. However, when it comes to monitoring animal genetic resources not all methods are equally well suited and depending on the conditions in the population under consideration, different methods may have to be chosen. The objective of this study was to estimate effective population size in the breeding flock of sangsari sheep using different methods and to select the best estimates among them according to the pedigree structure.

Material and Methods: In this study the pedigree information of Sangsari sheep collected in 28 years (1988-2015) at breeding station of Damghan were used to estimate effective population size. The quality of available pedigree information is of great importance when interpreting the results of pedigree analysis. Thus, the degree of completeness of pedigree was assessed before analysis. For the whole file, the proportion of animals with both parents known was computed by simple counting. The pedigree completeness index (PCI) was used to describe the degree of completeness of pedigree. In addition, for each individual, the number of equivalent complete generations (EqG) was computed. Effective population size was estimated using the six different methods. The best method was selected considering some criteria such as time period used, subpopulation stratification, stability of estimates and negative estimate for effective population size.

Results and Discussion: The proportion of animals from the whole file with two known parents was 70%. The completeness of pedigree was low in the early years of the foundation of the center, however, pedigree filling improved over time, with the most recent cohort of lambs having pedigree completeness index of 0.61 and equivalent complete generations of 4.1. Accordingly, the pedigree had an acceptable completeness level for estimation of the effective population size. Estimates for effective population size were different according to the methods used for estimation. Estimated effective population size from $N_e - \Delta F_p$ and Ne-Coan resulted negative values for some years in the time period of last generation interval, which is clearly meaningless and leads to the rejection of these estimates. Another criteria for choosing the best method is the variability of estimates that should be as small as possible. Here, we consider the square root of the residual after fitting a linear regression to the yearly Ne estimates that should not be greater than 20. In all methods this criteria was greater than the critical value (20) except for the methods Ne-Cens and Ne-Ecg, and Ne-Ecg has the smaller value between the methods. Considering the necessary criteria, estimates from the method of individual increase in inbreeding (Ne-Ecg) were chosen as the best estimates for effective population size in this pedigree. Average estimated effective population size using this method was 131 animals.

Conclusion: Estimated realized effective population size was greater than the critical levels reported by FAO (50) and Meuwissen (100). Also, the estimated effective population size in this study was in the range of

1- Assistant professor, Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Iran.

(*- Corresponding author email: mr.sheikhlou@gmail.com)

estimates for some foreign and Iranian sheep breeds. Considering the closed nucleus with no entry of animals from other herds, implementation of methods for preventing the losses of effective population size in the future such as optimum contribution of parents is suggested.

Keywords: Effective population size, Inbreeding, Pedigree analysis, Sangsari sheep



مطالعه شبکه ژنی آنژیونز در جوجه‌های مرغ آرین حساس به آسیت با استفاده از داده‌های RNA-Seq

وحید تقی زاده^۱ - محمدرضا نصیری^{۲*} - مجتبی طهمورث پور^۳ - محمدرضا بختیاری زاده^۴ - علی جوادمنش^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۱۶

چکیده

سندروم آسیت یک عارضه متابولیکی است که در سنین بالا در پرندگان گوشتی بروز می‌کند و به سویه تجاری آرین که تنها لاین اصلاح شده مرغ گوشتی ایران می‌باشد آسیب جدی وارد کرده است. مطالعات گذشته نقش عوامل ژنتیکی در بروز این سندروم را اثبات کرده است. از آنجا که ارگان‌های متعددی در بروز آسیت دخالت دارند و نقش قلب در آنها از همه بارزتر است، از مطالعات ژنومی استفاده شد تا ژن‌های مرتبط با مسیر آنژیونز در هاپروتروپی بطن راست قلب شناسایی شوند. در این تحقیق تعداد ۴۶۴ پرنده از خط پدری B لاین آرین تحت تنش سرمایی پرورش داده شد و در بررسی آنالیز داده‌های RNA-seq بین دو گروه سالم و مبتلا به آسیت، پروفایل بیان ژن‌ها در بطن راست قلب مرغان حساس و مقاوم به آسیت با استفاده از تکنولوژی توالی‌یابی نسل آینده مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی ترنسکریپتومی ژنهای مسیر آنژیونز نشان داد که تعداد ۵۹ ژن بین دو تیمار سالم و آسیتی تفاوت بیان معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$) که از این تعداد ۲۹ ژن افزایش بیان و ۳۰ ژن کاهش بیان نشان دادند. بر اساس نتایج هستی‌شناسی ژنی، بیشترین معنی‌داری در پروسه‌های بیولوژیکی به مسیرهای برهم‌کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای (ECM-receptors)، تقسیم سلولی میتوز، پارتیشن بندی کروموزومی، چرخه سلولی و اینترلوکین‌ها تعلق داشتند. بر اساس نتایج آنالیز شبکه از ژن‌های افزایش بیان یافته در بیماری آسیت، سه خوشه ژنی تشکیل شد که ژن‌هایی از قبیل *CDK1*، *COL6A2* و *IL7R* به‌عنوان مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با آنژیونز معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: آسیت، آنالیز مسیر، آنژیونز، شبکه ژنی، هستی‌شناسی ژن، RNA-Seq

مقدمه

هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان‌شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (۲۸). بر اساس تحقیقات West and Zhou استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (Tepe Yahya) (جنوب شرقی ایران) به‌ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد (۲۸). از طرفی ایران یکی از معدود کشورهای دارای لاین اصلاح‌شده مرغ گوشتی است که به نام آرین معروف است. این لاین در سال‌های اخیر به دلیل مشکلات متعدد نتوانست در جلب رضایت پرورش‌دهنده‌ها موفق باشد و در حال حاضر سهم بازار جوجه یک‌روزه گوشتی را تقریباً به‌طور کامل از دست داده است. علاوه بر عملکرد نسبتاً ضعیف تولیدی این سویه در مقایسه با سویه‌های رایج وارداتی عمده‌ترین مشکل آن میزان مرگ و میر بالا به علت بروز آسیت (به‌ویژه در نواحی مرتفع) است. میزان بروز آسیت در این سویه به ۱۰ درصد (۲) می‌رسد، در

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریباً قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریا‌های سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راه‌ها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و

۱- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، پردیس واحد بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ابوریحان

۵- استادیار گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(Email: nassiryr@gmail.com)

(*) - نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.65215

می‌باشد (۷). در پاسخ به افزایش نیاز به اکسیژن، سیستم عصبی مرکزی قلب را تحریک به فعالیت بیشتر می‌کند (۲۰) و بطن راست خون بیشتری به سمت ریه‌ها پمپ می‌کند (۱۹). در واکنش به افزایش فعالیت بطن راست قلب، توده عضلانی بطن راست بزرگ شده (هایپرتروفی) و این تغییر موجب ضعف کارکرد دریچه بین دهلیز و بطن راست می‌شود (۳۵) لذا هنگام انقباض بطن راست جهت ارسال خون به سرخرگ‌های ریوی این دریچه‌ها به خوبی بسته نمی‌شوند و مقداری خون از طریق بطن و دهلیز راست به بزرگ سیاهرگ خلفی پس زده می‌شود و سبب بالا رفتن فشار خون در سیاهرگ‌های کبد می‌شود. همین عامل منجر به آسیب سلول‌های کبدی و سپس آب‌آوردگی کبد و تجمع مایعات در حفره شکمی می‌گردد (۱۵). همراه با اصلاح ژنتیکی، که به عنوان هدف بلندمدت پیشگیری از بروز سندرم آسیت مدنظر است (۱۳)، کنترل و مدیریت عوامل محیطی زمینه‌ساز سندرم آسیت از جمله دمای محیط، سطح انرژی خوراک، فرم فیزیکی‌دان، محدودیت غذایی، کنترل آمونیاک و سلامت دستگاه تنفس بسیار مؤثر خواهد بود.

اصلاح نژاد علیه این سندرم با روش‌های سنتی بسیار هزینه‌بر خواهد بود. خوشبختانه به دلیل پیشرفت‌های بسیار زیاد در حوزه ژنتیک مولکولی و توسعه تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل آینده در حال حاضر تحقیقات گسترده بر روی صفاتی نظیر سندرم آسیت، که یک صفت کاملاً اقتصادی است، در سطح نوکلئوتید نیز فراهم شده است (۱۷). مهم‌ترین مطالعات نقشه‌یابی کیو.تی.آل^۲، ارتباط‌سنجی کل ژنوم^۳ و توالی‌یابی نواحی ژنومی کاندید مؤثر بر آسیت و معرفی ژن‌های بسیار مؤثر بر حساسیت به آن در عصر ژنتیک مولکولی انجام شده است (۸، ۲۳، ۳۸ و ۴۰). همچنین در حوزه ژنتیک و اصلاح نژاد، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی به برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی کند. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (۱). به علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (۳۱) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (۱۸). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (۲۹). حفاظت باید بر اساس

حالی که مرگ‌ومیر به دلیل آسیت در سویه‌های تجاری دیگر کمتر از ۸ درصد کل مرگ‌ومیر را شامل می‌شود (۱۲ و ۴۱). بروز آسیت در خط پدری (B) لاین آرین به دلیل سرعت رشد بیشتر، شایع‌تر است. به نظر می‌رسد که نقص ژنتیکی لاین آرین و عدم اصلاح ژنتیکی آن نسبت به صفات مرتبط با زنده‌مانی در گذشته، عامل اصلی بالا بودن سندرم آسیت در آن باشد.

سندرم فشار خون ریوی^۱ یا همان آسیت یک بیماری در طیور گوشتی است که ابتدا با بالا رفتن فشار خون عروق ریوی آغاز شده و در نهایت منجر به آسیت و مرگ و میر در پرندگان حساس می‌شود (۳). سالیان دراز آسیت به عنوان یک عامل بیماری و مرگ و میر جوجه‌های گوشتی در مناطق با ارتفاع بالا (بالای ۳۵۰۰ متر) شناخته می‌شد اما امروزه در نواحی کم ارتفاع هم مشاهده می‌شود (۲۵). ایجاد آسیت در جوجه‌های گوشتی عمدتاً مربوط به عدم تناسبی است که بین سیستم قلبی-عروقی و تنفسی با اندازه کل بدن آن‌ها، در نتیجه پیشرفت‌های اصلاح نژادی برای افزایش نرخ رشد و وزن بدن، به وجود آمده است (۲۱، ۴۲ و ۵۳). در جوجه‌های گوشتی مبتلا به آسیت، علائم بالینی شامل کسالت، ژولیدگی پرها، عدم تحرک، سیانوز پوست سر و بدن به ویژه قبل از مرگ، چروکیده شدن تاج و ریش، قرمز یا تیره شدن پوست و بافت‌ها و تجمع مایع سروزی زرد روشن در حفره شکمی می‌باشند و علائم کالبد گشایی شامل هایپرتروفی قلب، اتساع بطن راست، نقص دریچه دهلیزی بطنی، شل‌شدگی قلب و اتساع مدخل سیاهرگ به دهلیز، به خصوص بزرگ سیاهرگ خلفی و تحلیل دیواره بطن چپ که احتمالاً به دلیل عدم دسترسی کافی به اکسیژن در سلول‌های عضلانی بطن چپ است. مایع پریکاردیال به مقدار زیاد در اطراف قلب دیده می‌شود و ممکن است بی‌رنگ یا سروزی باشد. ریه‌های پرندگان آسیتی اغلب خاکستری رنگ یا زرد کمرنگ می‌باشند (۱۷).

امروزه عارضه آسیت یکی از مشکلات جدی صنعت طیور گوشتی محسوب می‌شود (۲۵) خسارات اقتصادی ناشی از آسیت در ایالات متحده آمریکا به تنهایی بالغ بر یکصد میلیون دلار در سال می‌باشد که شامل خسارات ناشی از تلفات در طی دوره رشد، انتقال به کشتارگاه و حذف لاشه در کشتارگاه می‌باشد (۳۳). این سندرم با علائم تجمع آب میان بافتی در پری کاردیوم، فیبروز شدن اپی کارد، ادم ریه‌ها، هایپرتروفی و شل‌شدگی عضله قلب به ویژه بطن راست، کاهش غلظت اکسیژن خون و افزایش هماتوکریت همراه است (۴، ۱۰، ۲۴، ۳۴، ۳۶ و ۴۸).

با اینکه در بروز آسیت عوامل متعددی دخالت دارند ولی آسیت عارضه‌ایی است که اساس آن بر پایه حجم محدود ژنتیکی ریه‌ها همراه با افزایش نیاز به اکسیژن مصرفی به دلیل متابولیسم پایه بالا

2- Quantitative Trait Loci (QTL)

3- GWAS

1- Pulmonary Hypertension Syndrome (PHS)

کل از طریق کیت A-bioZOLTM ساخت شرکت^۱ bioWorld و رعایت پروتکل‌های آن البته با اندکی تغییرات جهت دستیابی به کیفیت بالایی RNA انجام شد.

توالی‌یابی نمونه‌ها با استفاده از فن‌آوری ایلومینا توسط شرکت BGI هنگ کنگ انجام شد. نمونه‌های RNA ارسالی دارای معیار خردشدگی RNA (RIN) بالاتر از ۷ بودند. در مراحل بعدی که توسط شرکت انجام‌دهنده توالی‌یابی انجام شد با استفاده از Oligo dT beads همه RNA کوچکتر از قبیل RNAهای ریبوزومی، tRNA و غیره حذف شدند و سپس mRNAها توسط کیت‌های خاصی شکسته شده و به قطعات کوتاه‌تری تبدیل شدند. بعد از استفاده از پرایمرهای هگزامری، از روی قطعات شکسته شده cDNA تهیه شده و cDNAهای با طول مشخص ۲۰۰ باز انتخاب شدند و انتهای قطعات cDNA ترمیم و باز آدنین به آنها اضافه شد و بعد از آن آداپتور به آنها افزوده شد و در نهایت توسط دستگاه Illumina Hiseq 2000 مورد توالی‌یابی قرار گرفتند.

برای کنترل کیفی داده‌ها از نرم‌افزار FastQC (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) و Trimmomatic استفاده شد و برای نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم از نرم‌افزار Tophat^۲ (۴۹) (<http://tophat.cbc.umd.edu>) استفاده شد. از مجموعه نرم‌افزارهای Cuffdiff و Cuffmerge (۵۰)، Cuffdiff (۵۱) برای نرم‌افزارهای Cufflinks (۵۰)، Cuffdiff و Cuffmerge (۵۱) برای سرهم‌سازی^۳ خوانش‌ها، تهیه ایندکس و آنالیز بیانی متمایز^۳ استفاده شد و خروجی داده‌های Cuffdiff جهت بررسی هستی‌شناسی ژنتیکی (GO) به نرم‌افزار DAVID 6.8 (<http://david-d.ncicrf.gov>) معرفی شد تا ژن‌هایی که به‌طور معنی‌دار در مسیر آنژیوزن شبکه‌های ژنتیکی پایگاه داده KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) شناسایی شدند برای ترسیم شبکه ژنی استفاده شود. برای رسم شبکه ژنی از نرم‌افزار String Ver 10.5 (<http://string-db.org>) استفاده شد (۴۷).

برای تحلیل شبکه و تهیه خوشه‌های (Clusters) معنی‌دار و نمایش خصوصیات شبکه از Cytoscape (<http://Cytoscape.org>) نسخه 3.5.1 استفاده شد. شبکه‌های ژنی برهم‌کنش پروتئینی و خوشه‌ها و زیرخوشه‌ها همگی براساس ژن‌های دارای افزایش بیان (UP-Regulated) ترسیم شدند. در تصاویر شبکه‌ها و خوشه‌های ترسیم شده در Cytoscape میزان تفاوت بیان ژن بر حسب foldchange به‌صورت اندازه گره و میزان رنگ مشخص شده است به‌طوری‌که هر اندازه که بیان ژن بیشتر باشد اندازه گره بزرگتر و رنگ

دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۴۶ و ۵۵).

پیچیدگی سندرم آسیت و تعداد بالای ارگان‌های درگیر در بیماری که به‌تبع آن تعداد ژن‌های مداخله‌کننده در بروز این سندرم را نیز افزایش می‌دهد دلایلی است که مطالعه اخیر را به سمت Whole-Genome سوق داده است. از جهت دیگر در پیدایش آبشارگونه آسیت، هایپرتروفی عضله قلب نقش به‌سزایی در تشدید علایم ثانویه و پیشرفت روند بیماری دارد و از آنجایی‌که هایپرتروفی یک بافت مستلزم خون‌رسانی و فراهم کردن نیازهای سلولی است و برای تأمین این امکانات، بافت رشدکرده نیاز به توسعه‌ی عروق خونی (آنژیوزن) دارد اگرچه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (۲۶، ۲۷، ۳۰ و ۵۶)، اما تاکنون شبکه ژنی آنژیوزن در جوجه‌های مرغ آرین مورد مطالعه قرار نگرفته است لذا، به همین منظور مسیر بیولوژیکی آنژیوزن از دیدگاه ژنتیکی در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت با این هدف که پس از شناسایی شبکه‌های ژنی معنی‌دار و تعیین زیرخوشه‌های معنی‌دار در شبکه ژنی به تعدادی ژن کلیدی کنترل‌کننده هایپرتروفی قلب دست یابیم تا از این طریق مسیر پژوهش‌های آینده برای برنامه‌های اصلاحی برای مقابله با این سندرم در جوجه‌های گوشتی هموارتر شود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۶۴ قطعه جوجه یک‌روزه از خط B لاین آرین در یک سالن پرورشی تا ۲۱ روزگی در شرایط استاندارد (نور، دما، تغذیه و سایر عوامل یکسان) نگهداری شدند. سپس در ۲۱ روزگی جوجه‌ها به بخش سرد سالن که با پرده پلاستیکی جدا شده بود منتقل شدند. برای تشدید آسیت در جوجه‌های سالن سرد دمای این بخش در طول روز ۱۵ تا ۱۸ و در طول شب ۸ تا ۹ درجه نگه داشته شد.

بعد از اعمال تنش سرمایی، پرندگانی که علائم آسیت را نشان دادند در دسته آسیتی و سایر پرنده‌ها در دسته سالم طبقه‌بندی شدند. در روزهای ۳۹ و ۴۲ نمونه‌های بافت بطن راست قلب ۲۴ پرنده به‌صورت جداگانه بر اساس روش استاندارد انجام شد (۱۲) پرنده آسیتی و ۱۲ پرنده سالم) جهت مطالعه ترنسکرپتوم برداشت و سریعاً به تانک ازت انتقال داده شد تا برای استخراج RNA کل از آنها استفاده شود.

در استخراج RNA کل از بافت قلب مقدار مساوی از RNA شش پرنده در یک نمونه ادغام شد. بدین ترتیب ۴ نمونه که دوتا از آنها سالم و دوتای دیگر آسیتی بودند ایجاد شد. استخراج RNA

1- Bioworld, is a division of GeneLinx International, Inc., USA

2- Assembly

3- Differential Expression Analysis

نتایج و بحث

به طور خلاصه داده‌های حاصل از توالی‌یابی در جدول ۱ نمایش داده شده است.

آن پر رنگ‌تر است. ارتباط بیانی دو ژن یا میزان هم بیانی به صورت ضخامت خطوط بین گره‌ها نمایش داده می‌شود و هر اندازه که بیانی دو ژن با هم ارتباط بیشتری داشته باشند ضخامت خط بین دو ژن ضخیم‌تر نشان داده شد.

جدول ۱- اطلاعات آماری داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل آینده

Table 1- Summary of reads from high throughput next generation sequencing

نمونه [§]	تعداد خوانش	تعداد باز	طول خوانش (باز)	درصد Q20 ^{&}	درصد GC
Sample	Number of reads	Number of Bases	Length of read	Percent of Q20	Percent of GC
He-1-A	50,779,234	5,077,923,400	100	98.22	49.73
He-1-B	50,760,774	5,076,077,400	100	98.22	50.14
As-1-A	50,734,940	5,073,494,000	100	98.24	49.80
As-2-A	50,729,876	5,072,987,600	100	98.25	49.86

[§] نمونه‌های با پیشوند He مربوط به تیمار سالم و نمونه‌های با پیشوند As مربوط به تیمار آسیتی بودند.

[&] درصد Q20 بیانگر نسبتی از خوانش‌هایی است که میانگین کیفیت بازهای آن‌ها بالاتر از ۲۰ (بر مبنای فرد) می‌باشد.

[§] Samples with prefix of “He” assigned to Healthy and with “As” assigned to Ascites

[&] Percent of Q20 shows the quality of reads greater than 20 (based on Phred score)

جدول ۲- اطلاعات آماری خوانش‌های نقشه‌یابی شده بر روی ژنوم مرجع

Table 2- Summary of reads from high throughput next generation sequencing

نمونه [§]	As-1	As-2	He-1	He-2
Sample [§]				
تعداد کل خوانش‌ها (جفت)	24,992,539	25,061,262	25,085,727	25,070,763
Total reads (paired)				
تعداد خوانش‌های اول الاین شده (درصد)	22,465,894(89.9)	22,708,993(90.6)	22,677,628(90.4)	22,560,174(90)
First reads aligned (%)				
تعداد خوانش‌های دوم الاین شده (درصد)	22,426,986(89.7)	22,666,399(90.4)	22,636,232(90.2)	22,521,535(89.8)
Second reads aligned (%)				
تعداد جفت خوانش‌های الاین شده (درصد)	21,852,775(87.4)	22,083,944(88.1)	22,048,640(87.9)	21,937,325(87.6)
Paired reads aligned (%)				

[§] نمونه‌های با پیشوند As مربوط به تیمار آسیتی و نمونه‌های با پیشوند He مربوط به تیمار سالم می‌باشند.

[§] Samples with prefix of “He” assigned to Healthy and with “As” assigned to Ascites

KEGG (DEGs) نشان دادند (FDR<20%) ۵۹ ژن در پایگاه داده KEGG در ارتباط با آنژیوژنز شناسایی شدند که ۲۹ ژن افزایش بیان و ۳۰ ژن کاهش بیان نشان داده شد.

هستی‌شناسی (GO) ۵۹ ژن در نرم‌افزار DAVID 6.8 نشان می‌دهد که سه ژن ^۳LAMB1، ^۴IFIH1 و ^۵ACSL1 به ترتیب در فرآیندهای تقسیم سلولی و پارتیشن‌بندی کروموزوم، همانندسازی و نوترکیبی و بازسازی DNA و متابولیسم چربی نقش دارند و در این میان ژن LAMB1 بیشترین افزایش بیان را در گروه آسیتی در مقابل گروه سالم نشان داد.

حدود ۹۰ درصد از خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع نقشه‌یابی شده‌اند نکته قابل توجه این است که بسیاری از این خوانش‌ها به طور صحیح و در فاصله معقولی نسبت به جفت خود بر روی ژنوم الاین شده‌اند^۱. بنابراین می‌توان استنتاج کرد که کیفیت خوانش‌ها بسیار مطلوب بوده و با حداقل خطا^۲ توالی‌یابی شده‌اند. در تیمار آسیتی از بین ۱۲۵ لوکوس با بیان متفاوت، سطح بیان تعداد ۷۹ ژن افزایش و سطح بیان تعداد ۴۶ لوکوس دیگر کاهش نشان داد. در مطالعات شای و همکاران (۲۰۱۴) نیز تعداد ژن‌های بیش‌بیان در پرندگان آسیتی نسبت به پرندگان سالم بیشتر از ژن‌های کم‌بیان گزارش شده است (۴۴). از ۱۲۵ ژن که به طور معنی‌داری در آنالیز Cuffdiff تفاوت بیان

3- Laminin subunit beta 1

4- Interferon induced with helicase C domain 1

5- Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1

1- Concordant pair alignment

2- Mismatch

جدول ۳- مسیرهای بیولوژیکی معنی‌دار در پایگاه داده KEGG (FDR<20%)

Table 3- Significant terms of biological process in KEGG pathway for angiogenesis (FDR<20%)

دسته	نام مسیر بیولوژیکی	تعداد	%	P-Value	FDR
Category	Term	Count			
KEGG_PATHWAY	gga04512:ECM-receptor interaction	9	15.25424	4.15E-06	0.004333
KEGG_PATHWAY	gga03320:PPAR signaling pathway	6	10.16949	0.001019	1.058334
KEGG_PATHWAY	gga04920:Adipocytokine signaling pathway	6	10.16949	0.001475	1.528821
KEGG_PATHWAY	gga04110:Cell cycle	7	11.86441	0.003158	3.247776
KEGG_PATHWAY	gga04510:Focal adhesion	8	13.55932	0.010421	10.35808

دیگر متصل بود و ضریب غیر یکنواختی شبکه (Network Heterogeneity) حدود ۰/۹ بود. در تصویر شبکه ژنی شکل ۶ میزان تفاوت بیان ژن به صورت اندازه رنگ نشان داده شده است به طوری که هرچه اندازه گره بزرگتر و رنگ آن پر رنگ تر باشد آن ژن تفاوت بیان بیشتری دارد. ارتباط بیانی دو ژن با میزان هم بیانی نیز به صورت ضخامت خطوط مابین گره‌ها نمایش داده می‌شود.

ژو و همکاران (۲۰۱۲) برای حاشیه نویسی مجدد ژنوم مرغ از داده‌های RNA-Seq بافت‌های شش و مجاری هوا استفاده کردند و تعداد ۲۷۳۷ ژن جدید پیدا کردند که در منابع پژوهشی گذشته گزارش نشده بودند (۵۸). کوبل و همکاران (۲۰۱۴) نیز داده‌های RNA-Seq ترنسکریپتوم کبد مرغان تحت تنش گرمایی و عادی را مورد مقایسه و آنالیز قرار دادند و تعداد ۴۰ ژن با بیان متفاوت (۲۷ ژن با بیان بیشتر و ۱۳ ژن با بیان کمتر را در پرندگان تحت تنش گرمایی نسبت به پرندگان تحت تیمار نرمال) مشاهده کردند (۹). ینگ و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از داده‌های RNA-Seq استخراج شده از بافت عروق ششی مرغان گوشتی مبتلا به آسیت و سالم ۸۹۵ ژن با تفاوت بیان معنی‌دار در ۴ مسیر بیولوژیکی در پایگاه داده KEGG^۷ مرتبط با آنژیوژنز را شناسایی کردند (۵۴). مطالعه مشابهی توسط شی و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد که در آن از داده‌های RNA-Seq استخراج شده از بافت کبد مرغان مبتلا به آسیت در مقایسه با پرندگان سالم استفاده شد و در آن نتایج متابولومیک با ترنسکریپتومیک با همدیگر مقایسه شدند (۴۵).

ژائو و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که در ناحیه یک QTL معنی‌دار بر روی کروموزوم ۸ گمان می‌رود ژنی تحت عنوان TNNI3K^۸ که فعالیت کیناز اختصاصاً در بافت قلب را به عهده دارد و نقش مهمی در سیستم عروق قلبی بیان بالاتری داشته است (۵۷). ولی مطالعه اخیر نشان داد که ژن TNNI3K بین دو گروه سالم و آسیتی تفاوت بیان معنی‌داری نداشتند. بیان ژن کدکننده عامل وادارکننده هیپوکسی (HIF1) که در رگ‌زایی (Angiogenesis)، تغییر

همچنین بررسی مسیرهای بیولوژیکی در DAVID نشان داد که اغلب مسیرهای بیولوژیکی با فرآیندهای مربوط به کنترل گیرنده‌ها و فرآیندهای تقسیم سلولی و کنترل آن در ارتباط هستند (جدول ۳). از بین چندین مسیر بیولوژیکی معنی‌دار یک مسیر بیولوژیکی تحت عنوان gga04512:ECM-receptor interaction با ۹ ژن به نام‌های CD36^۱، AGRN^۲، COL2A1^۳، COL5A1، COL6A2، COL6A3، LAMB4، SDC1^۴ و VTN^۵ نقش مهمی در برهم‌کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای دارند که این عامل نقش بسیار کلیدی در فرآیند آنژیوژنز دارد. در میان این ۹ ژن LAMB4 بیشترین تفاوت بیان (fold change= 1.54) و CD36 کمترین تفاوت بیان (fold change= -0.86) را در مقایسه پرنده‌های آسیتی با سالم نشان داد. در شکل ۱ مسیر بیولوژیکی مربوط به برهم‌کنش گیرنده‌های برون‌یاخته‌ای (ECM-receptor interaction) در پایگاه داده KEGG نشان داده شد که علامت ستاره (★) در شکل ۱ ژن‌هایی را نشان می‌دهد که در این پژوهش دارای تفاوت بیان معنی‌دار بوده و در مسیر بیولوژیکی پایگاه داده KEGG شناسایی شدند (شکل ۱).

جهت ترسیم شبکه برهم‌کنش پروتئینی ۵۹ ژن مسیر آنژیوژنز که در پایگاه داده KEGG شناسایی شدند از نرم‌افزار String (http://string-db.org) استفاده شد که ۴۹ گره از ۵۹ گره در یک شبکه ژنی به نمایش درآمد (شکل ۲). در این شبکه گره‌های کوچک پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که هنوز ساختار سه بعدی آنها به طور کامل مشخص نشده و گره‌های بزرگ پروتئین‌هایی هستند که ساختار سه بعدی آنها تعیین شده است.

سپس شبکه ژنی جهت تجزیه و تحلیل بیشتر شبکه در نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.5.1 فراخوان شد و پارامترهای شبکه به صورت جدول ۴ به نمایش درآمد. به طور میانگین هر گره به حدود ۴ گره

- 1- platelet glycoprotein 4
- 2- AGRIN
- 3- Collagen type II alpha 1 chain
- 4- Syndecan 1
- 5- Vitronectin

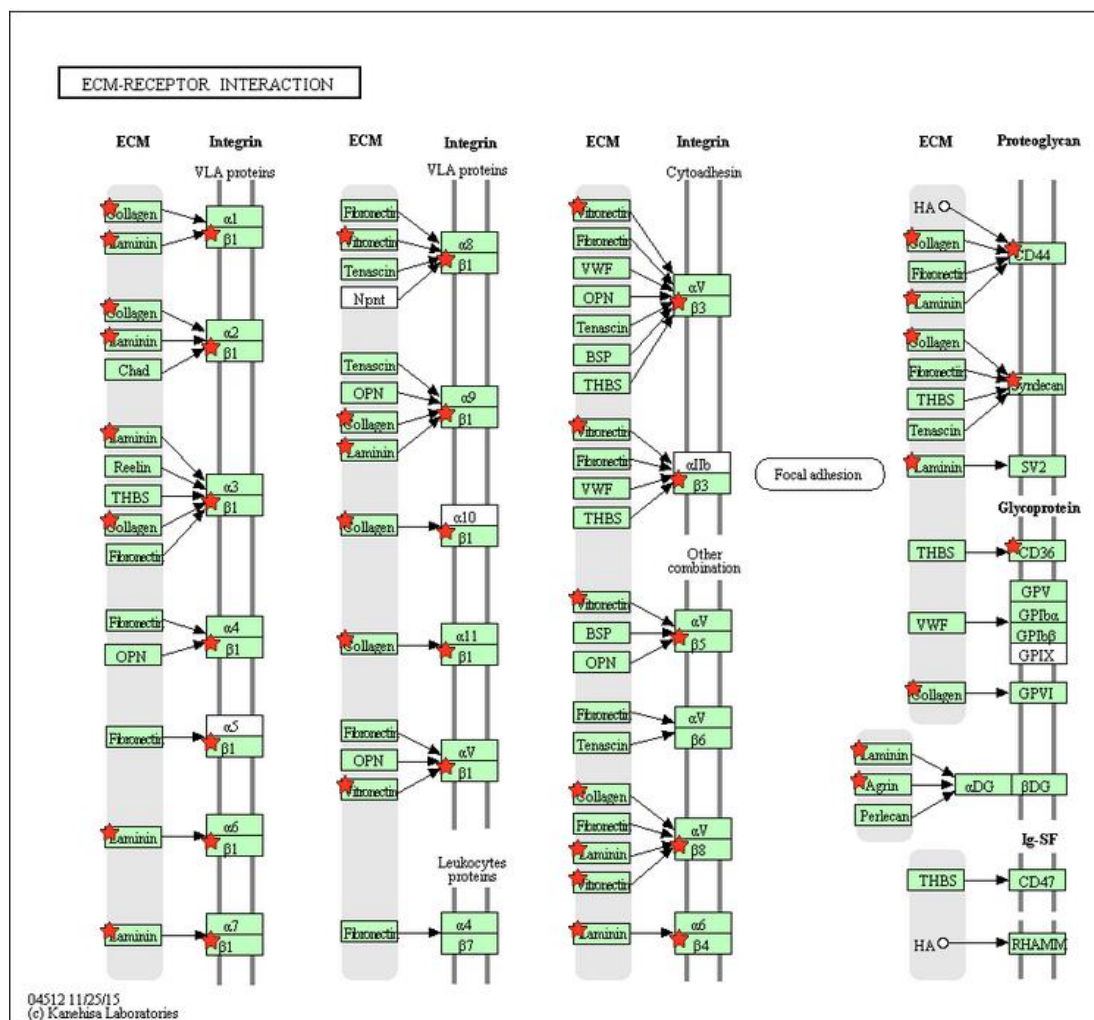
6- Reannotation

7- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

8- Serine/threonine-protein kinase

کلاژن و ایترولوکین ۷ تفاوت بیان معنی‌داری داشتند که هر سه گروه در پیدایش آنژیوژنز و توسعه آن دخالت دارند. بررسی خوشه‌بندی شبکه نشان داد که از بین ۵ خوشه ۳ تای آن معنی‌دار هستند ($P < 0.05$) که شکل خوشه‌بندی به‌همراه ژن‌های هر خوشه در شکل‌های زیر نمایش داده شد.

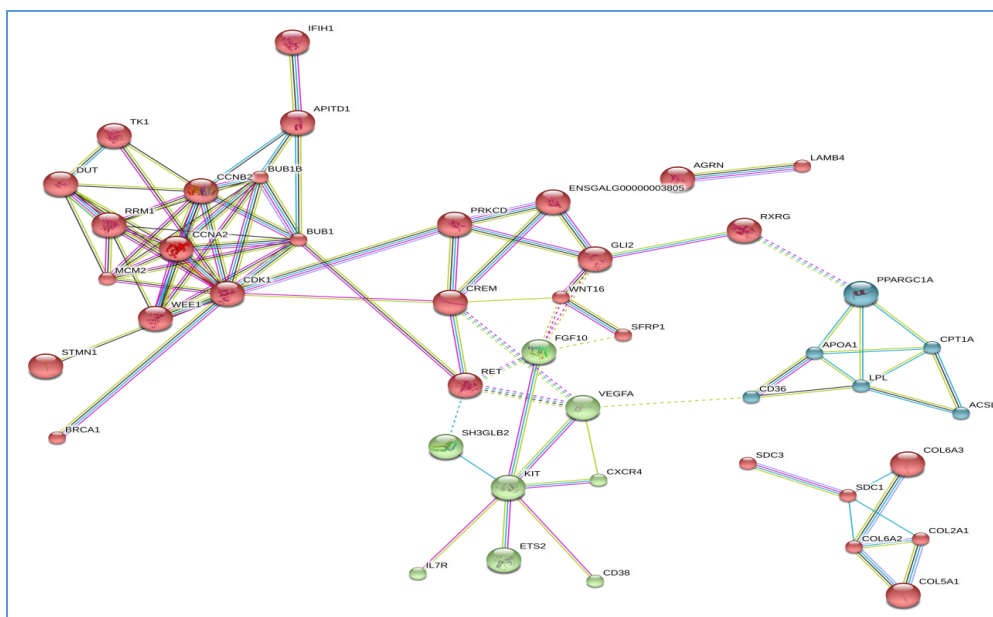
الگوی رگ‌زایی (Vasculature remodeling) و نرخ رشد رگ‌زایی (Vascular tone) در بافت‌های ریه و قلب پرندگان آسیتی به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۵۷) در این مطالعه افزایش بیان قابل توجهی در بافت قلب نشان نداده است ($P > 0.05$). ولی ژن‌های مسیر بیولوژیک، گیرنده‌های برون، باخته‌ای، تقسیم سلول، تولید



شکل ۱- مسیر بیولوژیکی برهم‌کنش گیرنده‌های برون‌باخته‌ای (ECM-receptor interaction) در پایگاه داده KEGG علامت‌ستاره (★) در شکل ژن‌هایی را نشان می‌دهد که در این پژوهش دارای تفاوت بیان معنی‌دار بوده و در مسیر بیولوژیکی پایگاه داده KEGG شناسایی شدند. بیشتر ژن‌ها مربوط به لیگاندهایی از نوع کلاژن و لامینین بودند که با اینتگرین‌ها (Integrin) در ارتباط بودند.

Figure 1- ECM- receptor interaction in KEGG pathway. Star marks (★) show significant DEGs in this study involving ECM-receptor interaction. Most of DEGs related to types of collagen and laminin ligands involving to integrin

۱- اینتگرین‌ها، پروتئین‌های سطح سلولی هستند که در اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. اینتگرین‌ها همچنین به عنوان گیرنده‌هایی عمل می‌کنند که می‌توانند باعث فرستاده شدن پیام‌ها به درون سلول‌ها بشوند و موجب تنظیم ریخت سلول، مهاجرت سلول و همچنین جرحه سلول شوند.



شکل ۲- شبکه برهم‌کنش پروتئین- پروتئین ژن‌های مسیر آنژیوژنز Gallus Gallus به‌همراه نمایش خوشه‌های (Clustering) تحت شبکه در پرند‌های حساس به آسیت در خط B لاین آراین (p-value: 1.27e-14). گره‌های هم‌رنگ مرتبط به یک خوشه هستند و گره‌های بزرگ‌تر پروتئین‌هایی هستند که ساختار سه‌بعدی آنها شناسایی شد و گره‌های کوچک پروتئین‌هایی را نشان می‌دهد که ساختار سه‌بعدی آنها هنوز شناسایی نشده است.

Figure 2– Protein- Protein interaction Network in angiogenesis showing clusters in ascites susceptible of B-line pedigree Iranian meat type strain, Arian. Same node color shows the same cluster. large nodes: some 3D structure is known or predicted and small nodes: protein of unknown 3D structure

جدول ۴- آنالیز شبکه ژنی ژن‌های مسیر آنژیوژنز در پرند‌های حساس به آسیت خط B لاین آراین

Table 4- Network analysis in angiogenesis in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

6	قطر شبکه Network Diameter	59	تعداد گره Number of Nodes
0.236	مرکزیت شبکه Network Centralization	0.065	تراکم شبکه Network Dencity
3.763	متوسط تعداد مجاور Avg. number of neighbors	0.911	غیر یکنواختی شبکه Network Heterogeneity
0.357	ضریب خوشه‌بندی Clustering coefficient	6	تعداد گره‌های جدا شده Isolated Nodes
		0	تعداد خود حلقه Number of self-loops

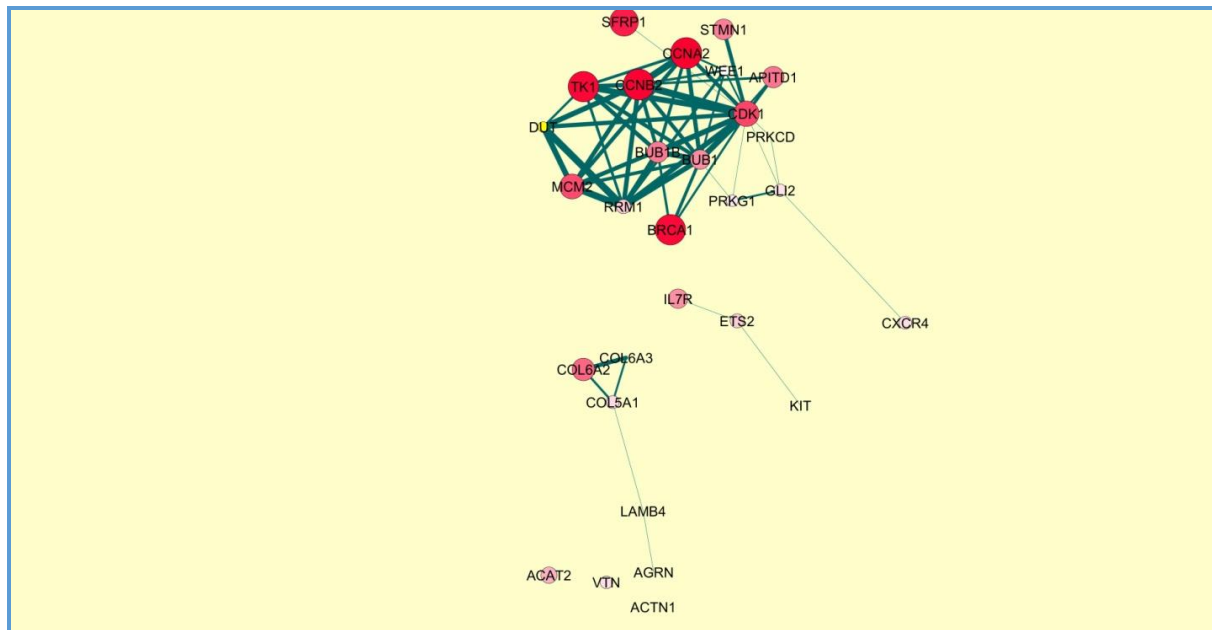
CDK1, DUT^۵, CCNA2, CCNB2, RRM1^۶, BUB1^۷, APITD1^۸, BUB1B^۹, BRCA1^{۱۰}, TK1^{۱۱}, WEE1^{۱۲}, PRKG1^{۱۳} است که از بین آنها

ژن CDK1 یکی از مهمترین عوامل تقسیم سلولی است (۱۱) و (۳۲) که به همراه ژن‌های CCNB1^۱ و CCNB2^۲ می‌تواند تبدیل به عامل فعال‌کننده MPF^۳ تبدیل شود که این عامل می‌تواند سلول را وادار به تقسیم میتوز کند (۱۴). تفاوت بیان معنی‌دار ($P < 0.05$) این ژن‌ها در بافت قلب پرندگان حساس به آسیت می‌تواند دلیل هایپرتروفی عضله باشد. این خوشه ژنی شامل ۱۳ ژن، MCM2^۴

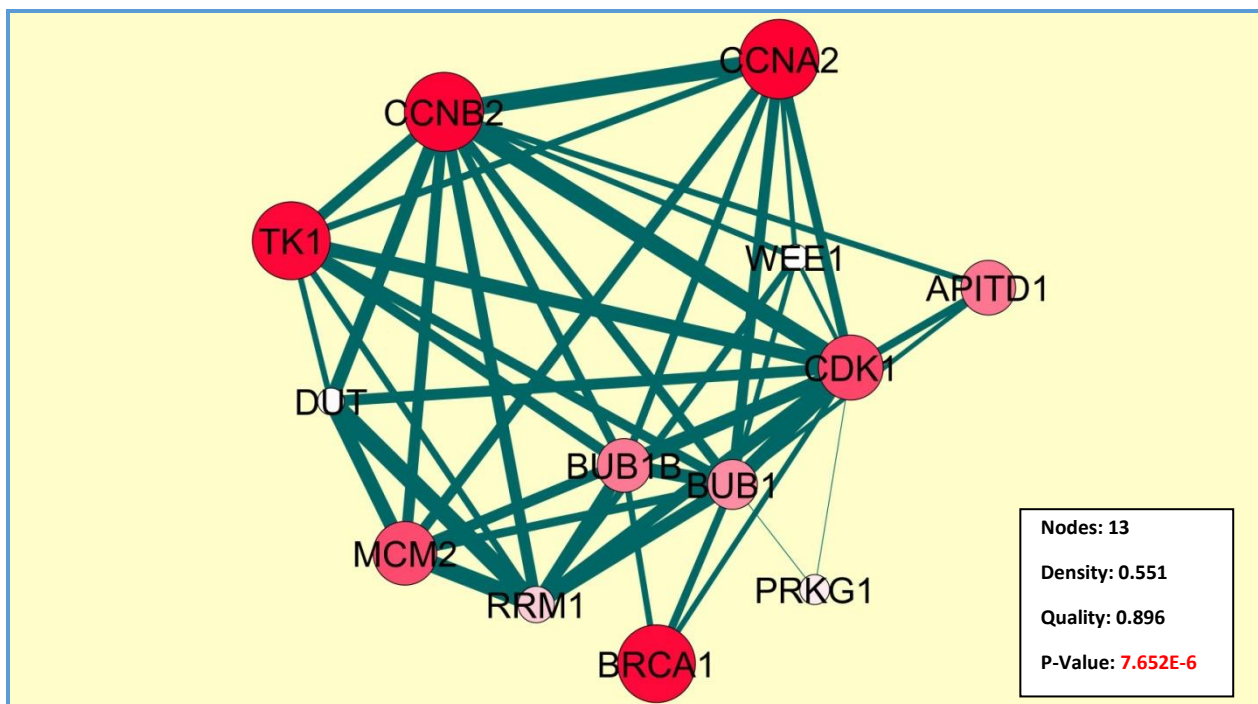
- 5- Deoxyuridine triphosphatase
- 6- Ribonucleotide reductase catalytic subunit M1
- 7- BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase
- 8- Centromere protein S
- 9- BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B
- 10- BRCA1, DNA repair associated
- 11- Thymidine kinase 1
- 12- WEE1 G2 checkpoint kinase
- 13- Protein kinase, cGMP-dependent, type I

- 1- Cyclin B1
- 2- Cyclin B2
- 3- Maturation Promoting factor
- 4- Minichromosome maintenance complex component 2

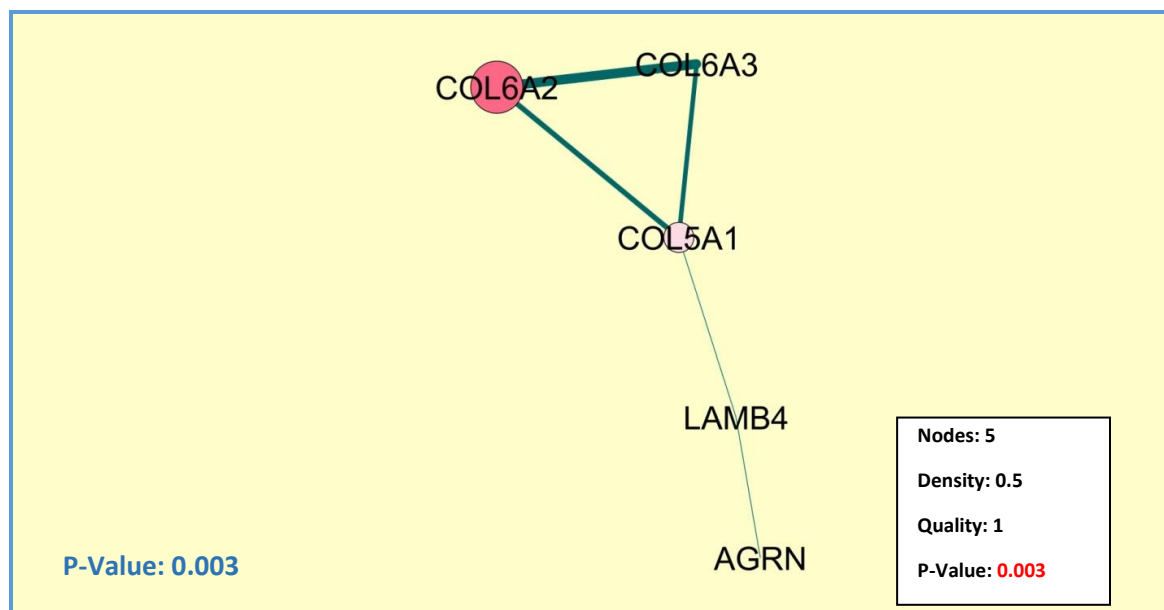
نشانه دهد. CCNB2, CCNA2, تفاوت بیان بیشتری داشتند (شکل ۴) و این می‌تواند احتمال فعال شدن سیستم MPF را در سلول‌های بافت قلب



شکل ۳ - شبکه اثر متقابلی پروتئین- پروتئین های افزایش بیان در پرندهای حساس به آسیب خط B لاین آراین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 3- Protein- Protein interaction and co-expression network of up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian



شکل ۴ - خوشه ژنی CDK1 به همراه ژن‌های هم گروه در شبکه در پرندهای حساس به آسیب خط B لاین آراین با نمایش میزان بیان و هم بیان
Figure 4- Cluster of CDK1 and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

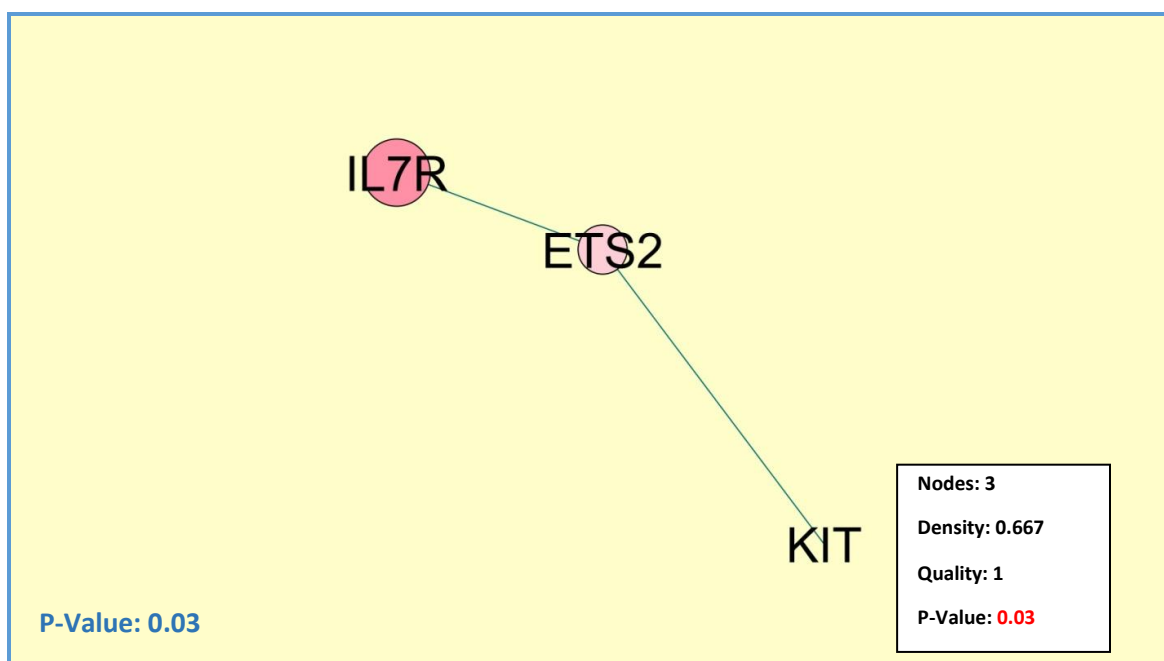


شکل ۵ - خوشه ژنی COL6A2 به همراه ژن‌های هم گروه در شبکه در پرنده‌های حساس به آسیبیت لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان

Figure 5- Cluster of COL6A2 and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

در پیدایش آنژیوزنز داشته باشد. مطالعات نشان داد که در پیدایش رگ‌زایی تومورهای سرطانی، میزان بیان COL4 و COL6 افزایش می‌یابد (۵) ولی در این مطالعه تفاوت بیان COL4 در پرنده‌های حساس به آسیبیت معنی‌دار نبود ولی COL5 و COL6 در گروه آسیبیتی تفاوت بیان معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت ($P < 0.05$).

فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آنها برای آنژیوزنز مستلزم تغییر پروفایل پروتئین‌های مایه برون‌یاخته‌ای (ECM) است (۴۵). تغییر مقادیر پروتئین‌ها در خانواده بزرگ کلاژن‌ها بخشی از این تغییرات ECM می‌باشد که می‌توان به COL4، COL5، COL6 و اشاره کرد (۲۲) (شکل ۵). به نظر می‌رسد COL4 نقش بسیار مهمی



شکل ۶ - خوشه ژنی IL7R به همراه ژن‌های هم گروه در شبکه در پرنده‌های حساس به آسیبیت لاین آرین با نمایش میزان بیان و هم بیان

Figure 6- Cluster of IL7R and its related up-regulated genes in ascites susceptible B-line pedigree of Arian

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه شبکه ژنی از داده‌های RNA-Seq بافت قلب پرند‌های مبتلا به آسیت در مقایسه با سالم نشان داد که فرآیند آنژیوژنز در بافت قلب پرند‌های آسیتی در ژن‌های دارای افزایش بیان^۲ به‌طور معنی‌داری نسبت به پرند‌های سالم فعال‌تر بود به‌ویژه در مسیرهای برهم‌کنش گیرنده‌های ماتریکس برون‌یاخته‌ای^۳، تقسیم سلولی و اینترلوکین-۷^۱ که هر سه مسیر بیولوژیکی اخیر در فرآیند آنژیوژنز و مدل‌سازی مجدد شبکه عروقی نقش فعال بازی می‌کنند. لذا پس از شناسایی این شبکه و خوشه‌های مرتبط با آن می‌توان مطالعات گسترده‌تری روی ژن‌های کم بیان^۴ و توام انجام داد و نتایج به‌دست آمده را برای مطالعات اصلاحی به‌کار برد.

تفاوت بیان ژن گیرنده اینترلوکین-۷ یا IL7R^۱ در پرند‌های حساس به آسیت در مقایسه با پرند‌های سالم معنی‌دار بوده (P < ۰/۰۵) (شکل ۶). در مطالعات پیکنز و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شد که بیان ژن IL7R در سلول‌های فیروبلاست در بیماران دارای التهاب مفاصل (روماتیسم آرتریت) منجر به تمایز سلولی ماکروفاژها و سلول‌های شده و نقش بسیار مهمی در پیش‌رانه‌های آنژیوژنز (رگزایی در روماتیسم آرتریت) دارد (۳۷). IL7R منجر به افزایش بیان ژن IL7 می‌شود که این خود سبب القاء تولید بیشتر IL8 و Ang-1 از ماکروفاژها و ترشح Ang-1 از سلول‌های اندوتلیال می‌گردد (۱۶).

منابع

- 1- Alinaghizadeh, H., M. R. Mohammad Abadi, and S. Zakizadeh. 2010 Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2 (1): 69-80. (In Persian).
- 2- Azizian, M., S. Rahimi, M. A. Kamali, Karimi M. A. Torshizi, and M. R. Zobdeh 2013. Comparison of the susceptibility of six male broiler hybrids to ascites by using hematological and pathological parameters. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 517-525.
- 3- Bakar, S. 1996. How to control Ascites in Broilers. *Misset-World Poultry*. 12:55-57
- 4- Balog, J. M., B. D. Kidd, G. R. Huff, W. E. Huff, N. C. Rath, and N. B. Anthony. 2003. Effect of cold stress on broilers selected for resistance or susceptibility to ascites syndrome. *Poultry Science*, 82: 1383-1387.
- 5- Bellon G, T. Caulet, Y. Cam, M. Pluot, G. Poulin, M. Pytlinska, and M. H. Bernard. 1985. Immunohistochemical localisation of macromolecules of the basement membrane and extracellular matrix of human gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol*, 66(3):245-252. [PubMed: 3893018]
- 6- Bolger, A. M., M. Lohse, and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- 7- Bozorgmehri M., B. Shoja doost, A. Akbari, G. Koleidari, and N. Sheikhi. 1996. Guides for poultry disease, Department of education and research of Kowsar economic organization. (In Persian).
- 8- Closter, A. M. 2014. Quantitative genetic analysis of ascites in broilers. PhD thesis. Wageningen University.
- 9- Coble D. J., D. Fleming, M. E. Persia, C. M. Ashwell, M. F. Rothschild, C. J. Schmidt, and S. J. Lamont. 2014. RNA Seq analysis of broiler liver transcriptome reveals novel responses to high ambient temperature. *BMC Genomics*, 15: 1084.
- 10- Decuyper, E., J. Buyse, and N. Buys. 2000. Ascites in broiler chickens: exogenous and endogenous structural and functional causal factors. *World's Poultry Science Journal*, 56:367-377.
- 11- Diril, M. K., C. K. Ratnacaram, V. C. Padmakumar, T. Du, M. Wasser, and V. Coppola. 2012. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (10):3826-31.
- 12- Dominguez-Avila, N., G. Ruiz-Castañeda, J. González-Ramírez, N. Fernandez-Jaramillo, J. Escoto, F. Sánchez-Muñoz, R. Marquez-Velasco, R. Bojalil, R. Espinosa-Cervantes, and F. Sánchez. 2013. Over and under expression of endothelial 1 and TGF-beta family ligands and receptors in lung tissue of broilers with pulmonary hypertension. *BioMed Research International*, 1-7.
- 13- Druyan, S. 2012. Ascites syndrome in broiler chickens-A physiological syndrome affected by red blood cells. In: *Blood cell-an overview of studies in hematology*. (Edited by Terry E. Moschandreu). INTECH. CC BY 3.0 license. Chapter, 13pp:243-270.
- 14- Ford H. L. and A. B. Pardee. 1999. Cancer and the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(S32):166-72.

- 1- Interleukin 7 receptor
- 2- UP-Regulated
- 3- ECM-receptor interaction
- 4- Down-Regulated

- 15- Hamal, K. R., F. Robert Wideman, B. Nicholas Anthony, and F. E. Gisela. 2010. Differential gene expression of proinflammatory chemokines and cytokines in lungs of ascites-resistant and -susceptible broiler chickens following intravenous cellulose microparticle injection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133: 250-255.
- 16- Hartgring, S. A., J. A. van Roon, M. Wenting-van Wijk, K. M. Jacobs, Z. N. Jahangier, and C. R. Willis. 2009. Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 60(9):2595-605. [PubMed:19714586]
- 17- Hasanpoor K., M. R. Nassiri, G. A. Hoseini Salkandeh, R. Vaez torshizi, A. Pakdel, and H. Kermanshahi. 2016. Transcriptom analysis and gene expression profile of chicken susceptible to ascites. Thesis for PhD degree, Department of animal science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian)
- 18- Javanmard, A., M. R. Mohammadabadi, G. E. Zarrigabayi, A. A. Gharahedaghi, M. R. Nassiry, A. Javadmansh, and N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44 (4): 495-497.
- 19- Julian, R. J. 1987. The Effect of Increased Sodium in the Drinking Water on Right Ventricular Hypertrophy, Right Ventricular Failure and Ascites in Broiler Chickens. *Avian Pathology*, 16:61-71
- 20- Julian, R. J., G. W. Friars, H. French, and M. Quinton. 1987. The Relationship of Right Ventricular Hypertrophy, Right Ventricular Failure and Ascites to Weight Gain Broiler and Roster Chickens. *Avian Diseases*, 31:130-135
- 21- Julian, J. R. 1989. Lung volume of meat-type chickens. *Avian Disease*, 33: 174-176.
- 22- Kalluri, R. 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 3(6):422-433. [PubMed: 12778132]
- 23- Krishnamoorthy, S., C. D. Smith, A. A. Al-Rubaye, G. F. Erf, R. F. Wideman, N. B. Anthony, and D. D. Rhoads. 2014. A quantitative trait locus for ascites on chromosome 9 in broiler chicken lines. *Poultry Science*, 93: 307-317.
- 24- Luger, D., D. Shinder, D. Wolfenson, and S. Yahav. 2003. Erythropoiesis regulation during the development of ascites syndrome in broiler chickens: a possible role of corticosterone on egg production. *Journal of Animal Science*, 81:784-790.
- 25- Maxwell, M. H., and G. W. Robeson. 1997. World Broiler Ascites Survey 1996. *Poultry Int.* April. 1 6-30
- 26- Moazeni, S., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Shahrababak, A. Koshkoie, and F. Bordbar, 2016a. Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. *Open Journal of Animal Sciences*, 6 (1): 1-8.
- 27- Moazeni, S. M., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrababak, and A. K. Esmailizadeh. 2016b. Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 4 (2): 51-56.
- 28- Mohammadabadi, M. R., M. Nikbakhti, H. R. Mirzaee, A. Shandi, D. A. Saghi, M. N. Romanov, and I. G. Moiseyeva. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics*, 46 (4): 505-509.
- 29- Mohammadi, A., M. R. Nassiry, J. Mosafar, M. R. Mohammadabadi, and G. E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics*, 45(2): 198-202.
- 30- Mohammadifar, A., and M. R. Mohammadabadi. 2011. Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iranian Journal of Animal Science*, 42(4): 337-344.
- 31- Mousavizadeh, A., M. R. Mohammad Abadi, A. Torabi, M. R. Nassiry, H. Ghiasi, and A. K. Esmailizadeh. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7 (1): 51-53.
- 32- Nigg, E. A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 17(6):471-80.
- 33- Odom, T. W. 1993. Ascites Syndrome: Overview and Up-To-Date. *Poultry Digest*, 52:14-22.
- 34- Olkowski, A. A., C. Wajnarowicz, B. M. Rathgeber, J. A. Abbott, and H. L. Classen. 2003. Lesions of pericardium and their significance in the aetiology of heart failure in broiler chick-ens. *Research in Veterinary Science*, 74:203-211.
- 35- Pakdel, A., J. A. Van Arendonk, A. L. Vereijken, and H. Bovenhuis. 2002. Direct and maternal genetic effects for ascites-related traits in broilers. *Poultry Science*, 81(9):1273-9.
- 36- Pavlidis, H. O., J. M. Balog, L. K. Stamps, J. D. Hughes, W. E. Huff, and N. B. Anthony. 2007. Divergent selection for ascites incidence in chickens. *Poultry Science*, 86:2517-2529.
- 37- Pickens, S. R., N. D. Chamberlain, M. V. Volin, R. M. Pope, N. E. Talarico, A. M. Mandelin II, and S. Shahrara. 2011. Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis *Arthritis Rheum.* 2011 October; 63(10): 2884-2893. doi:10.1002/art.30493.
- 38- Rabie, T., R. P. M. A. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, T. Veenendaal, J. J. van der Poel, J. A. M. Van Arendonk, A. Pakdel, and M. A. M. Groenen. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *International Society for Animal Genetics*,

- Animal Genetics, 36: 468-476.
- 39- Rabie, T., R. P. M. A. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, T. Veenendaal, J. J. van der Poel, J. A. M. van Arendonk, A. Pakdel, and M. A. M. Groenen. 2005. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. *Animal Genetics*, 36: 468-476.
 - 40- Rabie, T., R. Crooijmans, H. Bovenhuis, A. L. J. Vereijken, A. Veenendaal, J. J. Van der Poel, J. A. M. Van Arendonk, and M. A. M. Groenen. 2007. Pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers: validation and fine-scale mapping of quantitative trait loci affecting PHS using advanced intercross line. In *utilisation of diversity in land use systems: Sustainable and organic approaches to meet human needs*. Tropentag, October 9-11, 2007, Witzzenhausen.
 - 41- Rowland, K., A. Alban, N. B. Anthony, and B. W. Kong. 2013. Whole-genome sequencing of ascites resistant and susceptible lines of broilers. *Poultry Science*, 92(E-Suppl. 1): P. 53.
 - 42- Schmidt, C. J., M. E. Persia, E. Feierstein, B. Kingham, and W.W. Saylor. 2009. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1950s. *Poultry Science*, 88: 2610-2619.
 - 43- Shahdadnejad, N., M. R. Mohammadabadi, and M. Shamsadini, 2016. Typing of *Clostridium Perfringens* Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. *Genetics in the 3rd millennium*, 14 (4).
 - 44- Shi, S., Y. Shen, Z. Zhao, Z. Hou, Y. Yang, and H. Zhou. 2014. Integrative analysis of transcriptomic and metabolomic profiling of ascites syndrome in broiler chickens induced by low temperature. *Molecular BioSystems*, 10: 2984-2993. DOI: 10.1039/c4mb00360h PMID: 25178933.
 - 45- Shi S., Y. Shen, S. Zhang, Z. Zhao, Z. Hou, H. Zhou, J. Zou, and Y. Guo. 2017. Combinatory Evaluation of Transcriptome and Metabolome Profiles of Low Temperatureinduced Resistant Ascites Syndrome in Broiler Chickens. *Scientific Reports*, 7: 2389. DOI: 10.1038/s41598-017-02492-8.
 - 46- Shojaei, M., M. R. Mohammad Abadi, M. Asadi Foz, O. Dayani, A. Khezri, and M. Akhondi. 2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2: 67-73.
 - 47- Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, and C. von Mering. 2015. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D447-D452. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1003>.
 - 48- Tekeli, A. 2014. Effects of ascites on blood gas, blood oximetry parameters and heart sections of broilers growth at high altitude. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24:998-1002.
 - 49- Trapnell, C., L. Pachter, and S. Salzberg. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25: 1105-1111.
 - 50- Trapnell, C., B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold, and L. Pachter. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 28: 511-515.
 - 51- Trapnell, C., D. G. Hendrickson, M. Sauvageau, L. Goff, J. L. Rinn, and L. Pachter. 2013. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnolgy*, 31: 46-53.
 - 52- Wang, D., J. C. Anderson, C. L. Gladson. 2005. The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors. *Brain Pathol*, 15(4):318-326. [PubMed: 16389944]
 - 53- Wideman, R. F. 1998. Causes and control of ascites in broilers. In: *National Mtg. Poultry Health and Processing*. Delmarva Poultry Industry Inc. Georgetown, DE. 33:56-85.
 - 54- Yang, F., H. Cao, Q. Xiao, X. Guo, Y. Zhuang, and C. Zhang. 2016. Transcriptome Analysis and Gene Identification in the Pulmonary Artery of Broilers with Ascites Syndrome. *PLoS ONE* 11(6): e0156045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156045>
 - 55- Zamani, P., M. Akhondi, M. R. Mohammadabadi, A. A. Saki, A. Ershadi, M. H. Banabazi, and A. R. Abdolmohammadi. 2013. Genetic variation of Mehraban sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10: 1812-1817.
 - 56- Zandi, E., M. R. Mohammadabadi, M. Ezzatkhah, and A. K. Esmailzadeh. 2014. Typing of Toxigenic Isolates of *Clostridium Perfringens* by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 509-514.
 - 57- Zhao, Y., X. M. Meng, Y. J. Wei, X. W. Zhao, D. Q. Liu, H. Q. Cao, C. C. Liew, and J. F. Ding. 2003. Cloning and characterization of a novel cardiac-specific kinase that interacts specifically with cardiac troponin I. *Journal of Molecular Medicine*, 81: 297-304.
 - 58- Zhou, H. J., Y. Wang, S. J. Lamont, and P. Ross. 2012. Re-annotation of chicken genome using RNA-seq data. *Poultry Science*, 92(E-Suppl. 1).



Gene Expression Network Analysis on Angiogenesis Pathway in Low Temperature-Induced Ascites Susceptible Chickens in B-line Pedigree of Iranian Meat-Type Strain, Arian

V. Taghizadeh¹- M. R. Nassiri^{2*}- M. Tahmoorespur³- M. R. Bakhtiarizadeh⁴- A. Javadmanesh⁵

Received: 27-06-2017

Accepted: 07-08-2017

Introduction

Ascites syndrome is a metabolic disorder in late ages of meat-type chickens. The only commercial broiler strain of Iran, Arian, has been incurred by this syndrome during a couple of decades ago. Due to susceptibility to ascites and some poor performance issues this strain are wiping out from indigenous market. Prevalence of ascites syndrome in commercial broiler of Arian is nearly 10% in average and in paternal lines it gets more fatality. Role of genetic factors in arising ascites has been proven by former researchers. Fighting against this syndrome through old methods are expensive and time consuming. Since presence of hypertrophy in a tissue needs to make facilities such as blood vessels to providing oxygen and nutrients so studying on angiogenesis pathway and its key important genes was directed. Whereas numerous organs engage the disease and among them heart has key role for initiating and developing the disease, so genomic study dealing with next generation sequencing (NGS) technology has been conducted to identify genes relating to angiogenesis and hypertrophy in right ventricle of ascites susceptible birds.

Materials and methods:

464 one-day-old chicks from B-line pedigree of Arian strain have been reared up to 21 days at the same rearing and nutritional conditions. At the age of 21 the rearing house was divided to 3 sections. Normal and cold sections at the ends of the house and buffer section at the middle. 464 chickens were transferred from normal to the cold section and kept the ambient temperature lower than 16 degrees for inducing ascites. 120 birds from cold section were selected randomly and slaughtered at the age of 42. Those of birds having ascites symptoms classified to ascites susceptible (As) and the other assigned to healthy (He). Samples of right ventricle was picked up and stored with RNAase-Later in liquid N tank. Then 12 As samples and 12 He samples were chosen for extracting total RNA by Biozol kit. After that every 6 samples in each groups pooled together and finally 2 As and 2 He samples prepared to make cDNA libraries for high throughput sequencer machine, Illumina HiSeq 2000. RNA integrity score (RIN) were more than 7 for all samples. All small RNAs such as microRNAs, rRNAs and tRNAs were eliminated by oligo dt beads and finally all mRNAs was used for preparing library. cDNAs as long as 200 bp were selected for library. Sequencing has been done by BGI Company. For mapping, aligning, and DE analyzing several softwares were used such as: Tophat, cufflinks, cuffmerge and cuffdiff. Then significant DEGs imported to String for creating gene expression network and use DAVID 6.8 for investigation gene annotation and pathway analysis and finally Cytoscape v. 3.5.1 was used for network and cluster analysis.

Results and Discussion:

Nearly 90% of reads mapped on genome reference. In ascites group among 125 DEGs 79 genes was up-regulated and 46 loci was down-regulated. Among 125 significant differentially expressed genes (FDR<20%) between As and He birds 59 genes were identified in a pathway in KEGG database. Gene ontology has been shown that the most significant biological process term containing 9 genes in term of gga04512: ECM-receptors interaction. The gene expression network analysis shows that average node neighboring was 3.763, network heterogeneity was 0.9 and network centralization was 0.236. Cluster analysis depicted 3 significant clusters

1- PhD Student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Department of Animal Science and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Professor, Department of Animal Science and, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, College of Aburairhan, Iran

5- Assistant Professor, Department of Animal Science and Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(*- Corresponding author email: nassiry@gmail.com)

involving key rule in angiogenesis including Cyclin-dependent Kinase1 (CDK1), ECM-receptors interaction and Interleukin 7 (IL7) (p -value <0.05). Up regulating of CDK1 with CCNB1 and CCNB2 may activated maturation promoting factor (MPF) that eventually induce cell division and proliferation in endothelial cells (ECs). Up regulating COL6A2 shows its roles in remodeling of ECM-receptors that in turn involving in proangiogenesis process in right ventricle hypertrophy in As birds. IL7 up regulated significantly (P -value <0.05) in As birds. This factor can induce IL8 and Ang-1 secretion from ECs. These factors have key important role for vascular remodeling and vascular tone in proangiogenesis and angiogenesis process. Studying on gene networks in susceptible bird's heart cells has been shown that over expression in angiogenesis related genes was seen significantly in susceptible birds especially in ECM-receptor interaction, Cell division and IL-7 pathways as well. All these recent pathways rule actively in angiogenesis process and vascular network remodeling. So after finding these networks and related clusters it can be possible to find more extended studies on down regulated genes in apart or together for using breeding improvement objectives.

Key words: Angiogenesis, Ascites, Gene Network, Gene Ontology, Pathway Analysis, RNA-Seq

شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) در گاوهای شیری استان کرمان با استفاده از روش های کشت میکروبی، PCR و nested PCR

مهدی سلطانی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵

چکیده

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) عامل بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس است که با اسهال غیرقابل درمان، کاهش وزن و کاهش تولید مشخص می شود. به سبب شیوع بالا در گله های گاو شیری، *Map* خسارات زیادی را به صنایع مرتبط با دامپروری وارد می کند. احتمال دارد *Map* در برخی از بیماری ها مانند بیماری کرون در انسان نیز نقش داشته باشد. اولین گام در کنترل بیماری یون، شناسایی حیوانات بیمار تحت بالینی است. برای ارزیابی وضعیت آلودگی *Map* در استان کرمان، از سه روش کشت، واکنش PCR و nested PCR روی نمونه های مدفوع استفاده شد. سویه جدایه های شناسایی شده *Map* نیز تعیین گردید. این مطالعه اولین گزارش در مورد شناسایی *Map* در گله های گاو شیری در جنوب شرق ایران است. مقایسه روش های استفاده شده در این مطالعه نشان داد روش Nested PCR برای شناسایی *Map* توان بالاتری دارد. تمامی جدایه های شناسایی شده در این مطالعه مربوط به سویه گاوی بودند. با توجه به امکان انتقال *Map* از طریق شیر حیوانات آلوده به انسان، بایستی معیارهای بسیار دقیق برای کنترل بیماری یون در نظر گرفته شود تا احتمال انتقال آلودگی به انسان به حداقل برسد. بر خلاف سل گاوی، به بیماری یون توجه کمتری شده است، بنابراین در نظر گرفتن استانداردهای شدیدتر برای مقابله با مشکلات احتمالی اقتصادی و بهداشتی حاصل از این بیماری ضروری به نظر می رسد. از نتایج مطالعه حاضر می توان برای طرح ریزی تحقیقات آینده و اتخاذ تصمیمات مدیریتی مناسب در موضوع *Map* استفاده کرد.

واژه های کلیدی: بیماری یون، کشت میکروبی، کرمان، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، PCR، nested PCR

شده است (۲۴).

مقدمه

اگرچه شناسایی سریع و اختصاصی بیماری مبنای اصلی هر طرح کنترل آلودگی است، طبیعت سختگیرانه *Map*، دیواره سلولی سخت، دوره نهفتگی طولانی، انتشار نامحسوس باکتری به مدت طولانی، نشانه های بالینی مبهم در مراحل اولیه بیماری و نیز نوسان در پاسخ های ایمنی میزبان موجب شده تا شناسایی زودهنگام *Map* به امری چالش برانگیز مبدل گردد (۲۵). شناسایی *Map* به جداسازی ارگانیزم زنده (کشت)، پیگیری اثرات آن در سیستم ایمنی میزبان (ELISA) و یا تکثیر ژنوم *Map* (PCR) بستگی دارد. مدتهاست کشت مدفوع به عنوان روش استاندارد طلایی برای شناسایی *Map* معرفی شده است اما موانعی مانند سرعت رشد بسیار کند *Map*، مشکلات موجود در حذف آلودگی و نیز هزینه بالای این روش باعث شده تا محققین در پی یافتن روش هایی جایگزین برای آن باشند. راهکارهای مبتنی بر PCR برای بهره گیری از مزایای PCR (حساسیت، اختصاصیت و سرعت بالا) برای شناسایی *Map* مورد استفاده قرار گرفته اند (۶).

تعیین سویه بیماری را در مطالعات اپیدمیولوژی بسیار اهمیت دارد.

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) یک باکتری بسیار کند رشد است که دستگاه گوارش را درگیر کرده و موجب بیماری یون می شود. این بیماری یک التهاب مسری پیش رونده در روده کوچک نشخوارکنندگان است که مشخصه آن اسهال غیرقابل درمان می باشد. این باکتری توان بقا در شرایط سخت مانند کلرژنی آب و پاستوریزه کردن شیر را دارد که احتمال انتقال آن از مسیرهای مختلف به حیوانات غیرمبتلا را افزایش می دهد (۲۱). با در نظر گرفتن مقاومت ذاتی، راه های مختلف انتقال و نقش در ایجاد یا توسعه برخی بیماری های انسانی مانند بیماری کرون، *Map* به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماری مشترک بین انسان و دام مطرح

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

(*) نویسنده مسئول:

(Email: soltani59@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.65920

تنهایی و دو لوله حاوی محیط HEYM همراه با ۲ میلی گرم در لیتر مایکوباکترین J کشت داده شدند. نمونه‌های کشت داده شده برای ۴ ماه در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و در فواصل دو هفته‌ای مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA

از یک کیت تجاری بر پایه گوانیدین تیوسیانات - سیلیکا ژل (Diatom DNA prep 100, Gordiz, Russia) برای استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع استفاده شد. به طور خلاصه، ۵۰۰ میلی گرم نمونه مدفوع به دو بخش تقسیم شده و هر بخش در یک میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و یک میلی لیتر lysis reagent مخلوط شدند و برای ۱۰ دقیقه به شدت ورتکس گردیدند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند و در طول انکوباسیون هر ۵ دقیقه یک بار ورتکس شدند. بعد از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه، فاز مایع رویی دو میکروتیوب به یک میکروتیوب جدید منتقل شدند و با ۲۰۰ میکرولیتر lysis reagent مخلوط شدند. تیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه گردید، سپس تیوب‌ها ورتکس شدند و ۳۰ میکرولیتر سیلیکاژل (عامل جاذب) به تیوب‌ها افزوده شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی مخلوط شدند. بعد از سانتریفوژ به مدت ۲۰ ثانیه در ۵۰۰۰ g، مایع رویی دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر lysis reagent به پلت افزوده و ورتکس شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر نمکی به تیوب‌های همگن شده افزوده شد و به آرامی مخلوط گردید. بعد از سانتریفوژ به مدت ۲۰ ثانیه در ۵۰۰۰ g، مایع رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر lysis reagent به پلت افزوده و ورتکس شد. پس از سانتریفوژ و دور ریختن مایع رویی، جهت افزایش کیفیت DNA و خارج شدن مواد نامطلوب باقیمانده، مرحله شستشو یک بار دیگر تکرار شد. سپس تیوب‌ها برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند تا پلت باقیمانده خشک شود. سپس پلت در ۷۵ میکرولیتر محلول Extra Gene حل شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند. سپس تیوب‌ها ورتکس شدند و برای ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت مایع رویی حاوی DNA به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و کیفیت نمونه DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز و طیف‌سنجی با نانودراپ (Thermo ND1000 Fisher Scientific, USA) بررسی شد. نمونه‌های DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C - نگهداری شدند.

IS900 PCR

آغازگرهای مورد استفاده و شرایط PCR در جدول ۱ گزارش شده‌اند.

برخلاف نوع گاوی (C)، کشت سویه‌های گوسفندی (S) از بافت‌ها و مدفوع حیوانات آلوده به *Map* بسیار مشکل‌تر است (۳۰). انجام RFLP روی توالی درون جایگیر ۹۰۰ (IS900) بسیار وقت‌گیر است و نیاز به حجم DNA زیادی دارد، لذا برای استفاده به عنوان یک روش معمول برای تعیین سویه مناسب نیست (۲۷). در مقابل، کشف پنج جهش نقطه‌ای در توالی درون جایگیر ۱۳۱۱ (IS1311) به توسعه یک روش هضم اندونوکلاز (Restriction endonuclease assay: REA) برای تمایز سریع بین سویه‌های *Map* کمک کرده است (۲۹).

استان کرمان در جنوب شرق ایران تقریباً ۱۱ درصد از مساحت ایران را به خود اختصاص داده است که به سبب اقلیم گرم و خشک، میانگین بارش سالانه آن بسیار پایین‌تر از میانگین کشوری است. از آنجا که هیچ گزارش منتشر شده‌ای از وضعیت آلودگی به *Map* در کرمان وجود ندارد، هدف مطالعه حاضر بررسی وضعیت حضور *Map* در گاوهای شیری با استفاده از ۳ روش تشخیصی مختلف (کشت میکروبی، PCR و Nested PCR) و نیز تعیین سویه *Map* با استفاده از روش IS1311 PCR-REA بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ۲۱۲ نمونه مدفوع از ۴ مزرعه پرورش گاو شیری قرار گرفته در استان کرمان جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستکش پلاستیکی یک بار مصرف و بدون استفاده از روان‌کننده از رکتوم تهیه شدند. تقریباً ۲ گرم نمونه مدفوع به دو بخش ۱ گرمی تقسیم شده و به ظروف پلاستیکی استریل و غیرقابل نشت منتقل شدند. نمونه‌ها بعد از برچسب‌گذاری، روی یخ نگهداری شده و به سرعت به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌های مورد استفاده برای PCR و کشت به صورت جداگانه آماده‌سازی شدند تا از ایجاد آلودگی‌های احتمالی جلوگیری شود.

کشت

نمونه مدفوع (۱ گرم) با استفاده از شیکر افقی به مدت ۳۰ دقیقه با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. بعد از ساکن نگه داشتن به مدت ۳۰ دقیقه، ۵ میلی لیتر از مایع رویی به ۲۵ میلی لیتر هگزادسیل پیریدینیوم کلراید (HPC) ۰/۷۵ درصد (Merck, Germany) افزوده شد و در طی سه روز با تکان دادن آرام در دمای اتاق آلودگی‌زدایی شد. بعد از سانتریفوژ در ۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد و پلت باقی مانده در ۱ میلی لیتر PBS حل شد و به عنوان مایع تلقیح استفاده شد. برای هر نمونه، ۳۰۰ میکرولیتر از مایع تلقیح روی یک لوله حاوی محیط HEYM به

جدول ۱- توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش‌های PCR

Table 1- Primers' sequences and PCR thermal conditions

مرجع Reference	طول محصول (bp) Product length (bp)	شرایط دمایی واکنش Thermal condition	توالی Sequence	نام آغازگر Primer name	توالی هدف Target
(13)	413	94 °C- 5 min; 40x: 94 °C- 40 sec, 62 °C- 30 sec, 72 °C- 1 min; 72 °C- 5 min	GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG	P90	IS900
		94 °C- 5 min; 40x: 94 °C- 1 min, 58 °C- 1 min, 72 °C- 3 min; 72 °C- 7 min	GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGTGAC	P91	
(2)	298	94 °C- 5 min; 40x: 94 °C- 1 min, 58 °C- 1 min, 72 °C- 3 min; 72 °C- 7 min	ATGTGGTTGCTGTGTTGGATGG	AV1	IS900 (nested)
		94 °C- 3 min; 40x: 94 °C- 35 sec, 62 °C- 25 sec, 72 °C- 1 min; 72 °C- 5 min	CCGCCGCAATCAACTCCAG	AV2	
(12)	608	94 °C- 3 min; 40x: 94 °C- 35 sec, 62 °C- 25 sec, 72 °C- 1 min; 72 °C- 5 min	GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA	M56	IS1311
			ATGACGACCGCTTGGGAGAC	M119	

تعیین سویه

تعیین سویه با استفاده از روش PCR-REA IS1311 انجام گرفت (۲۹). توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش در جدول ۱ آورده شده‌اند. مخلوط واکنش شامل غلظت نهایی ۱۰ Tris-HCl میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۲۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میلی‌مول از هر dNTP، ۲۰۰ پیکامول از هر یک از آغازگرها، ۱ واحد آنزیم DNA Taq پلی‌مراز و ۲۰ نانوگرم از الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. محصولات PCR مانند قبل بررسی شدند و حضور باند ۶۰۸ جفت بازی به‌عنوان نمونه مثبت تفسیر شد.

واکنش REA با افزودن ۱۰ میکرولیتر از محصول IS1311 PCR، ۲ میکرولیتر از هر یک آنزیم‌های محدودالایر *HinfI* و *MseI* (Thermo Fisher Scientific, USA)، ۲ میکرولیتر بافر 10X (همراه با آنزیم) و آب مقطر تا حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. مخلوط هضم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید و محصول هضم با الکتروفورز روی ژل آگارز ۴ درصد و به کمک دستگاه UVidoc Gel Documentation System (UVitec, UK) بررسی شد.

نتایج و بحث

ظاهر شدن کلتی‌های مثبت *Map* در محیط کشت بین ۳ تا ۴ ماه به طول انجامید. در نهایت، در ۳۲ نمونه از ۲۱۲ نمونه (۱۵/۱ درصد) مورد بررسی رشد *Map* مشاهده شد و هویت همه کلتی‌های *Map* ظاهر شده در محیط کشت با استفاده از روش PCR IS900 و واکنش REA با آنزیم *AlwI* تأیید شد (شکل ۱). هیچ‌یک از جدایه‌های *Map* روی محیط کشت فاقد مایکوباکتین J رشد نکردند. در ۴۴ نمونه از نمونه‌های مورد بررسی با روش PCR (۲۰/۷ درصد)،

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل تریس-HCl ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میلی‌مول از هر dNTP، ۲۰۰ پیکامول از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم DNA Taq پلی‌مراز و ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو انجام شد. در هر سری واکنش از کنترل مثبت و منفی استفاده شد. محصولات با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند و نتایج با استفاده از دستگاه UVidoc Gel Documentation System (UVitec, UK) ثبت شدند. در صورت وجود باند با طول ۴۱۳ جفت باز نمونه مثبت در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب، از روش REA با استفاده از آنزیم *AlwI* استفاده شد (۳). نمونه‌های مثبت PCR با استفاده از کیت QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) از ژل استخراج شدند و برای تأیید قطعه تکثیرشده تعیین توالی شدند.

IS900 nested PCR

واکنش مطابق روش شرح داده شده پیش از این انجام شد (۲). سه میکرولیتر از فرآورده تکثیر PCR IS900 به‌عنوان الگو در این واکنش مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش در جدول ۱ آورده شده‌اند. محصولات مطابق روش گفته شده در بالا بررسی شدند.

حد تشخیص (Limit of detection)

برای تعیین حد تشخیص واکنش‌های PCR، DNA استخراج شده از سویه *Map* کشت شده و تأیید شده با استفاده از طیف‌سنج نانودراپ ND1000 اندازه‌گیری شده و رقت سریالی از آن تهیه گردید (۱ میکروگرم تا ۱ فمتوگرم) و حداقل حد تشخیص PCR و nested PCR ثبت شد (۸).

تکثیر قطعه ۴۱۳ جفت بازی ژن IS900 مشاهده شد (شکل ۲). هویت همه سویه‌های شناسایی شده توسط PCR نیز با IS900 REA PCR تأیید شد. با استفاده از روش nested PCR تعداد نمونه‌های مثبت به ۵۲ مورد (۲۴/۵ درصد) رسید (شکل ۳). مطابق انتظار، روش nested PCR نسبت به PCR معمولی حساسیت بالاتری را نشان داد. توان تشخیص PCR معمولی نیز بالاتر از روش کشت بود. به هر حال، مقایسه روش‌های کشت، PCR و nested PCR در مطالعه حاضر نشان داد که به‌عنوان یک روش آسان و ارزان، روش nested PCR توان بهتری در شناسایی آلودگی به *Map* در نمونه‌های مدفوع دارد که می‌تواند در فرآیندهای تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

مشکلات قابل توجه در شناسایی بیماری یون (به‌ویژه در مراحل اولیه) غالباً از ماهیت سخت‌گیر الگوی رشد *Map* ناشی می‌شود که منجر به افزایش زمان نهفتگی، نوسان در فاز رشد لگاریتمی تکثیر باکتری و گستردگی پیچیده آسیب‌های ناشی از بیماری می‌شود (۱۱). گرچه کشت مدفوع به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص یون مطرح شده است (۹)، استفاده از آن به‌عنوان یک روش تشخیصی معمول با محدودیت‌های زیادی مواجه است، بنابراین روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR؛ که نسبت به کشت حساسیت بیشتری دارند؛ جایگزین روش کشت شده‌اند. این واقعیت در نتایج این مطالعه نیز منعکس شده است. حساسیت کمتر کشت حاصل چند عامل مانند نیاز به محیط کشت بسیار انتخابی، استفاده از روش کشت نسبتاً غیر حساس و آلودگی‌زدایی شیمیایی شدید (که موجب کاهش زنده‌مانی سلول می‌شود) است که در نهایت به افزایش زیاد حد تشخیص روش کشت منجر می‌شود (۱۰). همچنین کشت یک ویژگی وابستگی به دوز دارد به این معنا که هرچه تعداد باکتری در مایع تلقیح کمتر باشد احتمال رشد باکتری در محیط کشت کمتر می‌شود (۲۸). از طرف دیگر، تنها سلول‌های *Map* زنده قابلیت ارزیابی با کشت را دارند در حالی که PCR می‌تواند DNA کل *Map* را شناسایی کرده و با سرعت بیشتر تعداد بیشتری از حیوانات آلوده را تشخیص دهد (۱۰). با این حال، بایستی به خاطر داشت که میزان نتیجه مثبت در کشت *Map* نشان‌دهنده حداقل میزان آلودگی است چرا که زنده‌مانی سلول‌های *Map* در اثر تأثیرات نامطلوب آلودگی‌زدایی شیمیایی بسیار کاهش می‌یابد (۵).

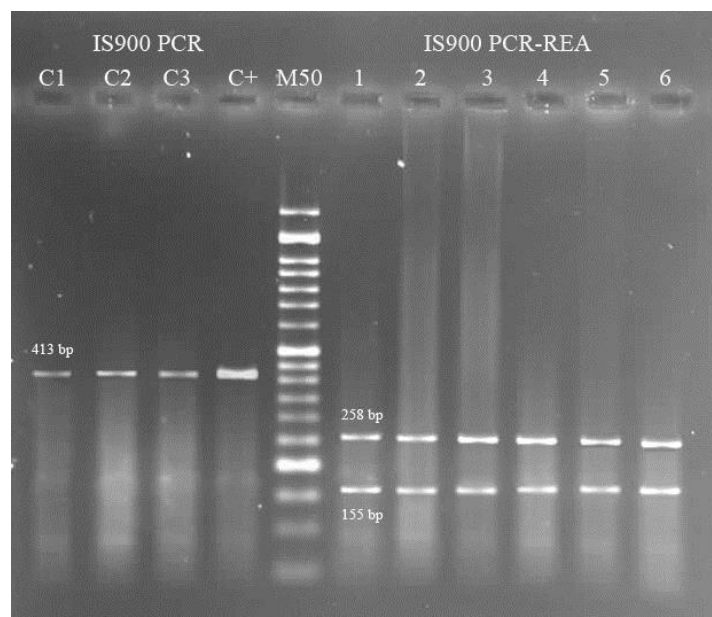
مسئله اصلی که استفاده از روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR را محدود کرده و حساسیت آنها را کاهش می‌دهد کیفیت نامناسب DNA استخراج شده در اثر مقاومت دیواره سلولی میکوباکتریایی و نیز حضور ممانعت‌کننده‌های متعدد PCR است (۱۶) بنابراین بهینه کردن فرآیندهای استخراج DNA در این مسیر اهمیت فراوانی می‌یابد. به این منظور، آماده‌سازی اولیه نمونه برای به‌دست آوردن DNA با کیفیت مناسب ضروری است (۲۵). در مطالعه حاضر، از یک

روش سریع، آسان و کارآمد برای استخراج DNA از نمونه‌ها استفاده شد (۲۳). همچنین تجزیه آنزیمی و فشار مکانیکی به شکستن دیواره سلولی *Map* و افزایش راندمان استخراج DNA کمک کرد. چنان‌که در نتایج مشخص است، می‌توان نتیجه گرفت که به‌عنوان یک روش سریع و ارزان که بازدهی خوبی دارد و موجب افزایش حساسیت PCR و nested PCR شده است، می‌توان از آن به‌عنوان یک رویه معمول در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای برنامه‌های کنترل یون استفاده کرد. توالی IS900 در ژنوم *Map* بین ۱۴ تا ۲۰ نسخه دارد که این امر باعث شده این توالی به یک هدف مناسب و بسیار حساس برای تشخیص *Map* تبدیل شود (۷). به هر حال، با شناسایی چند جایگاه مشابه IS900، منحصر به فرد بودن IS900 PCR با روش REA با هدف فراهم کردن حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص *Map* انجام شده است (۳).

روش nested PCR IS900 به‌طور ذاتی در تکثیر مقادیر بسیار اندک الگوی آغازین نیز موفق است. از طرف دیگر، احتمال افزایش نتایج مثبت کاذب در اثر آلودگی نمونه‌ها مهم‌ترین عیب روش nested PCR است (۱۹)، لذا برای پیشگیری از مشکلات احتمالی بیشترین احتیاط را در نظر داشت. به هر حال، این امر در مطالعه حاضر مشکلی ایجاد نکرد.

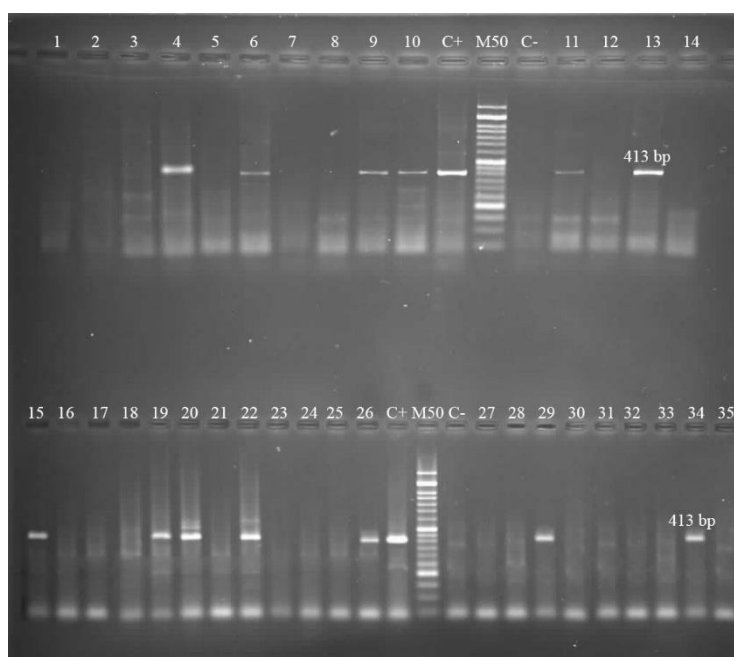
نتایج مطالعه حاضر با مطالعه توحیدی مقدم و همکاران (۲۰۱۰) که توان روش‌های PCR و nested PCR برای شناسایی *Map* در نمونه‌های شیر و مدفوع را مقایسه کردند همخوانی داشت (۲۶). در مقایسه با مطالعه آنها، فاصله کمتر بین نتایج روش‌های مبتنی بر PCR در مطالعه حاضر را می‌توان به راندمان بهتر روش‌های استخراج DNA نسبت داد. به هر حال، تشخیص مستقیم *Map* در نمونه‌های مدفوع و شیر با استفاده از روش nested PCR را می‌توان به‌عنوان آزمونی ارزشمند برای شناسایی حیوانات آلوده و برآورد شیوع آلودگی در سطح گله به کار برد.

اگرچه این مطالعه اولین تلاش برای ارزیابی وضعیت آلودگی *Map* در استان کرمان بود، مطالعات بسیاری در دیگر نقاط ایران انجام گرفته که می‌توان از آنها جهت مقایسه نتایج بهره برد. با بررسی نمونه‌های مدفوع، در مجموع شیوع *Map* در دیگر نواحی و استان‌های مرکزی ایران مانند اصفهان، فارس و چهارمحال و بختیاری بین ۱/۱ تا ۳۱/۸ درصد در جمعیت‌های مورد بررسی بوده‌اند. با در نظر گرفتن اینکه بیشتر مقادیر گزارش شده حاصل بررسی شیوع بیماری در حیوانات آلوده یا مشکوک به آلودگی بوده است، برآوردهای به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد احتمال دارد شیوع *Map* در استان کرمان حتی بالاتر از دیگر بخش‌های ایران مرکزی باشد اما برای دستیابی به نمایی واقعی‌تر از وضعیت آلودگی به *Map* در استان کرمان نیاز به مطالعات بیشتری است.



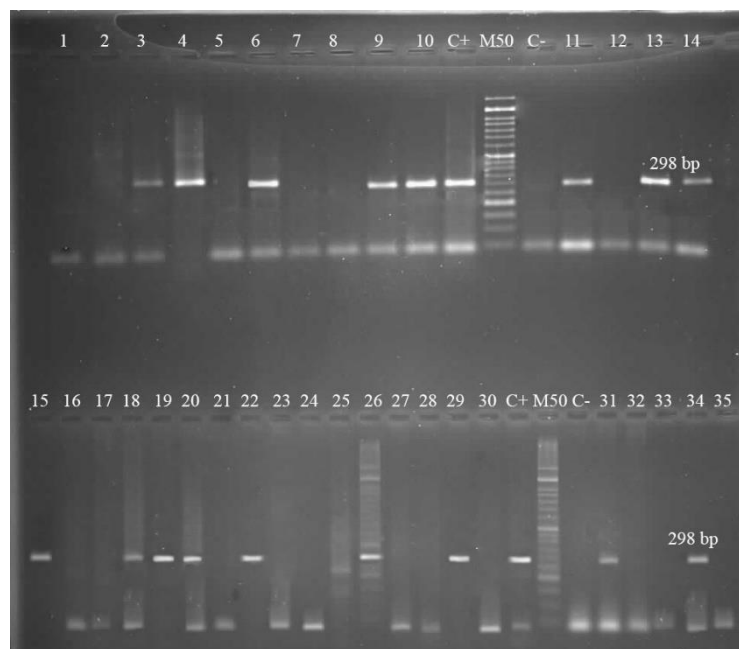
شکل ۱- تأیید نتایج مثبت کشت با روش‌های IS900 PCR و IS900 PCR-REA (لاین‌های C1 تا C3 نمونه‌های DNA استخراج شده از نمونه‌های مثبت کشت، لاین C+: کنترل مثبت، لاین‌های ۱ تا ۳: REA روی نتایج مثبت کشت، لاین‌های ۴ تا ۶: REA روی نتایج مثبت PCR)

Figure 1- Confirmation of positive culture results using IS900 PCR and IS900 PCR-REA (C1 to C3: culture positive IS900 PCR; C+: positive control; 1 to 3: REA on culture positive results; 4 to 7: REA on PCR positive results)



شکل ۲- الکتروفورز محصولات IS900 PCR (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت)

Figure 2- Electrophoresis of IS900 PCR results (M50: 50 bp size marker, C-: negative control, C+: positive control)



شکل ۳- الکتروفورز محصولات IS900 nested PCR (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت)

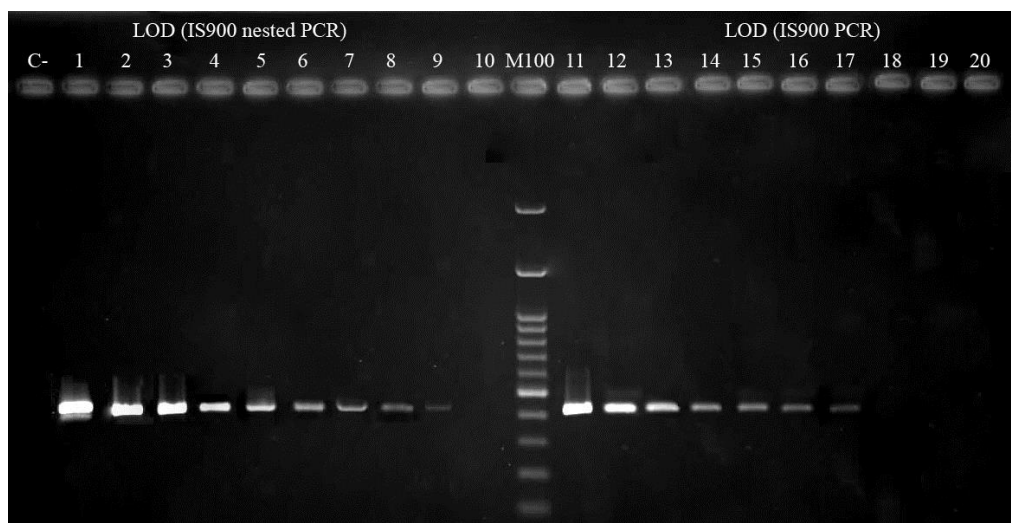
Figure 3- Electrophoresis of IS900 nested PCR results (M50: 50 bp size marker, C-: negative control, C+: positive control)

را مجاز دانسته‌اند. از طرف دیگر، ویتینگتون و همکاران (۲۰۰۱) با شناسایی سویه S در گاوهای آلوده به *Map* در ایسلند، خطر انتقال آلودگی از گوسفند به گاو را اثبات نمودند (۲۹). به هر حال، اکنون مشخص شده است که سویه‌های *Map* هیچ نوع اختصاصیت سویه‌ای ندارند لذا امکان جداسازی سویه‌های C یا S از گاو یا گوسفند وجود دارد (۱۷). با بهره بردن از ویژگی‌های مطلوب روش‌های مبتنی بر PCR، امکان تمایز سریع بین سویه‌های *Map*، پیگیری منشأ آلودگی، راه‌های انتقال بیماری، ابداع روش‌های تشخیصی جدید، طراحی واکسن‌های کارآمد، مطالعات اپیدمیولوژیک و کمک به ریشه‌کنی بیماری یون و سیاست‌های کنترل آن وجود دارد (۲۴).

حضور چهار باند مشخص بعد از فرآیند PCR-REA IS1311 برای تمامی جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق، نشان داد همه آنها به سویه C تعلق دارند (شکل ۵). توالی به‌دست آمده جایگاه IS1311 در این مطالعه کاملاً با توالی‌های منتشر شده برای سویه C مطابقت داشت. در مطالعه حاضر سویه S مشاهده نگردید که با مطالعات انجام گرفته در استان خراسان رضوی مطابقت داشت (۱۴ و ۲۲) یافت نشدن سویه S در این مطالعه عجیب نبود چرا که پراکنش آن در جمعیت‌های گاو بسیار محدود است. همچنین از آنجا که مطالعات اندکی در مورد تعیین سویه *Map* در ایران انجام گرفته است، احتمال یافتن سویه S در جمعیت گاوهای ایران در صورت انجام تحقیقات گسترده‌تر وجود دارد.

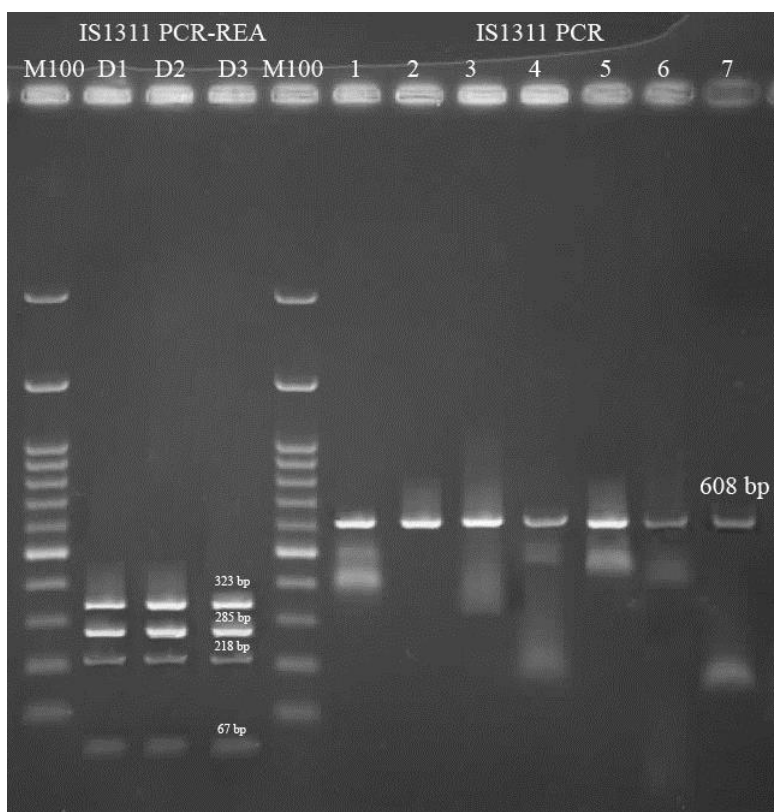
با در نظر گرفتن این واقعیت که یک نسخه از ژنوم معادل ۵ فمتوگرم DNA در نظر گرفته شده است (۱۸)، بررسی حساسیت با استفاده از سریال رقت DNA نشان داد که حداقل سطح تشخیص برای روش‌های PCR و nested PCR به‌ترتیب ۱ پیکوگرم (۲۰۰ ژنوم) و ۱۰ فمتوگرم (۲ ژنوم) بود (شکل ۴). حساسیت روش PCR مشابه مقادیر گزارش شده توسط انگلوند و همکاران (۱۹۹۹) بود اما حساسیت روش nested PCR در مطالعه آنها بالاتر (۱/۲ فمتوگرم) بود (۴). ایکونوموپولوس و همکاران (۲۰۰۴) نیز مقادیر حساسیت مشابهی را برای روش‌های PCR و nested PCR گزارش کردند در حالی که در یک مطالعه دیگر (۱۵) مقدار ۷ پیکوگرم (۱۴۰۰ ژنوم) به‌عنوان حساسیت nested PCR گزارش شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، PCR معمولی در مقایسه با nested PCR از حساسیت کافی برای آزمون‌های تشخیصی روی نمونه‌های مزرعه‌ای برخوردار نیست. از آنجا که در روش استخراج DNA به‌کار رفته در این مطالعه حداقل دستورزی نسبت به نمونه اعمال شد، خطر ایجاد آلودگی به حداقل رسید. بررسی ژن IS900 استخراج شده از ژل نشان داد که قطعه تکثیر شده در این مطالعه همخوانی کامل با توالی‌های منتشر شده IS900 داشت.

پیش از این تصور بر این بود که بر خلاف سویه C، سویه S ارتباطی با ایجاد بیماری در حیوانات به غیر از گوسفند ندارد (۲۷)، بنابراین برخی از راهکارهای کنترل بیماری، چرای گاوها در مراتع مورد استفاده گوسفندان و نیز پرورش گاوها و گوسفندان در کنار هم



شکل ۴- حد تشخیص واکنش‌های PCR و nested PCR (M100: نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، لاین‌های ۱ تا ۱۰ و ۱۱ تا ۲۰ به ترتیب با مقدار DNA الگوی ۱ میکروگرم، ۱۰۰ نانوگرم، ۱۰ نانوگرم، ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکوگرم، ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰۰ فمتوگرم، ۱۰ فمتوگرم، ۱ فمتوگرم)

Figure 4- Limit of detection of PCR and nested PCR reactions (M100: 100 bp size marker, C-: negative control, 1 to 10 and 11 to 20: 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg and 1 fg DNA template, respectively)



شکل ۵- تعیین سویه Map به روش IS1311 PCR-REA (M100: نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۷: تکثیر توالی IS1311، لاین‌های D1 تا D3: نتایج هضم اندونوکلاز)

Figure 5- Map strain typing using IS1311 PCR-REA (M100: 100 bp size marker, 1 to 7: IS1311 PCR results, D1 to D3: IS1311 PCR REA results)

در ایران، اطلاعات قابل اعتمادی برای طرح‌ریزی راهکارهای مؤثر برای محدود کردن بیماری در دسترس نیست. متأسفانه، بیماری یون خطرات بسیاری برای سلامت دام و نیز خسارت‌های اقتصادی فراوانی را برای صنایع مرتبط با دامپروری در پی دارد. روی هم رفته، با در نظر گرفتن هشدارهای ذکر شده، در نظر گرفتن استانداردهای بالای بهداشتی برای به حداقل رساندن احتمال انتقال آلودگی به جمعیت‌های غیرآلوده و کاهش مشکلات مرتبط با سلامت دام و نیز خسارت اقتصادی حاصل از درگیری با *Map* ضرورت دارد.

سیاسگزاری

این مطالعه با استفاده از گرنت شماره ۹۴/۲۵۵۵ از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان انجام گرفته است.

جالب توجه است که نژادهای بومی نسبت به عفونت‌های داخلی مانند پاراتوبوکلوژیس مقاومت نسبی دارند (۱). پراکنش آلودگی به *Map* در سطح کشوری با گسترش سریع گله‌های متراکم هولشتاین – فریزین در ایران مرتبط است لذا انتظار می‌رود که در ایران سویه‌های یکسانی یافت شود (۲۰). این فرضیه برای اثبات نیاز به تحقیق بیشتری دارد. شیوع *Map* در سیستم‌های پرورش صنعتی متراکم بالاتر بود که ممکن است به سبب تجمع تعداد زیادی حیوان در منطقه‌ای محدود، ادامه انتشار *Map* توسط حیوانات آلوده و مقاومت *Map* نسبت به شرایط نامساعد محیطی باشد (۷).

اگرچه بیماری یون در سطح جهانی کمتر مورد توجه قرار گرفته است اما وضعیت در کشورهای در حال توسعه مانند ایران به مراتب بدتر است. از آنجا که ثابت شده است امکان انتقال *Map* از طریق شیر خوراکی به انسان وجود دارد، کنترل و پیشگیری بیماری از مبدأ از بیشترین اهمیت برخوردار است. برخلاف سل گاوی، به سبب فقدان برنامه ملی برای کنترل آلودگی پاراتوبوکلوژیس در گله‌های گاو شیری

منابع

1. Ansari-Lari, M., M. Haghkhah, A. Bahramy, and A. M. N. Baهران. 2009. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4):553-557.
2. Corti, S. and R. Stephan. 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology*, 2(1):1.
3. Cousins, D., R. Whittington, I. Marsh, A. Masters, R. Evans, and P. Kluver. 1999. *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*, 13(6):431-442.
4. Englund, S., A. Ballagi-Pordány, G. Bölske, and K.-E. Johansson. 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33(3):163-171.
5. Grant, I. and M. Rowe. 2004. Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4):283-288.
6. Hanifian, S. and S. Khani. 2016. Tracking of *Mycobacterium avium Paratuberculosis* Load in Milk Production Chain: A Real-Time qPCR and Culture Assay. *Journal of Food Safety*, 36(1):136-141.
7. Hanifian, S., S. Khani, A. Barzegari, and J. Shayegh. 2013. Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. *Veterinary Microbiology*, 162(1):160-165.
8. Ikononopoulos, J., M. Gazouli, I. Pavlik, M. Bartos, P. Zacharatos, E. Xylouri, E. Papalambros, and V. Gorgoulis. 2004. Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3):315-321.
9. Jayarao, B., S. Pillai, D. Wolfgang, D. Griswold, C. Rossiter, D. Tewari, C. Burns, and L. Hutchinson. 2004. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens & Disease*, 1(1):17-26.
10. Kralik, P., I. Slana, A. Kralova, V. Babak, R. H. Whitlock, and I. Pavlik. 2011. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*, 149(1):133-138.
11. Liapi, M., G. Botsaris, I. Slana, M. Moravkova, V. Babak, M. Avraam, A. Di Provvido, S. Georgiadou, and I. Pavlik. 2015. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep strains isolated from Cyprus sheep and goats. *Transboundary and emerging diseases*, 62(2):223-227.
12. Marsh, I., R. Whittington, and D. Cousins. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and

- strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Molecular and Cellular Probes*, 13(2):115-126.
13. Millar, D., J. Ford, J. Sanderson, S. Withey, M. Tizard, T. Doran, and J. Hermon-Taylor. 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9):3446-3452.
14. Nassiri, M., M. Jahandar, M. Soltani, M. Mahdavi, and M. Doosti. 2012. Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments. *Agricultural Biotechnology*, 4(1):83-96. (In Persian).
15. Nebbia, P., P. Robino, S. Zoppi, and D. De Meneghi. 2006. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66(1):116-120.
16. Rapp, D. 2010. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5):1485-1493.
17. Rónai, Z., Á. Csivincsik, M. Gyuranecz, Z. Kreizinger, Á. Dán, and S. János. 2015. Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from various sources. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2):275-283.
18. Sanderson, J., M. Moss, M. Tizard, and J. Hermon-Taylor. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut*, 33(7):890-896.
19. Sevilla, I. A., J. M. Garrido, E. Molina, M. V. Geijo, N. Elguezal, P. Vázquez, and R. A. Juste. 2014. Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting Triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12):3757-3768.
20. Shahmoradi, A. H., R. Arefpajohi, K. Tadayon, and N. Mosavari. 2008. Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle farms in central Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 40(3):169-173.
21. Shariati, S. H., A. Alaei, R. Keshavarz, N. Mosavari, A. Rabbani, M. Niegowska, L. A. Sechi, and M. M. Feizabadi. 2016. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus by PCR and ELISA. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(08):857-862.
22. Soltani, M., M. R. Nassiry, F. Shahroudi, and B. Sadeghi. 2010. PCR-restriction endonuclease analysis for strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* based on polymorphisms in IS 1311. *Middle East Journal of Scientific Research*, 5(4):311-315.
23. Soltani, M., M. R. Nassiry, F. E. Shahroudi, and M. R. Bassami. 2008. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in feces and milk samples from holstein dairy cows by PCR. *Biotechnology*, 7(3):582-585.
24. Stevenson, K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*, 46(1):1.
25. Sting, R., M. Hrubenja, J. Mandl, G. Seemann, A. Salditt, and S. Waibel. 2014. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *The Veterinary Journal*, 199(1):138-142.
26. Tohidi Moghadam, M., S. Sarv, F. Moosakhani, and A. Badiie. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Milk and fecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(24):3055-3061.
27. Whittington, R., A. Hope, D. Marshall, C. Taragel, and I. Marsh. 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9):3240-3248.
28. Whittington, R., I. Marsh, S. McAllister, M. Turner, D. Marshall, and C. Fraser. 1999. Evaluation of Modified BACTEC 12B Radiometric Medium and Solid Media for Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4):1077-1083.
29. Whittington, R., I. Marsh, and R. Whitlock. 2001. Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Molecular and Cellular Probes*, 15(3):139-145.
30. Whittington, R. J. 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3):614-622.



Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Kerman Province's Dairy Cows using Microbial Culture, PCR and Nested PCR Methods

M. Soltani^{1*}

Received: 09-07-2017

Accepted: 16-09-2017

Introduction *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is a very slow growing bacterium that solely infect the digestive tract and leads to Johne's disease (JD) that is characterized by intractable diarrhea. Considering innate resistance and different transmission modes of *Map* and its possible role in development or progression of some human diseases (mainly Crohn's disease), strong zoonotic potential has been proposed for *Map*. Diagnosis of JD depends on isolation of viable *Map* (culture), tracking of its consequences on host immune system (ELISA) or amplification of *Map* genome (PCR). Fecal culture considered as gold standard for *Map* detection but obstacles like very slow growth rate of *Map*, decontamination issues and its high expenses led to development of alternatives like PCR based approaches to gain PCR advantages like high sensitivity, specificity and rapidity for diagnosis of *Map*. Since no published report was found on *Map* infection status in Kerman, the current study aimed to investigate the presence of *Map* in bovine feces samples using 3 different detection methods including culture, IS900 PCR and IS900 nested PCR. Also IS1311 PCR-REA was used for strain typing of *Map* isolates.

Materials and Methods 212 fecal samples were taken from 4 dairy cattle farms located in Kerman province, southeast Iran. The fecal fractions for culture and PCR were prepared separately to inhibit potential cross-contaminations. Per each sample, 300 µl of prepared inoculum was cultured on slope of Herrold's egg yolk medium (HEYM) alone, and two HEYM + 2.0 mg/L of mycobactin J slopes. Inoculated slopes were incubated at 37 °C for 4 months and monitored at biweekly intervals. After extraction of DNA from fecal samples, PCR reaction performed in 25 µl volume and products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels. The samples were considered as positive if 413 bp amplified band was present. To avoid false positive results, a REA approach using *AlwI* restriction enzyme was adopted. For IS900 nested PCR reaction, 3 µl from IS900 PCR products were used as template. Resultant products were screened as before. To evaluate the limit of detection of PCR reactions, the DNA extracted from confirmed *MAP* field strain culture was 10 fold serially diluted (1 µg – 1 fg) and the minimum detection level of PCR and nested PCR were observed. Strain typing of *Map* isolates was based on IS1311 PCR-REA.

Results and Discussion It takes 3-4 months of incubation for appearance of *MAP* positive colonies. *Map* was detected in 32/212 (15.1%) of cultured samples. All colonies were verified as *MAP* using IS900 PCR and REA with *AlwI*. 44 positive samples were detected by IS900 PCR (20.7%) while nested PCR was able to find 52 infected samples (24.5%). All isolates detected by PCR based methods were also verified as *MAP* by IS900 PCR-REA. According to expectations, nPCR offered higher sensitivity than conventional PCR. However, comparing the methods used in the present study showed that as a simple and cheap assay, nested PCR is inherently successful in amplification even with rare amount of starting template and has the better ability to detect the *Map* infection in fecal samples and can be used as a routine method in diagnostic processes. Although this study was the first attempt to access the *Map* infection status in Kerman province, as summarized in table 3, many studies were conducted all around Iran that can be compared with. Altogether, *Map* incidence in other central Iran provinces (Isfahan, Fars and Chaharmahal and Bakhtiari) were between 14.1 to 31.8 percent of tested populations based on examination of fecal samples. Considering that most of reported values came from clinically infected or suspected animals, the estimates obtained in this study showed the possibility that the *Map* incidence in Kerman province may be higher than other parts of central Iran, but it more investigations needed to create a realistic scheme of *Map* infection status in Kerman province. Remembering that a copy of genome was considered as equivalent to 5 fg of DNA, sensitivity analysis using serially diluted DNA preparations revealed that the minimum detection level were 1 pg (200 genomes) and 10 fg (2 genomes) for PCR and nested PCR, respectively. According to results, compared to nested PCR, conventional PCR is not sensitive enough for diagnostic tests on field samples. Analysis of fragments produced after IS1311 REA showed the presence of explicit patterns of four bands for all obtained isolates that is the indication of *MAP* C type. Obtained DNA

1- Assistant professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

(*- Corresponding author email: soltani59@gmail.com)

sequences from the amplified IS1311 locus was exactly consistent with previously published sequence for *MAP* C type. S type was not detected in current study that was consistent with results of researches performed in Razavi Khorasan province. Failure to find S *Map* strain was not surprising, since its global prevalence in cow population is very low and hard to find. Also, there are few papers dealing with *Map* strain typing in Iran, so it is conceivable to find S *Map* type in Iran's cattle population if more research conducted in this respect.

Conclusion Although paratuberculosis is a global neglected disease, the situation is worse in developing countries like Iran. Contrary to bovine tuberculosis, due to absence of a national program to control paratuberculosis infection in Iran's dairy herds, no reliable data is available for arrangement of tools for efficient restriction of disease which leads to inadequate attention to JD and eventually receive the least priority to control. Unfortunately, paratuberculosis as an overlooked disease, is a severe hazard for cows' health and also for economic activities related to dairy cattle industry. On the other hand, *Map* is still considered as an important suspicious zoonotic agent which cause serious health problems for humans. Meanwhile, considering aforementioned warnings, enactment of crucial health standards is vital to minimize the chance of infection transmission to non-infected populations and alleviating health problems and economic losses due to *Map* infection.

Keywords: Culture, Detection, Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, nested PCR, PCR

تجزیه فیلوژنی و تکاملی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در شترهای منطقه سیستان و بلوچستان

مجتبی پیری^۱ - غلامرضا داشاب^{۲*} - بتول اصغری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

مطالعه بر روی حیوانات بومی می‌تواند به حفظ ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، پیاده نمودن برنامه‌های اصلاح نژادی و به‌دست آوردن اطلاعات در مورد ساختار ژنتیکی آن‌ها کمک کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان و مطالعات فیلوژنتیکی و مولکولی آن با سایر گونه‌های پستانداران بود. در این مطالعه نمونه‌های خون از ۵۰ نفر شتر از سیاهرگ گردنی از دو گله واقع در زابل و منطقه دلگان بلوچستان گرفته شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل و تکثیر ناحیه اینترون دوم و اگزون سوم با طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت بازی جایگاه ژن لپتین با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی صورت گرفت و محصول تکثیر شده با آنزیم برشی *Asuhipi* به دو قطعه ۱۴۰۰ و ۶۰۰ جفت بازی شکسته شده و در نهایت قطعات مذکور از روی ژل استخراج و تعیین توالی شدند. پس از برهم گذاری توالی قطعات مذکور یک قطعه ۱۹۴۰ جفت بازی با کمترین خطا جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی به‌دست آمد. همچنین، توالی نوکلئوتیدی ژن لپتین در سایر گونه‌های پستانداران با استفاده از ابزار BLAST در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم حاصل شد. نتایج هم‌ترازی توالی‌های دو جمعیت مورد استفاده در منطقه زابل و بلوچستان تشابه ۹۹ درصد را نشان داد، اما تفرق متمایز از سایر گونه‌های پستانداران داشت. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن لپتین بیانگر نسبت جایگزینی dn/ds برابر ۰/۷۶ در بین گونه‌های مختلف بود که نشان دهنده انتخاب خالص در طی تکامل این ژن است. نتایج درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی نوکلئوتیدی نشان‌دهنده مسیرهای تکاملی مختلف ژن لپتین در گونه‌های مختلف، شامل هفت دسته از گونه‌ها شتر، (گاو، بوفالو و گاو میش)، (گوسفند و بز)، خوک، خفاش، گربه و پستانداران دریایی بود که شتر، گاو و پستانداران دریایی بیشترین قرابت را داشتند. با توجه به تنوع بسیار بالا در قطعه مورد مطالعه توالی جایگاه ژن لپتین و شاخص تکامل محاسبه شده به نظر می‌رسد اهلی شدن دام‌ها و انتخاب در صفات تولیدی شیر منجر به تغییراتی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین و تغییر نقش بیولوژیکی آن شده است.

واژه‌های کلیدی: انتخاب طبیعی، روند تکاملی، شتر بومی، فیلوژنی، لپتین

مقدمه

بزرگی به نام ژن ob رمزگذاری می‌گردد (۲۲). لپتین در ابتدا به‌عنوان فاکتور چاقی توصیف شده است (۸). وقتی که ذخایر چربی افزایش می‌یابد، لپتین روی سیستم نوروپپتیدی هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و سبب کاهش اشتها و سپس افزایش مصرف انرژی می‌شود (۴). همچنین، یک فاکتور کلیدی مهم برای شروع رسیدن به بلوغ نیز است (۵). فعالیت‌های لپتین به هر دو صورت کوتاه و بلندمدت اتفاق می‌افتد. در کوتاه‌مدت لپتین پلازما به‌عنوان یک سیگنال سیری عمل می‌کند، اما در بلندمدت میانگین غلظت لپتین پلازما جهت تأمین انرژی مغز ضروری است (۱، ۵ و ۷).

فیلوژنی مولکولی از اطلاعات توالی‌های مولکولی برای احیا کردن روابط تکاملی بین گونه‌های مختلف و برآورد زمان واگرایی ارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (۱۹ و ۲۱). روابط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و موجودات

لپتین برای اولین بار در بافت چربی موش‌های چاق کشف شد (۲۲). در پستانداران، این پپتید عمدتاً در بافت چربی تولید می‌شود. بررسی‌های اخیر با استفاده از روش RT-PCR نشان داده‌اند که نسخه‌های رونویسی لپتین (mRNA) در جفت (۹، ۱۴ و ۱۷)، معده (۳ و ۱۹) و مغز (۱۰، ۱۶) جوندگان و انسان نیز وجود دارند. لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتون (با ۱۶۷ اسید آمینه) می‌باشد و توسط ژن

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه زابل

۲- استادیار علوم دامی، دانشگاه زابل

۳- دانشجوی دکتری علوم دامی، دانشگاه زابل

(*) نویسنده مسئول: (Email: dashab@uoz.ac.ir)

می‌شوند. با اجرای مراحل فوق در تحقیق حاضر می‌توان به شناخت کافی از ساختار ژنی لپتین دست یافته و از آنها در مطالعات تکمیلی جهت دستیابی به آلل‌های ویژه برای بهبود صفات تولیدی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج DNA و تعیین کیفیت: در مطالعه حاضر، تعداد ۵۰ نفر شتر از دو گله زابل (۲۵ نفر) و منطقه دلگان بلوچستان (۲۵ نفر) مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب دام‌ها به‌طور تصادفی و با ترکیب جنسی نر و ماده بودند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن انجام گرفت. به منظور اطمینان از صحت انجام استخراج DNA، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه‌های حاوی DNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

تعیین توالی محصولات تکثیر شده: در مطالعه حاضر ناحیه اینترون دوم و اگزون سوم با طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت بازی جایگاه ژن لپتین، با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شد. پرایمرهای رفت و برگشت با نرم‌افزار Primer premier (۱۸) بر اساس توالی‌های ثبت شده جایگاه ژن لپتین برای گاو در بانک ژنی NCBI طراحی شد و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید.

Forward primer 5-TCGTCACCAGGATCAACGAC-3
Reverse primer 5-AGGAAGCCAACAGGTGGAGA-3

با توجه به بلند بودن قطعه و عدم امکان خوانش صحیح نوکلئوتیدها در قطعات بزرگتر از ۱۰۰۰ جفت باز، محصول تکثیر در معرض هضم آنزیمی با *Ashpi* قرار گرفت و محصولات هضم آنزیمی از روی ژل آگارز تخلیص شدند. سپس جهت تعیین توالی به شرکت بایونیر کره (Bioner Co.) ارسال گردید.

شناسایی و ویرایش توالی‌های ژنی لپتین: توالی نوکلئوتیدی ژن لپتین با استفاده از ابزار BLAST در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم، برای سایر گونه‌های مورد نظر نیز به‌دست آمد (جدول ۱). جهت مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی ابتدا توالی ژنی لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان با توالی سایر گونه‌ها با استفاده از روش Clustal W هم‌تراز شدند. سپس تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه یا غیرمشابه اتفاق افتاده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (۲۰) و روش حداکثر درستی برای به‌دست آوردن میزان جانشینی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی استفاده شد. تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، درصد تفرق ژنی و همچنین تنوع آنها با استفاده از نرم‌افزار Dnaspv5 (۱۳) محاسبه گردید.

را می‌توان با یک درخت فیلوژنتیک شرح داد که قابل مقایسه با شجره‌نامه‌ای است که ژن‌ها یا موجودات بسیار شبیه را نشان می‌دهد. به همان اندازه که توالی DNA بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند، الگوهای تغییرات نوکلئوتیدی مورد استفاده برای ایجاد درختان فیلوژنتیک پیچیده‌تر می‌شود که به خاطر تعداد عوامل دخیل در جایگزینی‌هاست. تکامل، پیامد دگرگونی در فراوانی آلل‌هاست نظر به این که برخی آلل‌ها در طول زمان از دست می‌روند و فراوانی سایر آلل‌ها تا صددرصد افزایش می‌یابد، باعث می‌شود تا این آلل‌ها در جمعیت تثبیت می‌شوند. تکامل بلندمدت یک گونه، از تثبیت موفق آلل‌های خاص حاصل می‌شود که بازتاب پایداری جهش‌ها است. آهنگ پایداری این جهش‌ها در جمعیت، نرخ تکاملی یا نرخ پایداری نامیده می‌شود (۱۷).

به خوبی مشخص شده است که نیروهای متعدد تکاملی بر توالی‌های DNA عمل می‌کند و باعث می‌شود توالی یک ژن در ظرف مدتی نه چندان طولانی دگرگون شود. بنابراین، هر دو توالی که از یک جد مشترک مستقلاً تکامل می‌یابند، سرانجام از یکدیگر دور می‌شوند. اندازه‌ی این واگرایی، فاصله ژنتیکی نامیده می‌شود (۱۷). بر اساس نظریه‌ای که برای نرخ تکاملی پروتئین‌ها ارائه شده است، به نظر می‌رسد که فاصله ژنتیکی دو توالی رمزکننده‌ی پروتئین یکسان، اما جدا شده از گونه‌های مختلف، با زمان انشعاب دو گونه به‌طور خطی نسبت داشته باشد. به علت این که ممکن است پروتئین‌های متفاوت رفتار مشابهی نشان دهند، فرض می‌شود که نرخ تکاملی برای هر پروتئین معین در طول زمان ثابت باشد. این پیشنهاد وجود یک نوع ساعت مولکولی دارد. فرضیه ساعت مولکولی پیشنهاد می‌کند که نرخ جایگزینی برای هر پروتئین ثابت است. همچنین، اختلافات در توالی یک ژن برای دو ارگانیسم باید فاصله تکاملی آنها را منعکس کند (۱۷).

حیوانات بومی به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند که حفظ و تکثیر آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این موجودات بعد از هزاران نسل انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و یا غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خود ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و همچنین به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (۱۵). از طرف دیگر منابع حیوانی برای تأمین خوراک و پایداری اقتصادی-اجتماعی و محیطی کشور ضروری هستند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تعیین توالی ژن لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان و همچنین تعیین روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین و نحوه انتخاب در طول تکامل است. ابتدا درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های لپتین که در بانک اطلاعاتی قابل دسترس هستند ترسیم می‌گردد. همچنین، با استفاده از این توالی‌ها، میزان، مسیر و محل‌های حساس به تغییرات در طول تکامل شناسایی

جدول ۱- گونه، اسم علمی، اندازه ژن و شماره دستیابی توالی‌های ژن لپتین استفاده شده در آنالیز فیلوژنی و روند تکاملی

Table 1- Species, Scientific name, length and accession number of Leptin gene used in the analysis of phylogenetic and evolutionary

گونه‌های مورد بررسی Species (Scientific name)	شماره دستیابی بانک ژن Accession number	اندازه ژن (جفت باز) Length gene (bp)
Baluchi-camel (شتر)	-	1940
Lama glama (شتر لاما)	KC295539.1	2683
Delphinapterus leucas (دلفین)	AF296671.1	1802
Delphinapterus leucas (دلفین)	JN833619.1	2020
Myotis pilosus (خفاش)	GU230846.1	2046
Bubalus bubalis (بوفالو)	NM 001290901.1	504
Bos Taurus (گاو اهلی)	AJ512638.1	581
Zalophus californianus (شیر دریایی)	AM157372.2	592
Halichoerus grypus (خوک آبی)	AJ618982.1	759
Phoca vitulina (خوک آبی)	AJ618981.1	757
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266811.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266809.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266810.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AB003143.1	441
Macaca mulatta (میمون)	NM 001042755.1	773
Xenopus laevis (قورباغه)	NM 001095714.1	1065
Columba livia (کبوتر)	HG797022.1	608
Bos Taurus (گاو اهلی)	XM 010804453.2	3003
Bos Taurus (گاو اهلی)	NM 173928.2	2930
Ovis aries (گوسفند)	XM 004008038.3	3004
Ovis aries musimon (گوسفند)	XM 012131507.2	3006
Capra hircus (بز)	XM 018046968.1	3004
Ovis aries (گوسفند)	XM 012177090.2	3001
Ovis aries musimon (گوسفند)	XM 012131508.2	3003
Ovis aries (گوسفند)	U84247.1	441
Capra hircus (بز)	EF583947.1	441
Capra hircus breed Huanghuai (بز)	EU158187.1	444
Ovis aries (گوسفند)	FR688115.1	425
Sus scrofa (خوک)	U63540.1	541
Sus scrofa obese (خوک)	GQ268935.1	522
Sus scrofa breed Tibetan pig (خوک)	GQ240885.1	504
Sus scrofa Banna minipigs inbred (خوک)	HM194604.1	504
Sus scrofa lean (خوک)	GQ268936.1	513
Equus Ceballos (اسب)	NM 001163980.1	2935
Felis catus (گربه)	XM 006929352.2	500
Felis catus (گربه)	NM 001009850.1	2935
Felis catus (گربه)	XM 006929352.2	500
Felis catus (گربه)	XM 006929350.2	500

روند انتخاب در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد (۱۹). مقادیر d_S و d_N به ترتیب با استفاده از روابط ۲ و ۳ قابل محاسبه هستند.

$$d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3P_N) \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$d_S = -3/4 \ln(1 - 4/3P_S) \quad \text{رابطه (۳)}$$

در این روابط P_N نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و P_S نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) روند انتخاب برای ژن لپتین محاسبه گردید. معنی‌دار بودن مقدار عددی d_N/d_S با آزمون فیشر در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار آنالیز HIV_SNAP v2.1.1 (۱۱) محاسبه شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از نمونه‌های خون شتر مورد مطالعه (زابل و منطقه دلگان بلوچستان) و تکثیر ناحیه مورد مطالعه با موفقیت انجام شد و نتایج الکتروفورز محصولات استخراج، تکثیر ژن و هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز نشان از کیفیت مطلوب آنها دارد (شکل ۱).

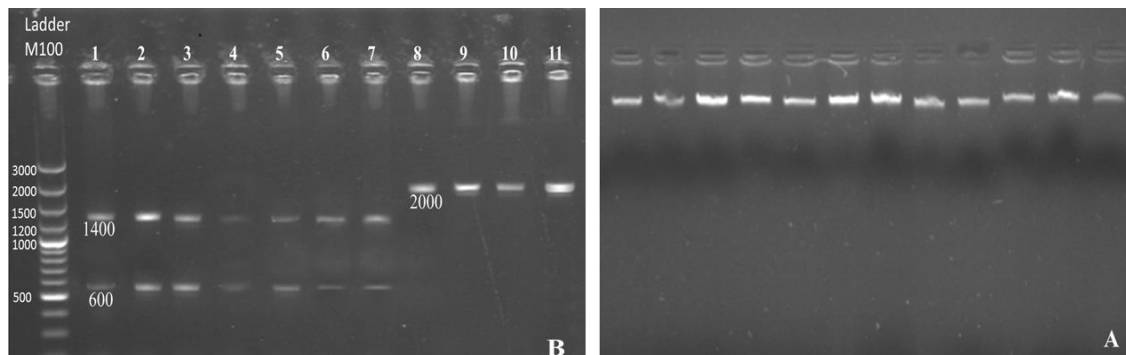
فیلوژنی و تعیین مسیر تکاملی: به منظور ترسیم درخت

فیلوژنتیک، از توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (۲۰) استفاده شد. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر ناهمگون، درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال-همسایگی (NJ) ترسیم گردید. در این روش از ماتریس (Q) استفاده می‌شود که مشتمل بر کل شاخه‌ها بوده و کمترین مقدار که بیان‌کننده شباهت بالای دو شاخه باشد را انتخاب نموده و در یک انشعاب از درخت فیلوژنی به کار می‌برد. مقادیر Bootstrapping به وسیله ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. ترسیم درخت فیلوژنی بوسیله روش NJ با استفاده از رابطه ۱ انجام شد.

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k) \quad \text{رابطه (۱)}$$

در رابطه بالا: $d(i, j)$: فاصله بین شاخه i و j ; k : شاخه k در درخت، r : تعداد کل شاخه‌ها و $Q(i, j)$: مقدار عددی شاخه‌های i و j است.

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص



شکل ۱- A: کیفیت DNA استخراج شده از خون کامل شتر با استفاده از کیت سینازن در شتر استان سیستان و بلوچستان؛ **B:** الکتروفورز محصولات PCR (شماره‌های ۸ تا ۱۱) و محصولات هضم آنزیمی (شماره‌های ۱ تا ۷) جایگاه ژنی لپتین بر روی ژل آگارز ۲ درصد و راهک M100، اندازه نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی DNA (Gene Ruler ladder, Fermentas)

Figure 1- A: Quality DNA extracted from whole blood using Cinna gene kit in camel of Sistan and Baluchistan Province; **B:** The electrophoresis of 2% agarose gel of PCR product (from 8 to 11) and products of endonuclease digestion enzyme (from 1 to 7) of Leptin gene and M100 Ladder, Marker size of 100bp (Gene Ruler 100 bp) DNA ladder, Fermentas.

ژن لپتین در شتر بلوچی با سایر توالی‌های به دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم (NCBI) با ابزار Alignment نرم‌افزار MEGA6 و روش Clustal W همتراز شدند.

کانتینگ توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین (۱۹۴۰ جفت بازی) در شتر بلوچی استان سیستان و بلوچستان مطابق با شکل ۲ است. اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در پستانداران و سایر گونه‌های اهلی در جدول ۱ آورده شده است. توالی‌های جایگاه

```
AGTACTCTCC ACCTGTTGCG CTTCTCTAG GCGAGCCGGG TCTCTGAGGT CGGCTGAGGC
CGTGCAACCA TACAAGGTGC TGTCAGTGGA ATCGATGCCC TCCCACGTGT CCACGTATCC
TACAACTGCC TCTGCTCTCC CCTCCCCACA GCCCCACTC CTTCTCTCC CTTCTGCCCT
GACTGGAATC CTAGTGCCAA GGACCAGAAG GAGACGTAAA GGTCCTGTGT TCCCTGGGGA
AGTGACCAGA CCCCCAGGA GCATCTCCAC TGGGTCTTCA TCCCATCTCT AAAACGTGCT
AATCATTGGG CATTCTTCGT GGTGGAGCT GAACCTGAC CCCATGAAGC TTTCATGAC
CACTAGGTCT GCCTGTCAGG CCGCATAGAA AAAAATCTGT CTTCTTTTAC ATACAGCCCT
CTATGTACTT GCAAACAGCT GTCAATGTCC CTGAGTCTT TTCTGTGGGG ACCACTTCCC
AGATGAGGTC TGTACTTAGA ATTAGGAAGA CTAAGTGTGA ATCCTCACCC TTCTGTTCTC
TGTCTGTAAG ATCTTTTTTT TTCCAACAAT GAAAGTTTTT TTTTAAACT TTGTTTTGGG
GGGGGAGGCA AGGGAGGTAA TTAGGTTTAT TTATTTTTAA AGGAGGTAAT AGGGATTCTA
AATCCACAG AGCCTCATTC ATGGCAAAGC ATTGCGCTCA AGGCTCTTTG AGCTATACCC
TCCACACTCT GCCCGGAAAA TCCTAAACCA GTTAAAGTTC CTTAATTTCT GTTCTGAGC
GTTTCTCCC TCTAGGTAAG GGGACATACC TAATAGTCTC TACCAAGTCC GTAATGAGAA
TCAATCAAGA TAAAGCATGG GGACCCATCG CCCCCATAA TACACCCCTG CGAGAACCAG
AACAAGAGTG CGAGACTACT TCAAAGGTTT CAGATGTGAC TTAGATATC CCCCAGCCTA
AAGTTTACTT ATTGACCTGC GATTGAGCAA TCGGGAGAGC TTCATCTCCT GGGCCACTGG
GCATTCTCGA ACGTGGGCCG GTTGTTCGC ATTGCTCGGG GAGAAGTTCC GTGGCTGGAA
GCTGGGACAG TTCAGAATCA GATGGAGTCT TGGGCATTTC ATAGAGAAAA ATCTGTATGT
CTCCTTACTT TCAAAATAGT CATTGACAA GCTGCACATG ATGGATCCAG AGTGTCGCAA
CCTGTGTGGT CAGGGAGTG CTGTGGGCTG GGGGAGGGG GAGAGTCTCT CTTGTGTAAC
GAGTTATTAG AGCAGAGGAG TGAGGTGGGG CATCGCTGGG GGTATGGTCT TGATCTTTAA
GGGGGTGGGA TTTCATGGAG AACCTGACTG GAGGAAGGAG TCTGCTCAGG GAGGAAGGGA
ATGAGAATCA CTGGGAATGG GGACCTTATG GAGGACCTCA ATGGCTGGGA AGAGGCTCAA
CTTAGTAAGA AGTAGGGATT CATGGCTGGT TCTATAGCAG AGGCATCTGG AGAAGGGAAC
AAGTCCAGGA GACAAACCCG CAGGTTTGGC AGCCACCTGG GCACAAGAAG TAAGGGCTTA
GCGAGGATGA GTTGGGAAGG AGAAAGGAGG TACCAAAGGA ACAAACCTCC ATGCTTGTGG
GAAAGGCCAG GGTTCGAGA GCTGACATCT CCCCCGCTGA GCAGTTGCTC TCCCCTTCCT
CCTGCACAGC AGTTGGTTTC TTCCAAGCAG AGGGTCACTG GTTTGACTTC ATCCATGGGC
TCCACCCTTT TTGACTTGA TGCAAGATGG ACCAGACCAG GTTGATCTAC GCATCAGACA
CCACCAGTTT TCGTACCAG GATCAACGAC AGTCCTATAC GACTAGATC CCACAGAGCC
TCATC
```

شکل ۲- کانتینگ توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در شتر بلوچی استان سیستان و بلوچستان

Figure 2- The contig of nucleotide sequences of Leptin gene in Baluchi camel in Sistan and Baluchistan province

مناطق خشک و گرمسیری پرورش می‌یابند و تغییرات تکاملی به نحوی سوق پیدا کرده است تا بتوانند با محیط سازگار و نقش بیولوژیک خود که تنظیم هموستازی انرژی است را داشته باشند. همچنین، تشابه زیادی در جایگاه ژن لپتین در بین گونه‌های گاو و بوفالو مشاهده گردید. در گروه ششم که متعلق به پستانداران دریایی است، تقسیم‌بندی زیر شاخه‌ای صورت گرفته است، به طوری که قرابت ژنی بین گونه‌های دلفین و همچنین بین گونه‌های خوک آبی، بالا بودند. قرابت ژنی درون گروهی برای سایر گروه‌ها نیز بالا هستند. محققین قرابت ژنی بالای درون گونه‌های گاو و بوفالو و همچنین گوسفند و بز گزارش کرده‌اند (۲). همچنین، نتایج این تحقیق مشابه با نتایج بررسی فیلوژنی بر روی پستانداران بود (۶). هرچند نتایج آنالیز فیلوژنی زمان دقیق انشعاب گونه‌ها را نمایش نداد، اما واضح است که زمان شروع تمایز و تغییرات تکاملی در گونه‌های پستانداران کوچک مانند گوسفند و بز، پستانداران بزرگ مانند گاو و بوفالو و نهایتاً گونه‌های شتر مربوط به دوره‌های زمانی خیلی دور است. بدین نحو شکل ۳ سه خوشه‌بندی اصلی پیکره ژن لپتین را در گونه‌های

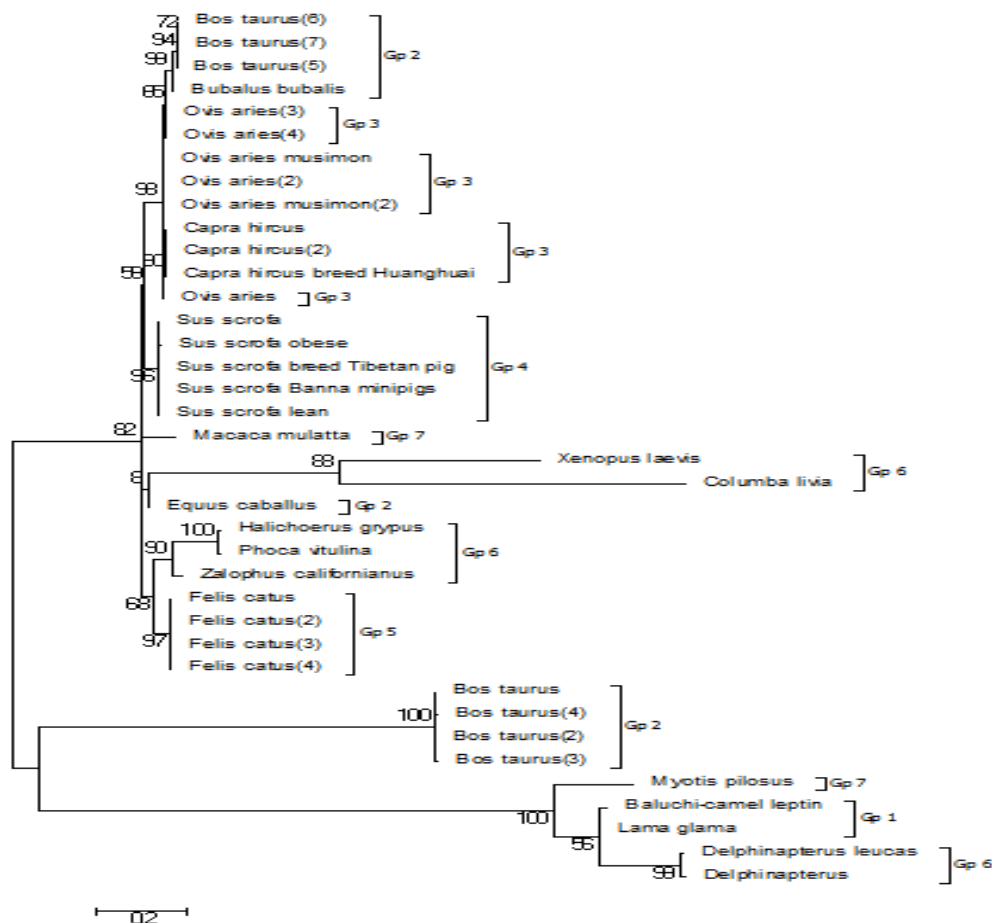
درخت فیلوژنتیک روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن لپتین را در موجودات مختلف نشان می‌دهد (شکل ۳). مقادیر Bootstrapping بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی مورد استفاده از درجه اعتماد بالایی برخوردار است. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، توالی نوکلئوتیدی این ژن در گونه‌های مورد بررسی بر اساس روابط تکاملی به هفت گروه یا شاخه تقسیم شده‌اند. دسته اول مربوط به توالی ژن لپتین در شتر، دسته دوم و سوم به ترتیب مربوط به (گاو، بوفالو) و (بز، گوسفند) هستند. همچنین، در دسته چهارم و پنجم نیز خوک و گربه قرار گرفته‌اند و نهایتاً دسته ششم و هفتم به ترتیب متعلق به گونه‌های پستانداران دریایی (خوک آبی، خوک آبی خاکستری و شیردریایی) و خفاش هستند.

تجزیه روابط تکاملی ژن لپتین نشان داد که بیشترین قرابت در جایگاه ژن لپتین شتر بلوچی با شتر لاما است که با احتمالاً دارای اجداد مشترکی بوده‌اند و یا مربوط به شرایط نگهداری آنها است که در

پستانداران نمایش می‌دهد.

تعداد کل جهش‌هایی که در طی تکامل جایگاه ژن لپتین رخ داده است برابر ۵۹۱ جهش شناسایی شد که توزیع آنها در طول ژنوم متفاوت بودند. تعداد جایگاه‌های چندشکل ۳۰۹ جایگاه در بین گونه‌های مختلف بودند. نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت شده نشان داد، که بخش کوچکی از توالی ژن لپتین در طی روند تکامل حفظ شده است که این امر نشان‌دهنده چندشکلی بالای این ژن و مستعد بودن آن به تغییرات نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید آن

جهت سازگاری با شرایط مختلف یا هموستازی می‌گردد. تفرق ژنتیکی مجموع کل ویژگی‌های ژنتیکی یک گونه است و به‌عنوان راه‌حلی در جهت سازگاری با تغییرات محیطی شناخته شده است. به عبارت دیگر بیانگر تعدادی از افراد یک جمعیت است که دارای آللهایی هستند که منطبق با شرایط محیطی می‌باشند و این افراد بیشترین احتمال برای زنده‌مانی و شرکت در ایجاد نسل بعدی را دارند. برآوردها نشان داد که درصد تفرق بین گونه‌ها بر اساس روش آماری حداکثر درستی (ML) و نسبت جایگزینی کل، برابر با ۱/۵۸ محاسبه شد و درصد تنوع نوکلئوتیدی ۹۰ درصد بود.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی ژن لپتین در گونه‌های مورد بررسی (۰/۲ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه)

Figure 3- Phylogenetic tree for nucleotide sequences of Leptin gene in the studied species (0.2 nucleotide rate substitutions per site)

انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل ژن‌ها نشان می‌دهد (۱۲). مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) در مطالعه حاضر بر ژن لپتین برابر ۰/۷۶ محاسبه شد (جدول ۲). روند انتخاب خالص در طی تکامل برای ژن لپتین در شتر و سایر گونه‌ها را نشان می‌دهد.

یکی دیگر از شاخص‌های روند تکاملی گونه‌ها، نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S) است که به‌عنوان یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها استفاده می‌گردد (۱۹)، اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد

جدول ۲- پارامترهای تعیین روند انتخاب طبیعی در جایگاه ژن لپتین در گونه شتر با سایر گونه‌ها

Table 2- Parameters of determining of natural selection process in the leptin gene in camel and other species

پارامتر* (Parameter)	مقدار عددی (Value)	انحراف استاندارد (Standard error)
d_N	0.65	0.077
d_S	0.94	0.089
d_N/d_S	0.69	0.083

* تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N)، تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، مقدار عددی (d_N/d_S) نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی. Nucleotide changes that alter amino acids (d_N), nucleotide changes that have not had an effect on the amino acid (d_S), the numerical value (d_N/d_S) represents the natural selection process.

جدول ۳- درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در گونه‌های مورد بررسی بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی

Table 3- The percentage of substitution nucleotides of Leptin gene in the studied species based on maximum likelihood method

نوکلئوتید ^۱ (Nucleotide)	A	T/U	C	G
A	-	3.55	5.60	18.54
T	4.27	-	17.91	5.58
C	4.27	11.36	-	5.54
G	14.19	3.55	5.60	-

^۱ درصد جانشینی بازها از یک ردیف به ستون را نشان می‌دهد. اعداد خارج قطر نشان‌دهنده جانشینی تقاطعی (ای/تایک) و اعداد روی قطر درصد جانشینی انتقالی (بولد) هستند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). Rates of different transversionsal substitutions are shown in *italics* and those of transitional substitutions are shown in **bold**

به عدم تطابق در جفت شدن بازها می‌گردد. این عدم تطابق شناسایی شده و توسط فرآیندهای سلولی اصلاح شده که در نهایت منجر به تبدیل آلی به آل دیگر خواهد شد. تبدیل ژنی یک فرآیند اساسی ژنتیکی در تفرق و جدایی گونه‌هاست که به‌عنوان شبکه‌ی اتصال‌دهنده بین توالی‌های DNA در بین افراد یک گونه عمل می‌کند که این شبکه منجر به یکسان‌سازی، انسجام و یکپارچگی توالی DNA در بین گونه‌ها می‌شود (۱۷). در این تحقیق، براساس آنالیز صورت گرفته جهت شناسایی نواحی که در آن‌ها تبدیل صورت گرفته، نه ناحیه در بین توالی‌ها شناسایی شدند که در آنها تبدیل ژنی رخ داده است (جدول ۴).

نتیجه‌گیری کلی

درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در بین گونه‌های مختلف به دو شاخه اصلی شامل شتر و نشخوارکنندگان بزرگ مانند گاو و شاخه دیگر نشخوارکنندگان کوچک گوسفند و بز و برخی گونه‌های تک معده‌ای تقسیم شدند. البته شاخه اصلی نشخوارکنندگان کوچک به ۵ شاخه کوچکتر تقسیم شدند. توالی ژن لپتین شتر بلوچی بیشترین شباهت را با شتر لاما داشت که احتمالاً به‌واسطه اجداد اولیه یا نتیجه انتخاب طبیعی جهت سازگاری با شرایط محیطی گرم و خشک است که این دو جمعیت نگهداری می‌شوند. بخش حفاظت شده ناحیه مورد مطالعه در جایگاه ژن لپتین در بین

نتایج حاصل از درصد انواع جابه‌جایی‌های انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در جدول ۳ آورده شده است. مقادیر بالای جانشینی مربوط به بازهای پورینی است، به طوری که این مقدار برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین برابر ۱۸/۵۴ و ۱۴/۱۹ درصد محاسبه گردید. این مقادیر برای بازهای پیریمیدینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۷/۹۱ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین برابر ۱/۳۶ درصد بودند. همچنین، نسبت جایگزینی بازهای پیریمیدینی به پورینی و پورینی به پیریمیدینی نیز ۱/۵۸ درصد محاسبه شد که نشان‌دهنده بیشتر بودن جهش‌های انتقالی نسبت به جهش‌های تقاطعی است. بر اساس مطالعه انجام شده بر روی توالی ژن لپتین موش نرخ جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدی برای بازهای پیریمیدینی بیشتر از پورینی گزارش شده است (۲). علت اختلاف در این نتایج را می‌توان به توالی‌های متفاوت جایگاه ژن و اختلاف روند تکاملی این ژن در موش و شتر دانست.

تبدیل ژنی^۱ فرآیندی است که طی آن یک توالی DNA جایگزین توالی همولوگ آن می‌شود. این فرآیند می‌تواند به صورت آلی، به این معنی که یک آلل جایگزین یک آلل دیگر از همان ژن شود و یا به این صورت که یک توالی پارالوگ DNA تبدیل به دیگری شود، نیز تعریف می‌شود. تبدیل ژنی آلی در طی میوز رخ می‌دهد که در طی آن نوترکیبی بین مکان‌های هتروزیگوسیتی منجر

محیطی متفاوت است. همچنین روند انتخاب طبیعی جایگاه ژن لپتین برابر با ۰/۷۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده روند تکاملی مجزا این جایگاه ژنی در گونه‌های مختلف است.

گونه‌های مختلف تنها بخش بسیار کوچکی از کل توالی‌ها را تشکیل داد که نشان‌دهنده چندشکلی بالای این جایگاه و مستعد بودن به انواع تغییرات نوکلئوتیدی و جهش است که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید آن جهت سازگاری با شرایط

جدول ۴- نواحی تبدیل ژنی و احتمال وقوع آنها در جایگاه ژن لپتین گونه‌های مختلف حیوانی

Table 4- Gene conversion regions of the leptin gene in different species

ناحیه تبدیل ژنی (Gene conversion regions)	طول قطعه ناحیه تبدیل (bp) (Length of conversion region)	میانگین (Psi) (Average)
Baluchi-camel (1-241)	147	0.12
(113-271) Baluchi-camel	180	0.13
151-380) (Baluchi-camel	241	0.13
181-342) (Lama_glama	271	0.13
242-373) (Lama_glama	308	0.13
(272-405) Lama_glama	342	0.13
Bos_taurus (309-436)	373	0.12
Equus_caballus (343-467)	405	0.14
(374-495) Macaca_mulatta	436	0.13

منابع

- Ahima, R. S. 2005. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 16: 307-313.
- Ahmadpanah, J. 2014. Phylogenetic Analysis and Molecular Evolution of the Leptin Gene. *Research on Animal Production*, 7: 208-213.
- Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, and M. J. Lewin. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394:790-793.
- Caro, J. R., M. K. Sinha, J. W. Kolaczynski, P. L. Zhang, and R.V. Considine. 1996. Leptin: The tale of an obese gene. *Diabetes*, 45:455-1462.
- Chehab, F. F. 2000. Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharmacology Science*, 21:309-314.
- Doyon, C., G. Drouin, V. L. Trudeau, and T. W. Moon. 2001. Molecular Evolution of Leptin. *General and Comparative Endocrinology*, 124:188-1.
- Dridi, S., N. Raver, E. E. Gussakovsky, M. Derouet, M. Picard, A. Gertler, and M. Taouis. 2000. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *Journal of Physiology*, 279:116-123.
- Frederich, R. C., A. A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine Journal*, 1:1311-1314.
- Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn, and J. G. Mercer. 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 94: 11073-11078.
- Jin, L., B. G. Burguera, M. E. Couce, B. W. Scheithauer, J. Lamsan, N. L. Eberhardt, E. Kulig, and R. V. Lloyd. 1999. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: Evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 2903-2911.
- Korber, B. 2000. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DNASP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, and K. Nakao. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine Journal*, 3:1029-1033.
- Nasaj Hossain., M. and M. Shamsbakhsh. 2010. Method of Phylogenetic Analysis. *Haghsenas Press*. 239p (In

- Persian).
16. Papiz, M. Z., L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C. T. North, J. B. C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T. A. Jones, M. E. Newcomer, and P. J. Kraulis. 1986. The structure of p-lactoglobulin and its similarity to retinol-binding protein, *Nature*, 324: 383-385.
17. Senaris, R., T. Garcia-Caballero, X. Casabiell, R. Gallego, R. Castro, R. V. Considine, C. Dieguez, and F. F. Casanueva. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, 138:4501-4504.
18. Singh, V. K., A. K. Mangalam, S. Dwivedi, and S. Naik. 1998. Primer Premier: Program for design of degenerate primers from a protein sequence. *BioTechniques*, 24: 318-319.
19. Sobhani, I., A. Bado, C. Vissuzaine, M. Buyse, S. Kermorgant, J.P. Laigneau, S. Attoub, T. Lehy, D. Henin, M. Mignon, and M. J. Lewin. 2000. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, 47:178-183.
20. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
21. Tavaría, M., T. Gabriele, I. Kola and R.L. Anderson. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell stress and chaperones*, 1: 23-28.
22. Techenmacher, H. and Koch, G. Opioids in the milk, *Endocrine Reg.*, 1991. 25: 147-150.



Nucleotide Sequence Analysis of Phylogenetic and Evolutionary Status of Leptin Gene in Camel

M. Piri¹ - Gh. R. Dashab^{2*} - B. Asghari³

Received: 28-01-2017

Accepted: 16-12-2017

Introduction: Leptin is a pleiotropic protein best known for regulation of appetite and fat storage in mammals. While many leptin orthologs have been identified among vertebrates, an authentic leptin in birds has remained elusive and controversial. Leptin, the ob gene product, is a 167 amino acid polypeptide known to play a major role in regulating the fat stores of the body and is found in all eukaryotes, including mammals and in invertebrates. In mammals, leptin functions as an adiposity signal: circulating leptin fluctuates in proportion to fat mass, and it acts on the hypothalamus to suppress food intake. However, little is known about the molecular evolution of the leptin sequence gene. Therefore, the aim of this study, we conducted an analysis of the evolutionary and phylogenetic of the mammalian's Leptin nucleotide sequences in native camel of Sistan and Baluchistan province and compare with other species in NCBI gene bank.

Materials and methods: In this study, blood samples were collected from 50 camels, randomly from two stock of Sistan and Baluchistan province. DNA is extracted from whole blood with phenol-chloroform method. PCR amplification of 2000 bp from of partial ob gene including intron2 and exon3 of Leptin gene was performed using one pairs of special primers. PCR product was digested with endonuclease *AsuHpi* enzyme and purified on the agarose gel. Then, the sequencing of the digestion products was performed by the Sanger method. Data sequence for other species was achieved and aligned by searching its genome database (NCBI). The nucleotide substitution rate of the sequences (transition and transversion substitution rate) and molecular evolution (including polymorphism site, conservation site and gene conversion) of the Leptin were calculated by maximum likelihood and neighbor-joining (NJ) method respectively and phylogenetic tree was based on nucleotide sequences constructed. Evolutionary and phylogenetic tree analysis was performed by using MEGA6 and DnaSP v5 software's. Finally, a fundamental measure of the relative importance of selection and genetic drift in causing amino-acid substitutions is the d_N/d_S ratio. In this study was calculated with online package HIV_SNAP v2.1.1.

Results and Discussion: Results of alignment of DNA sequencing of two populations of camel in Sistan and Baluchistan showed 99% similarity, but diversity showed distinct from other mammalian species. The results showed that the transitional substitution was more than transversional substitution and ratio these was 1.58. Totally, there were 591 mutations including insert, deletion and polymorphism sites at the DNA level of leptin gene (ob gene) in different species but sequence alignment of the Leptin gene fragment revealed only 309 polymorphic sites and conservation area of ob gene was very small. Evolutionary pressures on proteins are often quantified by the ratio of substitution rates at non-synonymous and synonymous sites. The d_N/d_S ratio was originally developed for application to distantly diverged sequences, the differences among which represent substitutions that have fixed along independent lineages. Nevertheless, the d_N/d_S measure is often applied to sequences sampled from a single population, the differences among which represent segregating polymorphisms. The d_N/d_S ratio of the Leptin sequences in this study (0.76) indicated that negative selection was accrued during evolution. Phylogenetic tree for the leptin gene in different organisms show that seven categories in the mammals such as camel, cows and buffalo, sheep and goat, pork's, bats, cats and marine. Phylogenetic analysis of leptin gene using Neighbor-Joining method showed that Baluchi camel population in this study has the highest similarity with Lama among the Camelidae family.

Conclusion: Phylogenetic analysis of DNA sequence has played an important role in the study on evolution of life. However, recent researches suggest in some cases phylogenetic trees based on the analyses of DNA sequences may be misleading and that based on trees protein-based trees from amino acid sequences may be more reliable. Similarities of between the two populations of Baluchi camel in this study showed that common

1- MSc of Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Assistant Professor of Genetic and Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Ph.D Student of Animal breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

(*- Corresponding author email: dashab@uoz.ac.ir)

ancestry and genetic similarity. Mutations and natural selection resulted in the development of new varieties, new proteins and also stabilizes their performance during the evolution and advance progress toward their performance has been purified. According to this study, protected areas make up a small part of leptin gene sequence insures that this reflects the polymorphism of this gene as well as being susceptible to variations and mutations, respectively. The results of d_N/d_S suggested that evolution in camel is different of other species.

Keywords: Evolution, Leptin, Native camel, Natural selection, Phylogeny

اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

صدیقه محمدی^{۱*} - مرتضی ممویی^۲ - صالح طباطبایی وکیلی^۳ - جمال فیاضی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر افزودن سطوح متفاوت ملاتونین (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول بر میلی‌لیتر) به رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی منی قوچ عربی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی بود. این تحقیق در پاییز ۱۳۹۴ در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انجام گرفت. نمونه‌های منی توسط دستگاه الکترواکولتور از ۶ رأس قوچ با متوسط وزن 73 ± 3 کیلوگرم، هفته‌ای دو بار جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی از نظر تحرک با کمک سامانه آنالیز رایانه‌ای اسپرم (CASA) اندازه‌گیری شد. pH، درصد اسپرم‌های زنده و ناهنجار، سلامت غشا و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام نیز بعد از فرآیند یخ‌گشایی اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که رقیق‌کننده‌ی حاوی سطح ۰/۵ میلی‌مول ملاتونین در مقایسه با گروه شاهد موجب بهبود میزان تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ عربی شد. بیشترین مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی در سطح ۱ میلی‌مولار ملاتونین مشاهده شد. اثر ملاتونین بر روی pH منی در همه سطوح اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد. به‌طور کلی افزودن سطح ۰/۵ میلی‌مول بر میلی‌لیتر ملاتونین به رقیق‌کننده تریس موجب بهبود اغلب فراسنجه‌های کیفی اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسمای منی پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی در قوچ عربی شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، توان آنتی‌اکسیدانی تام، تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا

مقدمه

به منظور حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض ذخایر ژنتیکی ارزشمند، لازم است که بخشی از تحقیقات در زمینه روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد، بنابراین بهبود روش‌های نگهداری اسپرم در جهت نیل به این اهداف از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۶). با پیشرفت تلقیح مصنوعی، منی برای حداکثر تعداد دوزها از یک انزال رقیق می‌شود، این رقیق‌سازی باعث کاهش غلظت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی

اسپرم شده و در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند. انجماد اسپرم شامل مراحل رقیق‌سازی، سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی اسپرم است که هر کدام از این مراحل می‌توانند ساختار غشای پلاسمایی اسپرم و به تبع آن عملکرد اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند و منجر به کاهش باروری اسپرم شوند. وقتی اسپرم طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرد، شرایط برای تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS^5) افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق‌شده شرایط را آسیب‌پذیرتر می‌نماید (۱۷). در طول فرآیند انجماد-یخ‌گشایی منی، تنش‌های فیزیکی و شیمیایی در غشای اسپرم به‌وجود آمده و موجب کاهش کیفیت، زنده‌مانی، تحرک و قدرت باروری اسپرم می‌شود. این آسیب‌ها با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد ROS و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم همراه است (۱۰). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در هنگام رقیق‌سازی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشند (۳۵).

در واقع جلوگیری از تولید ROS اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها بر علیه آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. در مقابل این آسیب‌های

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲- استاد فیزیولوژی تولید مثل، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۳- دانشیار فیزیولوژی تولید مثل و مامایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۴- دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(*- نویسنده مسئول: Email: Sedighemohamadi70@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.61116

۰/۹۳ گرم فروکتوز، ۰/۰۵ گرم جنتامایسین، ۱۵ درصد زرده تخم مرغ و ۵ درصد گلیسرول در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر) بود، استفاده شد (۱۶). تیمارهای آزمایشی حاوی چهار سطح ملاتونین (M-5250، وزن مولکولی ۲۳۲/۳ شرکت سیگما آلدريج) ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی مول بودند. رقیق کننده فاقد ملاتونین نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن غلظت های (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی مول) به ترتیب ۰/۱۱۵، ۰/۲۳۲، ۰/۴۶۴ و ۰/۹۲۸ میلی گرم پودر ملاتونین را در ۰/۰۴ میلی لیتر اتانول حل و سپس سدیم سیترات ۳ درصد به محلول ها اضافه شد.

روش انجماد

پس از رقیق سازی نمونه های آزمایشی در پایوت های ۰/۵ میلی لیتری بسته بندی شد، داخل هر پایوت از نظر حجمی ۴۰۰ میلیون اسپرم کشیده شد. پایوت ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی گراد به منظور گذراندن دوره تعادل قبل از انجماد قرار داده شد. سپس پایوت ها در فاصله ۴ سانتی متری از سطح ازت مایع به مدت ۱۵ دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفته و در نهایت در ازت مایع با دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی گراد غوطه ور شدند. بعد از دو هفته پایوت ها یخ گشایی و مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۷).

یخ گشایی

برای یخ گشایی اسپرم پس از خارج کردن پایوت های حاوی اسپرم از ازت، به مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۱۷).

تحرك اسپرم پس از یخ گشایی

پس از یخ گشایی اسپرم، یک قطره از آن زیر میکروسکوپ نوری متصل به مانیتور و برنامه CASA مشاهده شد. مدل نرم افزار مورد استفاده در این مطالعه HFTCASA:6.50 (Computer Aided Semen Analysis) بود.

یکپارچگی غشای اسپرم

یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم با استفاده از آزمون تورم هیپوسموتیک تعیین شد. محلول هیپوسموتیک با حل کردن ۰/۷۳۵ گرم تری سدیم سیترات دی هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر آماده شد. برای این آزمایش ابتدا ۵۰ میکرو لیتر از هر نمونه اسپرم یخ گشایی شده در ۵۰۰ میکرو لیتر محلول مخلوط شده و برای ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس یک قطره از محلول را برداشته و گسترش تهیه شد. گسترش ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم

اکسیداتیوی، پلاسمای مایع منی دارای یک منبع از آنتی اکسیدان های آنزیمی می باشد (۲). آنتی اکسیدان ها موادی هستند که باعث کاهش سرعت اکسیداسیون و حفظ سلول از آسیب های شدید اکسیده شدن می شوند (۳۴). اولین بار مک لود حضور آنتی اکسیدان ها را در اسپرم گزارش کرد (۲۰). گلو تاتیون، گلو تاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، ویتامین C و ویتامین E آنتی اکسیدان های طبیعی در مایع منی پستانداران هستند که در مقابل ROS برای محافظت از پراکسیداسیون لیپید های غشای اسپرم حضور دارند (۳). سطوح آنتی اکسیدانی در طول فرآیند رقیق سازی و تولید بیش از حد ROS کاهش می یابد (۴). سیستم های آنتی اکسیدانی طبیعی و مصنوعی به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی در مایع منی توصیه شده است (۲۹). بنابراین استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی یا مصنوعی در مایع منی می تواند تأثیر استرس اکسیداتیو در طول فرآیند ذخیره سازی اسپرم را کاهش دهد و در نتیجه منجر به بهبود کیفیت مایع منی شود (۲۳). ملاتونین یا ۵-متوکسی-ان-استیل تریپتامین^۱ هورمونی است که در غده صنوبری، اندامی کاج مانند در اعماق مغز ساخته می شود. این هورمون نخستین بار در سال ۱۹۵۸ توسط کومر کشف شد. در تعدادی از مطالعات بر خصوصیات آنتی اکسیدانی ملاتونین تأکید شده است (۱۸). ملاتونین همچنین قادر به تحریک فعالیت آنزیم های دخیل در متابولیسم ROS و حفظ سیالیت غشای اسپرم می باشد (۲۵). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان در منی منجمد شده قوچ عربی بود.

مواد و روش ها

تهیه نمونه و فراوری آن

نمونه های منی از ۶ رأس قوچ عربی بالغ با وزن متوسط 73 ± 3 با تحریک الکتریکی به وسیله دستگاه شوک الکتریکی (Ogawa Seiki Co Ltd)، در فصل تولید مثلی پاییز ۹۴ (اوایل مهر تا پایان آذر) در ایستگاه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، جمع آوری شدند. پس از بررسی فراسنجه های تحرک، مورفولوژی و غلظت نمونه های استحصالی، نمونه های با تحرک کمتر از ۷۵ درصد و غلظت کمتر از $2/5 \times 10^9$ اسپرم در میلی لیتر حذف شدند و بقیه نمونه ها به منظور از بین بردن اثر فردی دام از آزمایش، با هم مخلوط و در رقیق کننده های آماده شده در ۳۷ درجه سانتی گراد رقیق شدند. رقیق سازی با نسبت ۱ به ۴ (یک قسمت منی و یک قسمت رقیق کننده) انجام گرفت. برای تهیه رقیق کننده، از پروتوکل که شامل (۳/۲۸۵ گرم تریس، ۱/۸۷۰ گرم سیتریک اسید،

شمارش شد و درصد اسپرم با دم پیچ خورده که نشان از سلامت غشای اسپرم است تعیین شد (۱).

رنگ‌آمیزی حیاتی

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی اتوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ اتوزین (۱۶/۷ گرم بر لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰ گرم بر لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم بر لیتر) می‌باشد. اساس این رنگ‌آمیزی بدین صورت می‌باشد که رنگ به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ پیدا می‌کند درحالی که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای این رنگ‌آمیزی، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم برداشته شد و روی لام قرار گرفت و ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده به آن اضافه گردید. بعد از مخلوط شدن نمونه با رنگ، گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن گسترش لام زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $1000 \times$ قرار داده شد و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و بدین صورت درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد (۱۲).

سنجش توان آنتی اکسیدانی تام

در تحقیق حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی تام پلاسمای منی به روش (FRAP^۱) اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر مبنای توانایی آنتی اکسیدان‌های مایع منی در احیاء یون فریک به یون فرو است که نشان‌دهنده فعالیت آنتی اکسیدان‌های تام می‌باشد. آزمایش FRAP با استفاده از روش Benzie و Strain قدرت آنتی اکسیدانی مایع منی اندازه‌گیری و نتایج به صورت میکرومولار یون فریک در هر لیتر مایع منی بیان شد (۸).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از مدل خطی GLM نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل و اختلاف میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای Duncan برای سطح معنی‌داری ۵ درصد مقایسه شدند. میانگین حاصل از پنج تکرار به صورت $\pm$ SEM گزارش شد.

نتایج و بحث

اثر افزودن سطوح مختلف ملاتونین به منی رقیق‌شده بعد از انجماد- یخ‌گشایی در جدول ۱ بیان شده‌اند. تمامی غلظت‌های ملاتونین به طور معنی‌داری موجب افزایش سلامت غشا، درصد تحرک پیش‌رونده سریع، درصد تحرک پیش‌رونده کند و کاهش

ناهنجاری‌های شکلی اسپرم نسبت به گروه شاهد شدند ($P < 0.05$). بیشترین بهبود در فراسنجه‌های تحرک کل، تحرک غیرپیش‌رونده، تحرک پیش‌رونده سریع و کند به وسیله تیمار ۰/۵ میلی‌مولار و کمترین مقدار فراسنجه‌های فوق به وسیله تیمار ۴ میلی‌مولار ایجاد شد ($P < 0.05$). تمامی سطوح ملاتونین با اختلاف معنی‌داری توانستند حرکت پیش‌رونده آهسته را نسبت به گروه شاهد افزایش دهند ($P < 0.05$).

تمام غلظت‌های ملاتونین با اختلاف معنی‌داری توانستند حرکت پیش‌رونده آهسته را نسبت به گروه شاهد بهبود دهند ($P < 0.05$). بیشترین توان آنتی اکسیدانی تام نیز در تیمار سوم و با افزودن غلظت ۱ میلی‌مولار به دست آمد ($P < 0.05$). بین هیچ‌کدام از گروه‌های آزمایشی و تیمار در مورد pH منی اختلاف معنی‌داری یافت نشد ($P > 0.05$).

طبق جدول ۱ با افزودن ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین در منی رقیق‌شده فراسنجه‌های سرعت در مسیر مستقیم و خطی بودن مسیر حرکت اسپرم به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های آزمایشی بهبود یافتند ($P < 0.05$). نتایج نشان می‌دهند که افزایش غلظت ملاتونین بالاتر از ۲ میلی‌مولار موجب کاهش خطی بودن مسیر حرکت اسپرم می‌شود ($P < 0.05$). بیشترین افزایش در سرعت اسپرم در مسیر منحنی به وسیله تیمار سوم و سطح ۱ میلی‌مولار ملاتونین ایجاد شد ($P < 0.05$).

در این مطالعه تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف ملاتونین به رقیق‌کننده تریس- سیترات زرده تخم مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت. ارتباط معنی‌داری بین افزودن ملاتونین و بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مشاهده شد ($P < 0.05$). در این مطالعه غلظت ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین به طور معنی‌داری باعث افزایش تحرک کلی اسپرم در مقایسه با سایر غلظت‌ها و گروه شاهد شد ($P < 0.05$). نتایج متفاوتی در زمینه تأثیر ملاتونین بر تحرک اسپرم بیان شده است. سلول‌های اسپرم دارای گیرنده‌هایی برای ملاتونین است (۳۲).

ملاتونین در برخی پژوهش‌ها باعث کاهش تحرک اسپرم شده است (۷، ۱۳، ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۳۲). در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین افزودن ملاتونین و بهبود فراسنجه‌های حرکتی اسپرم مشاهده شد که هم جهت با مطالعات پژوهش‌گران مختلف می‌باشد (۱۱، ۲۴ و ۲۷). تفاوت اثر ملاتونین بر تحرک اسپرم وابسته به روش استفاده (درون تنی و برون تنی)، مقدار، مدت مجاورت اسپرم با ملاتونین، تأثیرات ناشناخته ترکیبات پلاسمای منی بر عملکرد ملاتونین، تفاوت در کمیت و کیفیت اولیه نمونه‌های منی و حتی تفاوت بین گونه‌ای و مدت نگهداری برون تنی منی نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد (۱).

جدول ۱- تأثیر افزودن غلظت‌های مختلف ملاتونین به منی قوچ عربی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم، توان آنتی‌اکسیدانی تام و pH منی بعد از انجماد-یخ‌گشایی (بر حسب میلی‌مولار بر میلی‌لیتر)

Table 1- Effect of different concentrations of melatonin in Arabic ram semen on sperm quality parameters, total antioxidant capacity and pH of semen after freezing-thawing (mM/mL)

فراسنجه‌های اسپرم Parameters	غلظت ملاتونین Melatonin concentration				
	0	0.5	1	2	4
تحرک کل Total motility (%)	53.35±0.9 ^c	69.67±0.55 ^a	62.28±0.01 ^b	62.61±0.3 ^b	52.13±0.34 ^c
تحرک پیش‌رونده سریع Progressive motility (%)	8.74±0.39 ^b	16.29±0.48 ^a	9.28±0.01 ^b	8.60±0.32 ^b	7.07±0.01 ^c
تحرک پیش‌رونده کند motility(%) Slow progressive	28.96±0.56 ^d	24.15±0.35 ^a	39.44±0.02 ^b	30.88±0.41 ^c	30.65±0.36 ^c
تحرک غیرپیش‌رونده motility(%) Non progressive	15.52±0.61 ^a	10.32±0.23 ^b	13.9±0.01 ^c	15.15±0.23 ^a	13.17±0.42 ^d
سرعت در مسیر منحنی Curvilinear Velocity (µm/s)	22.26±0.35 ^c	23.45±0.1 ^b	24.45±0.03 ^a	22.03±0.24 ^c	21.27±0.35 ^c
سرعت در مسیر مستقیم Straight Linear Velocity (µm/s)	8.38±0.17 ^{ab}	8.69±0.13 ^a	8.04±0.01 ^b	8.38±0.03 ^{ab}	8.56±0.15 ^a
خطی بودن مسیر حرکت اسپرم Linearity(%)	17.90±0.23 ^c	26.79±0.15 ^a	21.8±0.06 ^b	18.10±0.21 ^c	16.37±0.32 ^d
زنده‌مانی viability(%)	62.4±1.12 ^c	79±1.37 ^a	72±0.89 ^b	61.80±0.8 ^c	59±1.56 ^d
سلامت غشا Membrane integrity (%)	62±0.02 ^d	80±0.08 ^a	76.2±0.2 ^b	73±0.6 ^c	59±2.2 ^d
ناهنجاری‌های شکلی Abnormalities (%)	20±0.54 ^a	12.80±58 ^c	14±0.89 ^b	15±1.14 ^b	19.8±0.58 ^a
اسیدیته PH	6.96±0.05	7.04±0.09	6.96±0.1	6.92±0.61	6.84±0.06
توان آنتی‌اکسیدانی تام Total antioxidant capacity (µM/L)	715.6±21 ^c	1033±42.24 ^b	1209±66.82 ^a	730±17.64 ^c	745±18.42 ^c

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است (P< ۰/۰۵).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی و جاروب‌کنندگی ملاتونین بر روی رادیکال‌های آزاد، اندامک‌های داخل سلول را در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند. مکانیسم ۲) ملاتونین موجب افزایش فعالیت کمپلکس‌های ۱ و ۴ زنجیره انتقال الکترون شده و در نتیجه موجب بهبود تنفس میتوکندریایی و افزایش تولید ATP تحت شرایط طبیعی و استرس می‌شود. مکانیسم ۳) ملاتونین با کاهش مصرف اکسیژن، کاهش پتانسیل غشا و کاهش تولید آنیون سوپراکسید، میتوکندری را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند در حالی که میزان تولید ATP را حفظ می‌کند (۳۱).

برخلاف نتایج مطالعه ما، در مطالعه‌ای افزودن ملاتونین به اسپرم گاو در محیط مایع موجب کاهش تحرک پیش‌رونده اسپرم گردیده

افزایش تحرک اسپرم به اثرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در جلوگیری از پراکسیداسیون غشای اسپرم و کاهش تحرک آن نیز به کاهش ورود کلسیم به اسپرم به دلیل مهار تشکیل سیکلیک AMP (cAMP) به‌وسیله ملاتونین نسبت داده شده است، زیرا cAMP پیامبر داخل سلولی در تحرک اسپرم است؛ همچنین ملاتونین با اختلال در میکروتوبول‌ها نیز باعث کاهش تحرک سلول اسپرم می‌شود (۳۲). دلیل افزایش تحرک اسپرم به‌وسیله ملاتونین بدین جهت است که ملاتونین تولید ATP در سطح میتوکندری را افزایش می‌دهد (۱۴).

نقش محافظتی ملاتونین روی میتوکندری و به‌تبع آن روی تحرک اسپرم به‌وسیله چندین مکانیسم انجام می‌شود. مکانیسم ۱)

ما با این محققین شاید به دلیل تفاوت در روش استفاده ملاتونین می‌باشد. تأثیر ملاتونین بر نرمال شدن اسپرم شاید به دلیل اثرات تحریکی ملاتونین روی فعال‌سازی آنزیم‌های دربرگیرنده سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی باشد (۱۵). ملاتونین به واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی خود از بروز آسیب‌های ناشی از ROS به میتوکندری اسپرم جلوگیری می‌کند (۲۷). یکی از عواملی که می‌تواند موجب تخریب غشای پلاسمایی اسپرم گردد رادیکال‌های آزاد هستند، با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی ملاتونین بر اسپرم، ایجاد تعادل بین تولید و پاکسازی رادیکال‌های آزاد و کاهش قابل توجه آسیب‌های پراکسیداسیون غشای اسپرم، ملاتونین منجر به حفظ سلامت غشای اسپرم شده و از بروز ناهنجاری در آن جلوگیری می‌کند.

در این مطالعه تیمار ۱ میلی‌مولار ملاتونین موجب ایجاد بالاترین توان آنتی اکسیدانی مایع منی شد و در مقادیر بالای ۱ میلی‌مولار میزان Feric Reducing Ability of Plasma (TAC) کاهش یافت. در مطالعه‌ای با افزودن تاوورین به عنوان آنتی اکسیدان میزان آنتی اکسیدان‌های منی افزایش یافت و دوزهای بالای آنتی اکسیدانی باعث تخریب یکپارچگی آکسونوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم شد. دلیل کاهش میزان توان آنتی اکسیدانی منی به وسیله افزودن غلظت‌های بالای آنتی اکسیدان ملاتونین می‌تواند تخریب یکپارچگی آکسونوم و میتوکندری سلول‌های اسپرم باشد (۶). مصرف هورمون ملاتونین در هنگام انجماد اسپرم می‌تواند با اثرات نامطلوب فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بر فراسنجه‌های اسپرم مقابله کند و این اثرات محافظتی ملاتونین بر اسپرم به وسیله کاهش در لیپیدپراکسیداسیون به عنوان یک نتیجه از افزایش توان آنتی اکسیدانی تام مایع منی ایجاد می‌شود (۵).

تأثیرات سودمند ملاتونین را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که این هورمون یک آنتی اکسیدان قوی بوده و باعث می‌شود رادیکال‌های آزادی را که در فرآیندهای متابولیسمی تولید می‌شوند را خنثی و یا از بین ببرد. در کل سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار ملاتونین افزوده شده به منی رقیق‌شده در این پژوهش موجب کاهش در فراسنجه‌های اسپرم در مقایسه با سایر سطوح شده است، که بر این اساس استنباط می‌شود که افزودن بیش از اندازه این هورمون همانند سایر آنتی اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده باعث تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی اسپرم شده و امکان لیپیدپراکسیداسیون را فراهم می‌نماید. با توجه به نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد در pH منی مشاهده نشد که هم‌جهت با مطالعه پژوهش‌های پیشین است (۲۲). این نتیجه را می‌توان رقیق‌سازی مناسب منی و افزودن مقدار مناسب ملاتونین به اسپرم و نداشتن تأثیر منفی آن بر pH منی دانست.

(۳۲) و در مطالعه‌ای دیگر، موافق با نتیجه حاضر افزودن هورمون ملاتونین به اسپرم گاو و بررسی آن پس از یخ‌گشایی موجب افزایش در حرکت پیش‌رونده اسپرم شده است (۵) یک دلیل توجیه‌کننده این اختلاف‌ها می‌تواند روش استفاده و مقدار ملاتونین مصرفی باشد. ملاتونین و همچنین متابولیت‌های آن پاک‌کننده‌های مستقیم رادیکال آزاد و قادر به تنظیم رونویسی ژن برای آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌باشد. خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین به طور گسترده مطالعه شده است و استفاده از این ماده به عنوان یک محافظت‌کننده سلول و نیز یک عامل جلوگیری‌کننده از بیماری‌های بالقوه پیشنهاد شده است. ملاتونین به میزان زیادی در حمایت از سلول در مقابل استرس اکسیداتیو مؤثر است. ملاتونین مقدار رادیکال‌آزاد از جمله ROS را کاهش می‌دهد. ملاتونین همچنین مولکول‌های محافظت‌کننده سلول اسپرم در مقابل استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (۳۰).

نتایج نشان می‌دهد که افزودن هورمون ملاتونین در غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار به رقیق‌کننده اسپرم موجب افزایش زنده‌مانی اسپرم پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی آن نسبت به سطح شاهد شده است. در این مطالعه ما سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم شده و هم‌جهت با نتایج به دست آمده در مطالعه قبلی ما، در پژوهشی که ملاتونین به عنوان آنتی اکسیدان به اسپرم گاو افزوده شد نیز سطوح بالاتر از ۲ میلی‌مولار ملاتونین باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم نسبت به سایر سطوح شده است (۵). در همین راستا محققین بیان کرده‌اند که آنتی اکسیدان‌ها اگر به مقدار زیادتر از حد لازم استفاده شوند، به عنوان یک اکسیدان عمل کرده و آثار مخربی را بر جای می‌گذارند (۶). گزارش شده که افزودن ملاتونین در سطح ۱۰۰ میکرومولار به اسپرم محافظت شده از سرمای گاو میش در رقیق‌کننده‌های بایوکسل و تریس-سیترات زرده تخم مرغ، باعث افزایش ۵ درصدی زنده‌مانی نسبت به سطح شاهد شده است (۳۱). برخلاف مطالعه ما محققین گزارش کردند که ملاتونین موجود در منی هیچ تأثیر مثبتی بر کیفیت و زنده‌مانی اسپرم ندارد (۹) و اثر افزودن هورمون ملاتونین به صورت درون‌تنی و برون‌تنی بر زنده‌مانی اسپرم خروس پس از یخ‌گشایی نسبت به گروه شاهد بدون تأثیر گزارش شد (۲۲).

نتایج این مطالعه بیان می‌کنند که افزودن ملاتونین در همه سطوح به جز سطح ۴ میلی‌مولار به طور معنی‌داری باعث افزایش سلامت غشای اسپرم نسبت به سطح شاهد شدند. هم‌جهت با نتایج ما، افزودن ملاتونین به اسپرم گاو میش محافظت شده از سرما در لحظه رقیق‌سازی و ۶ ساعت بعد از آن توانست سلامت غشای اسپرم را نسبت به سطح شاهد به طور معنی‌داری بهبود دهد (۳۱). مخالف با نتایج این مطالعه، تزریق ملاتونین به صورت خارج فصل تولیدمثل به بزهای نر جوان بر روی تحرک اسپرم و اسپرم‌های غیرطبیعی و ناهنجار اثر معنی‌داری نداشت (۳۳). دلیل مخالف بودن نتایج مطالعه

جدول ۲- همبستگی بین غلظت ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام با فراسنجه‌های منی

Table 2- Correlation between semen melatonin and Total antioxidant capacity with semen parameters

پارامترها Parameters	غلظت ملاتونین Melatonin concentration	توان آنتی اکسیدانی تام Total antioxidant capacity
تحرک کل Total motility (%)	r= 0.316 P = 0.684	r = 0.615 p = 0.270
تحرک پیش‌رونده سریع Progressive motility (%)	r = -0.528 p = 0.360	r = 0.380 p = 0.620
تحرک پیش‌رونده کند motility (%) Slow progressive	r = 0.138 p = 0.827	r = 0.433 p = 0.467
تحرک غیرپیش‌رونده motility (%) Non progressive	r = -0.004 p = 0.995	r = -0.484 p = 0.405
سرعت در مسیر منحنی Curvilinear Velocity (µm/s)	r = -0.136 p = 0.864	r = 0.993 p = 0.007
سرعت در مسیر مستقیم Straight Linear Velocity (µm/s)	r = -0.233 p = 0.767	r = -0.329 p = 0.671
خطی بودن مسیر حرکت اسپرم Linearity (%)	r = -0.246 p = 0.754	r = 0.687 p = 0.313
زنده‌مانی viability (%)	r = -0.569 p = 0.317	r = 0.814 p = 0.094
سلامت غشا Membrane integrity (%)	r = -0.470 p = 0.424	r = 0.724 p = 0.164
ناهنجاری‌های شکلی Abnormalities (%)	r = -0.440 p = 0.560	r = -0.693 p = 0.307
اسیدیته PH	r = -0.870 p = 0.055	r = 0.455 p = 0.545
توان آنتی اکسیدانی تام Total antioxidant capacity (µM/L)	r = -0.342 p = 0.573	-
غلظت ملاتونین Melatonin concentration(mM/mL)	-	r = -0.342 p = 0.573

p=probability value
r=correlation

مطاعه دیگر نیز میزان ملاتونین پلاسمای منی و میزان آنتی اکسیدان درون‌زای پلاسمای منی در مردان نابارور اندازه‌گیری شد و همبستگی معنی‌داری بین این دو با هم و هر یک با فراسنجه‌های کمی و کیفی اسپرم یافت نشد. اما در مطالعات دیگری که در این زمینه انجام شد، ارتباط معنی‌داری بین سطوح ملاتونین و تحرک اسپرم یافت شد، بدین صورت که با کاهش سطوح ملاتونین تحرک اسپرم نیز کاهش پیدا می‌کند. مطالعات نشان داده که سطح سلول اسپرم حاوی گیرنده‌هایی برای ملاتونین می‌باشد و اثرات محافظت‌کنندگی ملاتونین بر اسپرم بستگی به واکنش بین ملاتونین و گیرنده‌های آن در سطح سلول اسپرم دارد، پس مقدار ملاتونین درون پلاسمای منی و همچنین تعداد گیرنده‌های آن در سطح سلول‌های اسپرم در محافظت اسپرم به‌وسیله این هورمون نقش دارند (۲۸).

طبق جدول ۲ چنین استنباط می‌شود که بین مقدار ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام منی با فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی و همچنین بین خود ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام پلاسمای منی هیچ همبستگی معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). از آنجایی که کیفیت اسپرم در باروری اسپرم تاثیر مثبتی دارد و پژوهش‌ها نشان داده که میزان ملاتونین و مقدار آنتی اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی باعث بهبود کیفیت اسپرم شده، از این جهت در این مطالعه همبستگی بین ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام منی با هر یک از فراسنجه‌های اسپرم سنجیده شد. نتایج مطالعه ما موافق با نتایج مطالعات پیشین همسو است که در این مطالعات پژوهشگران ملاتونین موجود در پلاسمای منی و همچنین در خون اندازه‌گیری کردند و ارتباط معنی‌داری بین آن و فراسنجه‌های اسپرم نیافتند، در

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که افزودن ملاتونین به منی قوچ عربی باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام پلاسمای منی قوچ عربی پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی شده، بیشترین بهبود در این فراسنجه‌ها، در سطح ۵/۰ میلی‌مولار ملاتونین حاصل شد و غلظت بالاتر از ۲ میلی‌مولار

ملاتونین باعث کاهش فراسنجه‌های اسپرم نسبت به گروه شاهد شد. بین مقدار ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام منی با فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی و همچنین بین خود ملاتونین و توان آنتی اکسیدانی تام پلاسمای منی همبستگی معنی‌داری وجود نداشت.

منابع

- 1- Adeel, M., A. Ijaz, M. Aleem, H. Rehman, M. S. Yousaf, and M. A. Jabbar. 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Journal of Theriogenology*, 71(8): 1220-1225.
- 2- Agarwal, A., and R. A. Saleh. 2002. Rol of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urolclin North AM*, 29(4): 817-27.
- 3- Akhter, S., A. B. Rakha, S. A. Ansari, H. A. Andrabi, and N. Ullah. 2011. Storage of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in skim milk extender supplemented with ascorbic acid and alpha Tocopherol. *Pakistan Journal of Zoology*, 43(2): 273-277.
- 4- Andrabi, S. M. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Journal of Reproduction in Domestic Animals*, 44(3): 552-569.
- 5- Ashrafi, I., H. Kohram, F. Farrokhi Ardabili. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Journal of Animal Reproduction Science*, 139 (1-4): 25-30.
- 6- Atessahin, A., E. Şahna, G. Turk, A. O. Çeribaşı, S. Yılmaz, A. Yuce, and O. Bulmuş. 2006. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of Pineal Research*, 41(1): 21-27.
- 7- Balo da Silva, C. M., B. Macias-Garcia, A. Miro-Moran, L. Gonzalez-Fernandez, A. Morillo-Rodriguez, C. Ortega-Ferrusola, J. M. Gallardo-Bolanos, G. Stilwell, J. A. Tapia, and F. J. Pena. 2011. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 51: 172-179.
- 8- Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Journal of Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-6.
- 9- Bornman, M. S., J. M. C. Oosthuizen, H. C. Barnard, G. W. Schulenburg, D. Boomker, and S. Reif. 1989. Melatonin and sperm motility/melatonin und spermatozoon motilität. *Journal of Andrology*, 21(5): 483-485.
- 10- Chatterjee, S., E. De Lamirande, and C. Gagnon. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Journal of Molecular Reproduction and Development*, 60(4): 498-506.
- 11- Du Plessis, S. S., K. Hagenaar, F. Lampiao. 2010. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Journal of Andrology*, 42(2):112-116.
- 12- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. *Artificial insemination of sheep and goat*. Sydney: Butterworths. pp 93-106.
- 13- Faigl, V., M. Keresztes, M. Kulcsar, S. Nagy, Z. Keresztes, G. Amiridis, L. Solti, G. Huszenicza, and S. Cseh. 2009. Testicular function and semen characteristics of Awassi rams treated with melatonin out of the breeding season. *Journal of Acta Veterinaria Hungarica*, 57(4): 531-540.
- 14- Garcia, J. J., R. J. Reiter, J. Pie, G. G. Ortiz, J. Cabrera, D. Sainz, and R. M. Acuna-Castroviejo. 1999. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 31(6): 609-616.
- 15- Gavella, M. and V. Lipovac. 2000. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 44: 23-27.
- 16- Hasanpur, S., M. Rustaei, and M. Mohammadi. 2014. Effect of L-gulutamin and gelisroll on ram semen after freezing-thawing. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 6(1):98-104. (In Persian)
- 17- Ijaz, A., A. Hussain, M. Aleem, M. S. Yousaf, and H. Rehman. 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Theriogenology*, 71(8): 1326-1329.
- 18- Juknat, A. A., V. Mende Mdel, A. Quaglino, C. I. Fameli, M. Mena, and M. L. Kotler. 2005. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *Journal of Pineal Research*, 38(2): 84-92.
- 19- Luboshitzky, R., A. Shen-Orr, L. Nave, S. Lavi, and P. Lavie. 2002. Melatonin administration alters semen quality

- in healthy men. *Andrology*. 23(4):572-583.
- 20- Macleod, J. 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology- Legacy content*, 138(3): 512-8.
- 21- Martin, D., F. J. Hidalgo, M. J. Baron, P. Bragado, A. Carmona, A. Robina, L. J. Garcia-Marin, and M. C. Gill. 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. *Journal of Theriogenology*, 75: 1550-1560.
- 22- Meamar, M., A. Shahneh, S. Zeinaldini, H. Kahram, and M. J. Zamiri. 2012. Effects of melatonin and vitamin E on properties of frozen semen of male native Fars province of phars. *Iranian Journal of Animal Science*, 43(3): 379-391. (In Persian)
- 23- Perumal, K., A. Vupru, and C. Rajkhowa. 2013. Effect of addition of taurine on the liquid storage (5°C) of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Veterinary Medicine International*. Article ID 165348, 7 p.
- 24- Ramadan, T. A., T. A. Taha, M. A. Samak, and A. Hassan. 2009. Effectiveness of exposure to long day followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Journal of Theriogenolgy*, 71(3): 458-468.
- 25- Reiter, R. J., X. T. Tan, S. J. Kim, and Q. I. Wenbo. 1998. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Journal of Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 41:229-236.
- 26- Salamon, S., and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Journal of Animal Reproduction Science*, 62(1-3): 77-111.
- 27- Shang, X., Y. Huang, Z. Ye, X. Yu, and W. Gu. 2004. Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. *Journal of Zhonghua Nan Ke Xue*, 10(8): 604-607.
- 28- Sharbatoghli, M., M. Rezazadeh, M. H. Bahadori, R. Salman Yazdi, and L. Rashki Galeno. 2014. The Relationship between Seminal Melatonin with Sperm Parameters, DNA Fragmentation and Nuclear Maturity in Intra Cytoplasmic Sperm Injection Candidates. *Cell Journal*, 17(3): 547-553.
- 29- Shoaee, A., and M. J. Zamiri. 2008. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg-yolk-citrate extender. *Journal of Animal Reproduction Science*, 104(2-4): 414-418.
- 30- Tamura, H., A. Takasaki, I. Miwa, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata, K. Shimamura, H. Morioka, H. Ishikawa, R. J. Reiter, and N. Sugino. 2008. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3): 280-287.
- 31- Tajvidi Asr, S., H. Kahram, R. Beheshti, and I. Ashrafi. 2013. Antioxidant effect of Melatonin on the buffalo sperm parameters after freeze thawing process. *Iranian Journal of Animal Science*, 23(4): 47-56. (In Persian)
- 32- Tanyildizi, S., T. Bozkurt, O. Ciftece, and F. Sakin. 2006. In vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. *Turkish Journal of Veterinaria and Animal Science*, 30(1): 89-93.
- 33- Trejo, G. A., L. C. Ponce, and G. M. A. Vidal. 2000. Effects of melatonin and GnRH treatments on semen quality in young male goats. In 7th International conference on goats, Tours. Poitiers, France (pp. 15-21).
- 34- Upreti, G. C., K. Jensen, J. E. Oliver, D. M. Duganzich, and R. Munday. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically defined diluent containing antioxidants. *Journal of Animal Reproduction Science*, 48: 269-278.
- 35- Yousef, M. I., G. A. Abdollad, and K. I. Kamel. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Journal of Animal Reproduction Science*, 76: (1-2): 99-111.



Antioxidant Effect of Melatonin on Arabic Ram Semen Parameters after Freeze - Thawing Process

S. Mohamadi^{1*} - M. Mamouei² - S. Tabatabaei Vakily³ - J. Fayazi⁴

Received: 18-12-2016

Accepted: 12-09-2017

Introduction Semen collection evaluation and addition of preservatives to increase storage period of sperm are essential for successful artificial insemination. Cryopreservation of spermatozoa is becoming more important because of new clinical requirements and current clinical practice. Although frozen-thawed semen has great practical benefits for reproduction, it is widely reported that the cryopreservation process involving cooling, freezing, and thawing induces serious detrimental changes in sperm functions. The viability, motility and membrane integrity of mammalian spermatozoa decrease during the cryopreservation process. Many studies exist as regards the effects of antioxidants on the cryopreservation aimed at improving the quality of post-thaw semen. Antioxidant molecules could decrease the impact of oxidative stress and therefore improve Sperm quality following the freeze-thawing process. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a derivative of tryptophan, is mainly synthesized and secreted by the pineal gland during the night in reaction to changes in light levels. Melatonin can stimulate the activity of antioxidant enzymes such as SOD and GSH-Px. melatonin scavenges a variety of reactive oxygen and nitrogen species in vivo and in vitro, signifying it has a powerful non-enzymatic antioxidant property. It has been shown that the spermatozoa undergo a freeze-thawing process produced high concentrations of reactive oxygen species. The aim of this study was to investigate the effects different levels of melatonin supplementation (0, 0.5, 1, 2 and 4 mM/ml) in extender on semen characteristics the Arabic ram after freezing-thawing.

Materials and Methods This research was performed at Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan in the fall in 2015. Semen samples were collected from 6 Arabic ram with an average weight 73 ± 3 kg by electro ejaculator twice a week. Sperm samples motility were assessed by Computer Aided Sperm Analysis (CASA) after freezing and thawing. The pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity were also assessed after freezing-thawing process. Pearson correlation test was used to assess correlation of melatonin with routine sperm parameters (pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity of plasma). Data analysis was performed using SAS software. $P < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion the Results of this experiment showed that the diluent of ram semen containing 0.5 mM/ml of melatonin improved the motility, membrane integrity and viability of Arabic ram spermatozoa compared to the control. The total antioxidant capacity was highest in diluent contained whit 1 mM/ml of melatonin. The effect of melatonin on the pH of semen at all levels was not significant. Cryopreservation causes an irreversible damage to enzymatic activity and sperm organelles leading to a reduction in the sperm kinetic parameters. Composition of extender may also affect the freeze ability of spermatozoa and their fertilizing ability. Many studies reported that melatonin has beneficial effects on preservation of mammalian sperm function and improves the microscopic parameters of spermatozoa. Melatonin supplementation to ram semen freezing extender protected spermatozoa from the cryopreservation injuries, as proved by post-thaw viability, motility, intracellular ATP concentrations, DNA integrity, and fertilizing ability. It is suggested that melatonin stimulates the activities of antioxidant enzymes. In consequence, melatonin reduces the number of free radicals, ROS, and also may increases the production of molecules protecting sperm cells against oxidative stress. As a conclusion, supplementation of melatonin in the freezing medium can counteract the adverse effects of the freeze-thawing process on the motility, viability, normal morphology and plasma membrane integrity in ram spermatozoa. The results were suggested that the protective effects of melatonin on spermatozoa were associated with a reduction in LPO as a consequence of increasing the TAC and antioxidant enzymes activity.

1- Master of Animal Physiology, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

2- Professor of Reproductive Physiology, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

3- Associate Professor of Reproduction Physiology and Midwifery, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

4- Associate Professor of Genetics and Animal Breeding, University of Agriculture and Natural Resources, Ramin Khuzestan

(*- Corresponding author email: sedighemohamadi70@gmail.com)

Conclusion Cryopreservation of sperm is an applicable technique in infertility management but it may influence the post-thaw qualities of sperm, including morphology, motility, viability and DNA integrity. In this research, we show that supplementation of cryopreservation extenders with melatonin provide a cryoprotective effect on pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity. Overall addition of 0.5 mM/ml of melatonin to the extender improved the most of spermatozoa quality characteristics as well as total antioxidant capacity of semen after freezing-thawing process in Arabic ram. In the current study, we observed no correlation between melatonin and pH, viability, abnormal sperm percentage, membrane integrity and total antioxidant capacity of plasma.

Key words: Sperm, Motility, Membrane Integrity, Survival, Total Antioxidant Capacity

مقایسه تأثیر استفاده از پودر کرم توپیفکس (*Tubifex tubifex*) پرورشی و تجاری در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*) قبل و بعد از تنش هوا

محسن برخوردار^۱ - رضا ولی‌زاده^{۲*} - امید صفری^۳ - محمدرضا احمدی^۴ - عباسعلی ناصریان^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۳

چکیده

کرم توپیفکس (*Tubifex tubifex*) یکی از انواع غذاهای زنده در صنعت آبی‌پروری است که با توجه به ارزش غذایی فراوان آن از لحاظ پروتئین، چربی خام، انواع اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب ضروری (W3 و W6) و استفاده این ماده غذایی در غذای ماهیان زینتی باعث بهینه‌سازی روند رشد، بازماندگی زیاد و بهبود سیستم ایمنی فراهم می‌شود. در این تحقیق اثر استفاده از پودر کرم توپیفکس پرورشی، توپیفکس تجاری و غذای پلت بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی ماهی آنجل در طول مدت ۶۳ روز بررسی شد. ماهیان در سه تیمار و سه تکرار با تراکم ۱۵ قطعه در ۹ آکواریوم ۲۰ لیتری با متوسط وزن اولیه بچه ماهیان به مقدار $19/55 \pm 0/21$ گرم ذخیره‌سازی و به‌صورت کاملاً تصادفی توزیع شدند. غذادهی به‌صورت روزانه در سه نوبت ۷ صبح، ۱۳ ظهر و ۲۰ شب و به میزان ۳ درصد وزن بدن انجام گرفت. نتایج در انتهای دوره پرورش نشان داد که تغذیه غذای حاوی پودر کرم توپیفکس پرورشی باعث رشد بیشتر ($1/80 \pm 0/02$ درصد وزن بدن در روز) نسبت به غذای حاوی توپیفکس تجاری ($+0/31$) و غذای حاوی پلت ($+0/27$) شد ($p < 0/05$). وزن نهایی ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی پودر توپیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری به میزان ۳۰ درصد و ۲۶ درصد نسبت به ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی توپیفکس تجاری و غذای حاوی پلت بیشتر بود. تغذیه غذای حاوی پودر توپیفکس پرورشی با ضریب تبدیل بهتر ($1/44 \pm 0/03$) و به‌ترتیب ۱۱ درصد و ۱۹ درصد نسبت به تغذیه غذای حاوی پلت و غذای حاوی توپیفکس تجاری همراه بود ($p < 0/05$). ایمونوگلوبین کل، لیزوزیم و فعالیت کمپلمان بعد از تنش هوا در تیمار تغذیه غذای حاوی پودر توپیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) در ماهیان تغذیه شده با پودر کرم توپیفکس پرورشی بیشتر بود. مقدار دو آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمار حاوی پودر کرم توپیفکس پرورشی نسبت به دو تیمار دیگر کمتر بود ($p < 0/05$). بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که تغذیه ماهی آنجل با غذای حاوی پودر کرم توپیفکس پرورشی به‌ویژه در زمان شروع تغذیه فعال می‌تواند باعث بهبود رشد و برخی شاخص‌های ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی، تنش هوا، کرم توپیفکس، ماهی آنجل (*Pterophyllum scalare*)

مقدمه

تکثیر و پرورش ماهیان زینتی یکی از بخش‌های کارآمد صنعت

آبی‌پروری به‌ویژه در مقیاس تجاری محسوب می‌شود (۴۷). صنعت آبی‌پروری زینتی تجاری در جهان با حجم معاملات حدود ۹ میلیارد دلار، سالانه حدود ۸ درصد رشد داشته که بر اساس طبقه‌بندی سازمان کشاورزی خواروبار جهانی بیشترین ارزش افزوده را در بین فعالیت‌های شیلاتی دارد (۵۴).

ماهی آنجل^۵ متعلق به خانواده سیچلایدها از گونه‌های مشهور در صنعت آبی‌پروری ماهیان زینتی است (۱۰). این ماهی بومی رودخانه آمازون است و با توجه به سازگاری

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استاد، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
(Email: valizadeh@um.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/ijasr.v10i2.64868

یافت (۱۹). یکی از رویکردهای صنعت آبی‌پروری استفاده از افزودنی‌های غذایی با کیفیت در جیره غذایی آبزیان می‌باشد و استفاده از این ترکیبات زمانی تأثیرگذار است که بتواند در زمان بروز تنش مقاومت گونه آبی را در برابر شرایط تنش‌زا افزایش دهد. در آبی‌پروری نوین با توجه به کمبود منابع آبی افزایش تراکم پرورشی می‌تواند تنش زیادی به ماهیان وارد نماید، بنابراین جهت جلوگیری از مشکلاتی نظیر کاهش رشد، بروز بیماری و تلفات احتمالی ناشی از تنش، ملاحظات در خصوص مدیریت تغذیه را بیشتر می‌نماید که باید تحقیقات کاربردی در زمینه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان آکواریومی از جمله کارایی رشد، افزایش مقاومت و پاسخ ایمنی انجام گیرد. متخصصین معتقدند آن دسته از جیره‌های غذایی که سبب رشد و بازماندگی بیشتر ماهیان می‌گردند مقاومت ماهیان را در برابر تنش‌ها نیز افزایش می‌دهند (۴۴).

در حال حاضر موفقیت در آبی‌پروری منوط به کنترل تولید مثل، شناخت درست از زیست‌شناسی مزارع پرورش ماهی، نوآوری در روش کار و بهبود کیفیت جیره‌های غذایی می‌باشد (۳۳). از اصول کلی آبی‌پروری داشتن کمترین هزینه و بیشترین بازده می‌باشد که دستیابی به منابع مناسب از راهکارهای مهم محسوب می‌شود (۵۰). لذا با توجه به اینکه عمده هزینه‌های تولید مربوط به تغذیه است و بخش پروتئینی بیشترین قسمت را شامل می‌شود (۳۲) بررسی ارزش غذایی کرم توپی‌فکس پرورشی با هدف بهبود عملکرد رشد، افزایش سیستم ایمنی، بقاء، کاهش هزینه‌های پرورشی و سرانجام افزایش بهره‌وری که به‌طور عمده مربوط به تهیه غذای مناسب است، از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد. پرورش کرم توپی‌فکس در کشور ما به‌صورت انبوه وجود ندارد و ترکیبات شیمیایی کرم توپی‌فکس به‌صورت تجاری و به دلیل واردات این نوع کرم، دقیق مشخص نیست و همچنین در دسترس نبودن این نوع کرم به‌صورت دائم و نیز افزایش قیمت تمام شده آن به‌صورت تجاری و از همه مهم‌تر آلوده نبودن کرم‌های تولید شده در غذای تجاری ضرورت مقایسه و مطالعه غذای پرورشی و تجاری توپی‌فکس را فراهم نمود. بنابراین هدف آزمایش حاضر بررسی مقایسه‌ای اثر استفاده از پودر کرم توپی‌فکس پرورشی، تجاری و پلت در جیره غذایی ماهی آنجلبر فاکتورهای رشد و ایمنی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره‌های آزمایشی

جیره‌های آزمایشی شامل ۳ جیره (۱ جیره شاهد به‌صورت پلت (بیومار) و تهیه شده از شرکت ماهیران (۲ جیره حاوی کرم توپی‌فکس تجاری از شرکت ماهیران به‌صورت منجمد خشک شده و ۳ جیره حاوی پودر کرم توپی‌فکس پرورشی تولید شده در شرایط آزمایشگاهی به‌صورت منجمد خشک بود (جدول ۱).

مناسب در سرتاسر جهان قابلیت اقتصادی بزرگی را به‌وجود آورده است (۷۰). این ماهیان همه چیزخوارند و از غذاهای زنده نظیر دافنی، ناپلی آرتیمیا، انواع کرم‌ها و مانند آن‌ها تغذیه می‌کنند (۳). یکی از چالش‌های مهم آبی‌پروری، تهیه غذای متناسب با نیاز ماهی است و استفاده از غذای زنده در جیره غذایی آبزیان علاوه بر تأمین نیازهای غذایی می‌تواند در پیشگیری و کنترل بیماری‌های آنها، تنظیم و تحریک سیستم ایمنی فراوانی داشته باشد. با توجه به تعداد و تنوع گونه‌های ماهیان و نیز مطالعات فراوان در خصوص بیماری‌های ویروسی و باکتریایی هنوز اطلاعات زیادی در خصوص توانایی دستگاه گوارش لارو ماهیان برای هضم پلت‌های خشک نیز وجود ندارد (۶۹). با توجه به میزان تلفات لاروها در ۳۰-۲۰ روز اولیه (۲۱) یعنی زمان شروع تغذیه فعال، استفاده از غذای زنده در دوران لاروی، در مواردی موجب افزایش بقاء و مقاومت در برابر بیماری‌ها شده و باعث رشد بهتر اندام‌های جنسی و عملکرد آن گردیده است (۴۰). از آنجایی که کمبود مواد مغذی موجب اختلال در ترکیبات سیستم ایمنی همانند میزان لیزوزیم و ایمونوگلوبولین می‌شود و کارایی سیستم دفاعی ماهیان را کاهش می‌دهد، استفاده از غذای زنده و مواد غذایی ضروری به‌عنوان یکی از راهکارهای بهبود سیستم دفاعی ماهیان پیشنهاد شده است (۲۹). البته استفاده از غذای زنده در جیره غذایی ماهیان مستلزم صرف هزینه است و با مشکلاتی همراه می‌باشد، اما با این حال با جیره‌نویسی صحیح می‌توان تولید لارو، دفعات تخم‌ریزی، بازماندگی، کیفیت و برخی شاخص‌های ایمنی آبزیان را افزایش داد.

کرم توپی‌فکس^۱ از خانواده توپی‌فیسید^۲ یکی از ماکرو زئو بنتوزها و از انواع غذاهای زنده برای ماهیان است. منطقه وفور آن در اطراف کشورهای بریتانیا و ایرلند می‌باشد (۶۲). این کرم با محتوی پروتئین خام زیاد، انواع اسیدهای آمینه، چربی‌های ضروری، چربی خام و هم‌آوری زیاد، قابلیت تحمل خوبی در برابر تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب در نقاط مختلف دارد (۲۲).

نتایج تحقیقات در خصوص تغذیه ماهی آنجل با آرتیمیا اورمیان^۳ همراه با استفاده از اسید چرب غیر اشباع نشان داد استفاده از این غذا به‌طور معنی‌داری باعث بهبود توانایی تولیدمثلی (درصد لقاح، افزایش هم‌آوری و درصد تفریح) و میزان بازماندگی لاروها نسبت به تغذیه غذای کنستانت^۴ می‌شود (۴۸). در گزارش دیگری استفاده از آرتیمیا در جیره غذایی مولدین ماهی آنجل نسبت به تغذیه غذای کنستانت^۴ سبب افزایش لقاح گردید (۶۵). در آزمایشی بازماندگی لاروها در مولدین تغذیه شده با غذای غنی شده آرتیمیا با اسیدهای چرب غیر اشباع و اسید اسکوربیک نسبت به غذای کنستانت^۴ و غنی نشده بهبود

1- *Tubifex tubifex*

2- *Tubificidae*

3- *Urmiana Artemia*

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره های آزمایشی حاوی غذای پلت، پودر کرم توبیفکس پرورشی و تجاری (%)

Table 1- Chemical composition of the experimental diets containing pelleted, commercial or produced tubifex powder (%)

Parameters (%)	جیره های آزمایشی Experimental diet		
	شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفکس Containing produced tubifex powder
پروتئین خام Crude protein (CP)	60	58	69
عصاره اتری Ether extract	22	17	11.07
خاکستر Ash	9.6	11	5.6

تهیه ماهیان و شرایط انجام آزمایش

تعداد ۱۳۵ عدد بچه ماهی آنجل^۱ از یک کارگاه تکثیر و پرورش در شهرستان مشهد و از یک مولد به دست آمده بودند با میانگین وزنی $19/55 \pm 0/21$ گرم به مدت ۶۳ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. ماهی ها پس از توزین، به ۹ عدد آکواریوم ۲۰ لیتری به ابعاد $0/3 \times 0/3 \times 0/25$ متر و با تراکم ۱۵ عدد به طور تصادفی انتقال یافتند. آزمایش اصلی پس از ۷ روز سازگاری و تأمین شرایط یکنواخت نگهداری شروع گردید. آب آکواریوم ها از آب شهری پس از نگهداری به مدت یک هفته در مخزن ۲۲۰ لیتری، تأمین شد. اکسیژن مورد نیاز همه تیمارها به وسیله پمپی با توان خروجی ۴۵ وات انجام گرفت. از دماسنج خودکار جهت کنترل دما و جلوگیری از تغییرات درجه حرارت آب و هوا استفاده شد.

اکسیژن و pH آب به وسیله دستگاه قابل حمل و به صورت روزانه ثبت گردید. میانگین دمای آب در طول مدت آزمایش 27 ± 1 درجه سانتی گراد، میانگین pH آب $7/5 \pm 0/1$ و میانگین اکسیژن محلول آب $7/68 \pm 0/35$ میلی گرم بر لیتر بود. طول مدت روشنایی ۱۴ ساعت و تاریکی ۱۰ ساعت در نظر گرفته شد. غذاهای ماهیان به میزان ۳ درصد وزن بدن و با ترازوی با دقت $(\pm 0/001)$ گرم و روزانه در سه نوبت (۷ صبح، ۱۳ ظهر و ۲۰ شب) انجام شد. همچنین در روزهای ۱، ۳۱ و ۶۳ آزمایش زیست سنجی ماهیان انجام گرفت.

آنالیز شیمیایی

در پایان دوره آزمایش پس از قطع غذاهای به مدت ۲۴ ساعت آنالیز شیمیایی انواع جیره های غذایی و نیز لاشه ماهیان آزمایشی انجام شد. پروتئین خام از طریق تعیین نیتروژن کل ($N \times 6/25$) به روش کج لیدال و با استفاده از دستگاه کج لیدال نیمه اتوماتیک مدل

1- *Pterophyllum scalare*

(BAP 40) ساخت آلمان، چربی خام از طریق حل کردن چربی در اتر و تعیین مقدار آن به وسیله دستگاه سوکسله اتوماتیک مدل (BOHR) ساخت آلمان، خاکستر از طریق قرار دادن نمونه در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت اندازه گیری شد (۵).

ارزیابی شاخص های تغذیه ای، رشد و بقا

طول و وزن ماهیان به عنوان شاخص های زیست سنجی به ترتیب به وسیله کولیس با دقت (۰/۱ میلی متر) و ترازو با (دقت $\pm 0/001$) گرم صورت گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده از زیست سنجی در پایان دوره آزمایش معیارهای مربوط به شاخص های رشد، تغذیه و بقا از رابطه های زیر محاسبه گردید (۳۰).

- ۱- نرخ رشد ویژه (درصد در روز)
رشد ویژه $\times 100 = \left[\frac{(\text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه}) - (\text{لگاریتم طبیعی وزن ثانویه})}{\text{طول دوره آزمایش (روز)}} \right]$
- ۲- ضریب تبدیل غذایی
افزایش وزن بدن (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی
- ۳- میزان بقا
 $\text{میزان بقا} = \left(\frac{\text{تعداد نهایی ماهیان}}{\text{تعداد اولیه ماهیان}} \right) \times 100 = \text{بقا میزان (درصد)}$

آزمون تنش

در انتهای دوره آزمایش از هر تکرار تعداد ۵ نمونه ماهی گرفته شد و هر کدام از ماهی ها به مدت ۵ دقیقه به وسیله تور در معرض هوا و تنش کمبود اکسیژن (تنش هوا) قرار گرفتند (۴). پس از تنش، ماهی ها بلافاصله به داخل آکواریوم ها انتقال یافتند. سپس بعد از ۳ ساعت نگهداری داخل آکواریوم ها، ماهی هایی که تحت شرایط تنش قرار داشتند مجدداً جمع آوری، تلفات ثبت و نمونه ها در درجه حرارت

۱۸- درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایشات مربوط به خون گیری نگهداری شدند.

تجزیه‌های بیوشیمیایی

نحوه سنجش آنزیم‌های گوارشی

در انتهای دوره آزمایش پس از کالبدشکافی ماهی دستگاه گوارش خارج و بخش روده‌ای ماهی شناسایی و روده جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی استخراج شد. سپس وزن مشخصی از روده در آب مقطر (با نسبت وزنی به حجمی ۵ به ۱) همگن و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور $13000 \times g$ سانتریفیوژ شد در ادامه مایع رویی چربی‌زدایی شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری و سپس فعالیت تریپسین با استفاده از سوبسترای بنزویل-آرژنین-پی-نیترو آنیلیدو و با کمک منحنی استاندارد شده محلول تریپسین گاوی (۳۸)، آمیلاز با استفاده از نشاسته به عنوان سوبسترا و از طریق رنگ‌سنجی (۶۶) و لیپاز با استفاده از سوبسترای امولسیون روغن زیتون-صمغ عربی و به طریق تیتراسیون (۶۷) اندازه‌گیری شد. یک واحد تریپسین، برابر با یک میکرو مول تیروزین آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین، یک واحد لیپاز برابر با یک میکرومول اسید چرب آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین آلبومین گاوی و یک واحد آمیلاز برابر با یک میکرو مول مالتوز آزاد شده در مدت یک دقیقه به ازای هر گرم پروتئین آلبومین گاوی در نظر گرفته شده است. اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی آلانین ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) به روش آنزیماتیک کینتیک (۶۳) انجام گرفت.

فراسنجه‌های ایمونولوژیکی

در انتهای دوره غذادهی (بعد از ۶۳ روز) و همچنین بعد از آزمون تنش، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند و سپس به‌طور تصادفی نمونه خون از پنج عدد ماهی آنجل (از هر تیمار سه تکرار) گرفته شد. بدین منظور پس از بیهوشی توسط اسانس گل میخک، خون از ورید ناحیه ساقه دمی با سرنگ‌های حاوی فنوکسی اتانول تهیه گردید. سرم نمونه‌های خون پس از سانتریفیوژ در دور ۳۶۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جمع‌آوری شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای تجزیه و تحلیل فراسنجه‌های ایمونولوژیکی در فریزر نگهداری شد.

ایمونوگلوبولین کل

برای سنجش ایمونوگلوبولین کل از هر تکرار تعداد ۵ عدد ماهی نمونه‌برداری شد و سپس پروتئین محلول قبل و بعد از رسوب با پلی‌اتیلن گلیکول به عنوان مقدار ایمونوگلوبولین کل در نظر گرفته شد (۶۱).

فعالیت لیزوزیم

فعالیت لیزوزیم نمونه‌های خونی از طریق لیزکردن باکتری‌های گرم مثبت ایزولتیکوس میکروکوس که لیزوزیم به آن حساس است تعیین گردید (۲۰). میزان استاندارد لیزوزیم سفیده‌ی تخم‌مرغ از صفر تا ۱۴ میلی گرم در ML^{-1} (۰/۱) تامیون نیترات فسفات در $pH=5/8$ و نمونه سرم رقیق شده (۲۵μl) در داخل چاهک‌های صفحات پلیت در سه قسمت قرار داده شد. مقدار ۱۷۵ میلی لیتر از محلول لیزوزیم به نمونه‌های بافر به هر کدام اضافه و سریعاً عمل مخلوط انجام گرفت. اندازه‌گیری تغییرات کدورت به مدت ۵ دقیقه در دمای اطاق، هر ۳۰ ثانیه با استفاده از صفحات ۴۵۰ میکرو اندازه‌گیری شد. سپس مقایسه فعالیت لیزوزیم نمونه‌ها با نمونه استاندارد توسط یک سیستم نرم‌افزاری (ساخت شرکت بیومتالیک نیوجرسی) سنجش شد.

فعالیت کمپلمان

گلبول‌های قرمز خون سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیم ژلاتین و رونا لشته شد و تعداد سلول‌های آن به کمک لام ثوبار در هر میلی لیتر بافر $2 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ تنظیم شد. ابتدا دانسیته نوری لیز درصد گلبول‌های قرمز خونی با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به ۳/۴ میلی لیتر آب مقطر تعیین گردید. سپس نمونه‌های سرم با بافر فوق رقیق شدند. سپس به همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر گلبول قرمز خونی اضافه گردید. مخلوط فوق به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. لوله‌ها با دور $1600 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و دانسیته نوری محلول رویی با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۴ نانومتر محاسبه گردید. برای محاسبه میزان فعالیت راه میانبر سیستم کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود فعالیت کمپلمان نمونه به دست آمد (۱۶ و ۶۸).

فراسنجه‌های میکروبی

نمونه‌گیری تصادفی از ۵ قطعه ماهی به‌ازای هر تکرار انجام گرفت، به طوری که نمونه‌ها پس از انتقال زنده به آزمایشگاه با کلرید بنزالکونیوم (یک درصد برای ۶۰ دقیقه) شستشو داده شده و سپس با اسکالپل شکافته و روده برداشته شد و با کلرید سدیم (۰/۹M/V) با استفاده از دستگاه هموژنایزر همگن گردید و با سرعت $5000 \times g$ در ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، از نمونه آماده شده به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلت محتوی آگار (PCA; Merck) جهت شاخص (TVC) و همچنین آگار (MRS; Merck Co) جهت شاخص (LAB) هر کدام با سه تکرار قرار داده شد. پلت‌ها در

پردازش و در نهایت وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز ترکیب شیمیایی لاشه ماهیان آنجل نشان داد بیشترین پروتئین خام به مقدار ۶۹/۳ مربوط به تیمار غذای حاوی توبیفکس پرورشی و کمترین آن مربوط به غذای حاوی توبیفکس تجاری است. جدول ۲ میزان درصد پروتئین خام، چربی خام و خاکستر لاشه ماهیان آنجل را در سه تیمار غذایی در پایان دوره آزمایشی به تفکیک نشان می‌دهد.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی (برحسب ماده خشک) لاشه ماهیان آنجل در سه تیمار آزمایشی در انتهای دوره (پس از ۶۳ روز غذایی)

Table 2- Chemical composition of angel carcass allocated to the experimental treatments (at the end of experimental period (63 days)

متغیر Parameter (%)	Experimental diet		
	شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفکس Containing produced tubifex powder
پروتئین خام Crude protein(CP)	67.2	64.8	69.3
چربی خام Ether extract	14.5	16.2	13.4
خاکستر Ash	18.3	19	17.3

به توبیفکس تجاری ۱۱ درصد بیشتر بود ($p < 0.05$) اما نسبت به جیره غذایی شاهد درصد بقاء معنی‌دار نبود.

شاخص‌های ایمنی

میزان فعالیت فراسنجه‌های ایمنی شامل ایمونوگلوبولین کل در ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری از دیگر تیمارهای آزمایشی بیشتر بود (شکل ۱) و لیزوزیم به‌عنوان یکی از مهمترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان نیز بعد از تنش هوا در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی میزان بیشتری را نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد (شکل ۱) و همچنین میزان کمپلمان نیز در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی بعد از تنش هوا به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.05$) (شکل ۱).

نتایج مطالعات حاضر نشان داد ماهیانی که از غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی در طول دوره آزمایش استفاده کرده بودند از افزایش وزن، میزان رشد ویژه، درصد بازماندگی زیادت‌ر و نیز ضریب تبدیل بهتری برخوردار بودند ($p < 0.05$) و ماهیان تغذیه شده از غذای شاهد (پلت) نسبت به جیره غذایی حاوی توبیفکس تجاری افزایش وزن، رشد، درصد بازماندگی بیشتری داشتند.

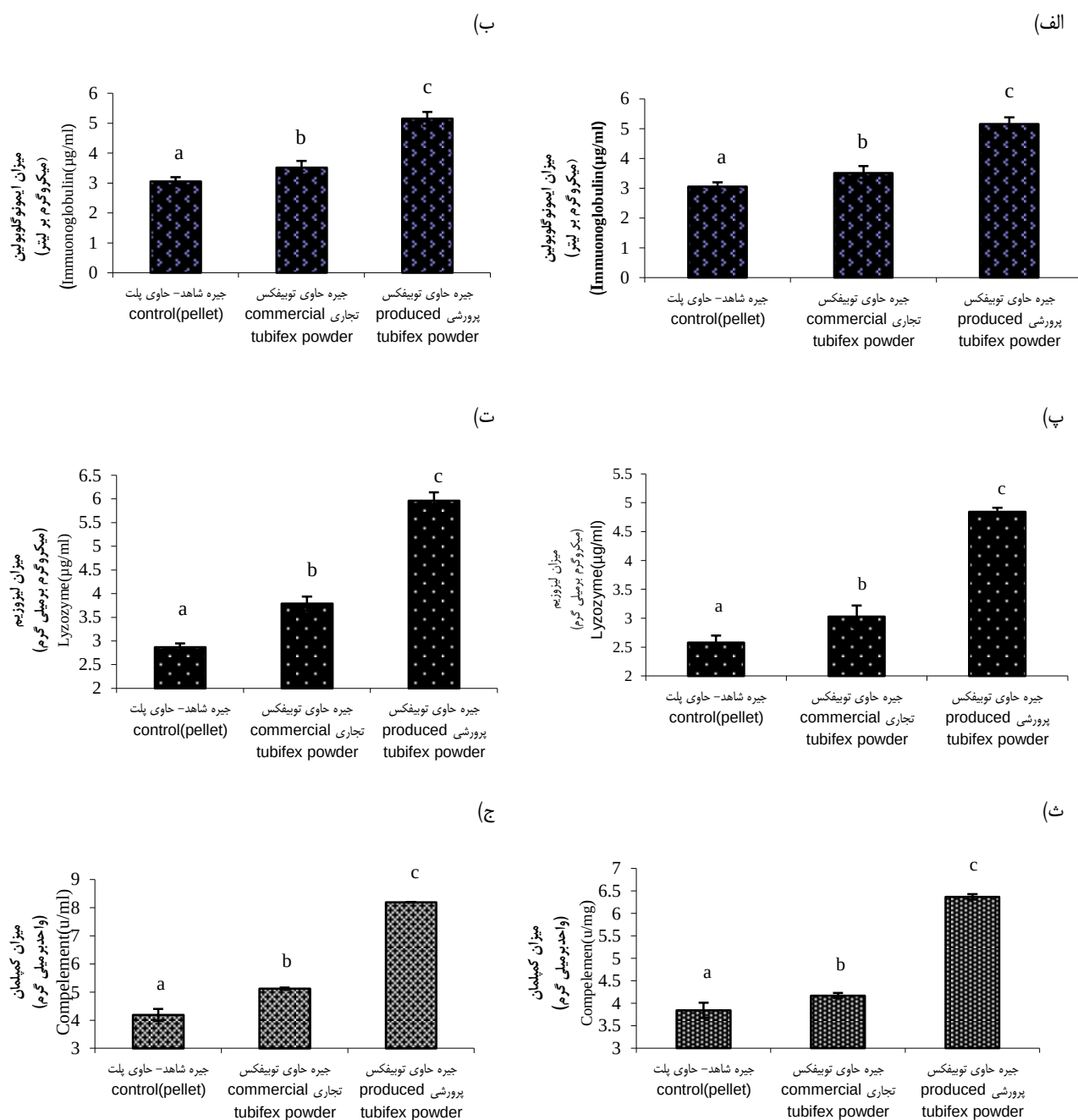
شرایط انکوباسیون و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز نگهداری و برای پلت‌های محتوی ۳۰-۳۰۰ کلنی محاسبه گردید (۵۶).

تجزیه آماری

در ابتدا آزمون نرمالیتی به‌وسیله آزمون *Shapiro-Wilk* انجام شد. تجزیه و تحلیل روی داده‌های مربوط به تغییرات معیارهای رشد، فاکتورهای تغذیه‌ای و بیوشیمیایی ماهیان از طریق آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. در ابتدا اطلاعات خام در محیط اکسل مورد

بیشترین میزان وزن نهایی کل (۳۵/۰۳ گرم) در ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی و کمترین آن (۲۹/۰۴ گرم) در ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی پلت مشاهده گردید. در این رابطه استفاده از جیره غذایی حاوی توبیفکس پلت باعث افزایش ۴/۵ درصدی وزن نهایی نسبت به جیره غذایی حاوی تجاری در ماهیان آنجل آزمایشی شد. هرچند که وزن نهایی ماهیان آنجل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی توبیفکس تجاری ۳۰ درصد از تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی کمتر بود ($p < 0.05$). جدول ۳ نتایج حاصل از میانگین برخی شاخص‌های رشد و میزان بقاء به تفکیک تیمارهای آزمایشی و در انتهای دوره آزمایشی را نشان می‌دهد.

طول کل نهایی نیز در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) به میزان ۱۴ درصد از توبیفکس پلت و از غذای حاوی تجاری به میزان ۱۵/۵ درصد بیشتر بود. میزان رشد ویژه نیز در غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی از غذای حاوی تجاری و پلت به‌ترتیب ۳۱ و ۲۶/۷ درصد بیشتر بود ($p < 0.05$). ضریب تبدیل جیره حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌ترتیب ۱۹ و ۱۱ درصد کمتر از جیره حاوی توبیفکس تجاری و غذای حاوی پلت بود ($p < 0.05$). بقاء ماهیان آزمایشی در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی نسبت



شکل ۴- مقایسه میانگین ($\pm$ انحراف معیار) نسبت باکتری‌های لاکتو باسیلوس به تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش در ماهی آنجل تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی بعد از ۶۳ روز غذادهی در سه تکرار ($P < 0.05$).

Figure 4- The men ($\pm$ se) ratio of lactobacillus bacteria to total viable count in the digestive tract in angel fish fed with experimental diet at the end of experimental period (63 day)

جدول ۳- میانگین ($\pm$ انحراف معیار) وزن (گرم)، طول (میلی متر)، میزان رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان بقا در ماهی آنجل تغذیه شده با جیره های غذایی آزمایشی طی ۶۳ روز ($n=3$)

Table 3- Mean ($\pm$ se) of body weight, length, growth feed efficiency and survival of angel fish allocated to the experimental treatments (during 63 days of the experimental period)

متغیر Parameter	Experimental diet		
	شاهد The control (pelleted)	حاوی پودر توبیفکس تجاری Containing commercial tubifex powder	حاوی پودر تولید شده توبیفکس Containing produced tubifex powder
طول اولیه Initial length (mm)	23.15 $\pm$ 1.03	23.25 $\pm$ 0.97	23.29 $\pm$ 0.71
وزن نهایی Final body weight (gr)	0.45 $\pm$ 0.03 ^a	0.43 $\pm$ 0.03 ^a	0.61 $\pm$ 0.01 ^b
طول نهایی Final length (mm)	33.04 $\pm$ 0.73 ^a	31.25 $\pm$ 0.62 ^a	39.03 $\pm$ 0.93 ^b
نرخ رشد ویژه Specific growth rate (%bw/day)	1.32 $\pm$ 0.06 ^a	1.24 $\pm$ 0.13 ^a	1.80 $\pm$ 0.02 ^b
ضریب تبدیل غذایی Feed efficiency	1.61 $\pm$ 0.15 ^b	1.77 $\pm$ 0.20 ^b	1.44 $\pm$ 0.03 ^a
نرخ بقا Survival rate (%)	97.78 $\pm$ 3.85 ^b	88.89 $\pm$ 3.85 ^a	100 $\pm$ 0.01 ^b

میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دار می باشند. ($P<0.05$)

* Means within some row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

انرژی جهت پاسخ به تنش کمبود اکسیژن (۲)، افزایش مقاومت در برابر شرایط محیطی (۷)، رنگ پذیری و شکل ظاهری بهتر لاروها به دلیل فراهم نمودن پیش درآمدهایی جهت تولید ایکوزانوئیدها باشد (۳۷). در مطالعاتی اثر آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بر میزان تلفات لارو ماهی کفال خاکستری که در معرض تنش هوا قرار گرفته بودند نتایج نشان داد که بازماندگی لاروهای تغذیه شده با آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بالای ۸۰ درصد بوده است (۴). در مطالعات مشابه دیگر محققان نشان دادند مقاومت لاروها در برابر تنش های محیطی با تغذیه از آرتمیای غنی شده در ماهی قزل آلا به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد و غذای کنستانتتره بیشتر است (۶) و همچنین نتایج مطالعه تغذیه لارو بچه ماهی آنجل^۵ با آرتمیای غنی شده با اسید چرب غیر اشباع نسبت به آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع نشان داد لاروهای ماهی آنجل به طور معنی داری دارای مقاومت و بازماندگی بیشتر نسبت به تنش های محیطی از جمله pH می باشد (۲۳). یکی از خواص مهم کرم توبیفکس داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع است (۲۲). ماهیان آب شیرین به دلیل نداشتن این چربی ها به اسیدهای چرب (۳-۶ و n نیاز دارند (۴۱) و ماهیان باید اسیدهای چرب ضروری را از جیره غذایی دریافت نمایند (۱۵). از آنجایی که یکی از مباحث مهم در اقتصادی کردن پرورش آبزیان زینتی با توجه به هزینه های تولید غذاهای زنده، جلوگیری از آلودگی ثانویه و حفظ کیفیت آب، مطلوب

به طوری که اثرات استفاده از کرم شیرونومیده تجاری بر فراسنجه های رشد در بچه ماهی جوئل^۱ (۳۶) و مطالعه اثر تغذیه ای جیره بیومار، دل گوساله، کرم فشرده (توبیفکس تجاری)، کرم خونی، گاماروس و آرتمیای بر پارامترهای رشد و بازماندگی در ماهی سوروم^۱ (۴۹) نیز نتایج مشابهی را ارائه نمودند و همچنین طبق مطالعات دیگری نتایج حاصل از اثرات بررسی تأثیر تغذیه با لارو شیرونومیده و غذای کنستانتتره بر راندمان رشد، بقا و رسیدگی جنسی ماهی رزی بارب^۲ (۵۴) و اثرات کرم های کم تار^۳ بر رشد و بازماندگی ماهیان خاویاری (۳۹) و همچنین افزایش رشد ماهی فلاندر^۴ تحت تأثیر اسیدهای چرب غیر اشباع (۱۷) با نتایج حاصل از این مطالعه مشابهت داشت. با توجه به اینکه ماهیان در محیطی زیست می نمایند که به صورت دائم در حال تغذیه و رقابت می باشند و نیز به جهت تراکم بالای محیط پرورشی ماهیان در معرض تنش های بسیار زیادی می باشند بنابراین مقابله با تنش و سازگار کردن اعمال فیزیولوژیکی بدن ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق پس از نگه داشتن ماهیان در معرض تنش کمبود اکسیژن، نتایج نشان داد که در تیمار ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی در مقایسه با تیمارهای دیگر هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد و دلیل آن می تواند نقش مهم اسیدهای چرب غیر اشباع در تنظیم رشد و نیازمندی های

1- *Heros severus*

2- *Puntius conchonius*

3- *Oligochaeta*

4- *Limanda ferruginea*

5- *Peterophylum scalare*

کردن ضریب تبدیل غذایی و قابلیت هضم زیاد جیره می‌باشد، در این تحقیق ضریب تبدیل غذایی جیره حاوی پودر توبیفکس پرورشی از دو تیمار دیگر به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). کاهش ضریب تبدیل، افزایش رشد و درصد بازماندگی زیاد می‌تواند به‌دلیل داشتن میزان زیاد پروتئین، اسیدهای چرب غیر اشباع (۲۵) و کاروتنوئید لازم به جهت نقش واسطه‌ای (۵۷) بر متابولیسم ماهیان در زمان شروع تغذیه فعال باشد. اگرچه در مطالعات آینده سنجش اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه جهت نتیجه‌گیری بهتر توصیه می‌شود.

لاروهای ماهیان از لحاظ تکامل فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی ناقص می‌باشد (۲۸) و از طرفی عدم توجه به اندازه لاروها، ابعاد دهان و عدم وجود آنزیم‌های گوارشی و از دست دادن برخی مواد مغذی غذایی پلت در آب هم می‌تواند از علل کاهش مقدار حاصل از عملکرد رشد غذای پلت نسبت به غذای توبیفکس پرورشی باشد و نتایج این تحقیق با نتایج افزایش بازماندگی لاروها با استفاده از غذای زنده پودر شده کرم نرئیس و به‌صورت ترکیب با پودر دافنی در مقایسه با غذای کنسانتره مطابقت داشت (۶۴).

آبزیان زینتی دارای تنوع گونه‌های زیادی می‌باشند بنابراین با افزایش بیماری‌های ماهیان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها عوارضی همچون افزایش مقاومت باکتری‌ها، تخریب فلور میکروبی محیط‌زیست و نیز ایجاد هزینه‌های اضافی را برای آبزی پروران به‌دنبال دارد (۱۲) و از طرفی استفاده از مکمل‌های غذایی و غذای زنده باعث افزایش هضم و جذب در جیره غذایی آبزیان و همچنین بهبود سیستم ایمنی ماهیان می‌شود، لذا استفاده از پودر کرم توبیفکس پرورشی به‌عنوان غذای زنده، ضمن توجه تکثیر و پرورش ماهیان آنجل، می‌تواند سبب کاهش یا محدودیت استفاده از مواد شیمیایی در محیط‌های پرورشی گردد.

یکی از شاخص‌های مهم سلامت ماهیان، اندازه‌گیری شاخص‌های خونی است. این شاخص‌ها به عوامل مختلفی همچون سن، جنس، تغذیه، عوامل محیطی و سایر خصوصیات فیزیولوژیکی ماهیان بستگی دارد (۲۷). در ماهیان سیستم ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود و با توجه به تراکم زیاد و آسیب‌پذیر بودن ماهیان تقویت این سیستم برای ماهیان بسیار مهم می‌باشد (۱۸). در مطالعه حاضر ماهیان آنجل تغذیه شده در جیره غذایی حاوی پودر توبیفکس پرورشی در شاخص‌های لیوزوزیم و ایمونوگلوبولین افزایش معنی‌داری نسبت به دو جیره غذایی داشت. لیوزوزیم به‌عنوان یکی از فاکتورهای مهم در مقاومت طبیعی ماهیان است (۴۵) که از اجزای ایمنی غیر اختصاصی بوده و موجب تخریب جداره باکتری‌ها و فعال‌سازی کمپلمان می‌شود (۱) که این امر باعث افزایش فعالیت بیگانه‌خواری، القاء و بهبود پاسخ‌های آنتی‌بادی در ماهی می‌شود (۴۴). ایمونوگلوبولین نیز نقش مهمی در ترشح آنتی‌بادی و افزایش سیستم

ایمنی اکتسابی در ماهیان دارد (۲۹) و همچنین کمپلمان‌ها که نقش اساسی در ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهیان دارد (۱۳)، بنابراین عملکرد رشد بهتر، درصد بازماندگی زیادتر، توانایی زیادتر تحمل شرایط تنش‌زا و نهایتاً بهبود سیستم ایمنی در تیمار غذایی حاوی توبیفکس پرورشی با افزایش میزان لیوزوزیم و کمپلمان سرم توجه می‌گردد. آمینو ترانسفرها آنزیم‌های کبدی با اهمیتی هستند که به‌عنوان شاخص فعالیت کبدی درخصوص وضعیت سلامت ماهیان شناخته شده (۵۵) و تحت تأثیر عواملی همچون فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، تراکم، شرایط پرورش، نوع جیره مصرفی، سن، جنس و نیز وضعیت سلامت ماهیان فعالیت و ترشح می‌گردند (۱۱). آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز نقش مهمی در مراحل نهایی تجزیه پروتئین جهت تولید ATP ایفا می‌کنند (۵۰). افزایش سطح فعالیت این آنزیم‌ها، نقش مؤثری در استفاده از اسیدهای آمینه در فرآیند اکسیداسیون یا گلوکوژنز دارد (۵۳). لذا هرگونه آسیب خفیف، التهاب یا نکروز سلول‌های کبد موجب آزاد شدن این آنزیم‌ها از سلول‌های آسیب‌دیده شده و این سلول‌ها محتوایشان را که شامل آمینوترانسفرها است به طرف جریان خون رها کرده و موجب افزایش میزان آنها در سرم می‌گردند (۴۶). در مطالعه حاضر مقادیر آنزیم‌های سرمی ALT و AST تحت تأثیر غذای حاوی پودر توبیفکس پرورشی قرار گرفت به‌طوری‌که میزان این دو آنزیم در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی به‌طور معنی‌داری کمتر بود. لذا به نظر می‌رسد آسیب ناشی از ترکیبات اکسیداتیو در کبد ماهیان تیمار شاهد و تیمار حاوی توبیفکس تجاری سطح سرمی این آنزیم‌ها را زیاد نموده است که البته در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی مقدار این دو آنزیم کمتر از دو تیمار دیگر بود. درخصوص میزان این آنزیم‌ها تحت تأثیر کرم توبیفکس مطالعاتی صورت پذیرفته است و بیشتر مطالعات درخصوص ماهیان پرورشی تحت تأثیر فصل، شوری انجام پذیرفته است (۵۲). یکی از راه‌های تشخیص محدودیت رشد لاروها، کاهش تلفات در زمان تغذیه فعال و طراحی جیره‌های غذایی نحوه تکامل سیستم آنزیمی به‌عنوان شاخصی از فعالیت‌های گوارشی و شرایط تغذیه‌ای لارو ماهیان می‌باشد (۲۸). وجود آنزیم‌های خارج سلولی از جمله لیپاز، آمیلاز و پروتئاز از طریق تحریک اشتها و افزایش متابولیسم میکروبی باعث افزایش سطح تغذیه در ماهیان می‌شود (۳۵). وجود اسیدهای چرب ۳- π نیازمندی‌های انرژی جهت پاسخ به تنش کمبود اکسیژن نقش دارند (۲). اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند قابلیت هضم سایر چربی‌ها را تغییر دهد و علت آن عملکرد لیپاز گوارشی درخصوص تجزیه چربی می‌باشد و لیپاز گوارشی ماهی تمایل زیادی برای هضم چربی‌ها را دارد (۳۷). افزایش لیپاز در تیمار حاوی پودر توبیفکس پرورشی نیز می‌تواند به‌دلیل خواص اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در این تیمار باشد که نتایج آن با اثر اسیدهای چرب غیر اشباع بر لیپاز گوارشی قزل‌آلای قهوه‌ای خزر مطابقت

آزمایشگاه شامل مراحل اولیه تولید، جمع‌آوری (روش جداسازی و خالص‌سازی) ممکن است مشکلاتی را به همراه داشته باشد ولی از طرفی با توجه به این که بیشترین تلفات لاروها در زمان شروع تغذیه فعال و به دلیل تغییر در عادات غذایی اتفاق می‌افتد، به نظر می‌رسد با توجه به نتایج به‌دست آمده در خصوص شاخص‌های رشد و ایمنی در این تحقیق، تولید کرم توپیفکس پرورشی به صورت انبوه و استفاده از پودر این کرم به صورت مکمل در جیره غذایی ماهی در زمان شروع تغذیه فعال می‌تواند در عملکرد رشد، بازماندگی، وضعیت ظاهری و نیز ارتقاء کیفیت سیستم ایمنی ماهی تأثیر به‌سزایی داشته باشد. امروزه با توجه به شرایط محیط پرورشی ماهی از نظر تراکم، احتمال آلودگی و بیماری‌زایی و همچنین ایجاد توجیه اقتصادی تکثیر و پرورش ماهیان زینتی استفاده از کرم توپیفکس با کیفیت توصیه می‌گردد. در هر حال به نظر می‌رسد برای رسیدن به این مهم باید تحقیقات بیشتری به‌ویژه نوع ماهیان زینتی، سنین مختلف و ارتباط آنها با تغذیه زنده توپیفکس پرورشی صورت گیرد.

سپاسگزاری

در انجام این طرح از مساعدت و همکاری موثر معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، ریاست مرکز تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی خراسان رضوی، مدیریت شیلات استان خراسان رضوی و کارشناسان شایسته تکثیر و پرورش آبزیان خراسان رضوی جناب آقایان مهندس نکویی و مهندس مهدیزاده برخوردار بودیم که بدین‌وسیله از مساعدت آنان تشکر و قدردانی می‌شود.

داشت (۵۹). محتوای بالای گلیکوژن و کربو هیدرات در غذای زنده ممکن است ساخت و ترشح آمیلاز را تحریک نماید که احتمالاً این امر می‌تواند عامل افزایش این آنزیم باشد که با نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز، درلارو ماهی سفید تغذیه شده از ناپلی آرتمیا مطابقت داشت (۳۴).

ارائه راهکارهای جدید برای بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۴۲). وجود باکتری‌های مفید در روده ماهیان از جمله لاکتو باسیل‌ها به جهت عملکرد آنها در تولید اسیدهای چرب، افزایش جذب مواد معدنی و ساخت ویتامین‌ها به‌ویژه خانواده B و نیز در کاهش یا محدود شدن باکتری‌های مضر روده‌ای از طریق رقابت غذایی یا رقابت در محل اتصال در روده مهم شمرده می‌شوند (۳۱). مطالعه حاضر فلور باکتریایی روده ماهیان تغذیه شده با غذای توپیفکس پرورشی اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به دو تیمار دیگر نشان داد که در این تیمار اثرات مفید تعداد زیاد لاکتوباسیل‌ها در روده ماهیان به سبب وجود غذای زنده (۱۴) از دلایل ضریب تبدیل غذایی بهتر در تیمار حاوی پودر توبی فکس پرورشی می‌تواند باشد و همچنین افزایش میزان اسیدلاکتیک در روده نیز موجب کاهش pH محیط داخلی روده و موجب جذب مواد مغذی، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و نهایتاً افزایش رشد خواهد شد (۶۰). البته چنین اطلاعاتی در خصوص اثر پودر توپیفکس پرورشی روی سیستم‌های ایمنی ماهیان زینتی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیقات نشان داد تهیه و به‌کارگیری کرم توپیفکس در محیط

منابع

1. Abedian Kenari, A., and M. K. Mirzakhani. 2005. Effects of Using Artemiaurumiana Enriched with n-3 HUFA in First Feeding of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Larvae. Caspian Journal of Environmental Sciences, 3: 123-129.
2. Adel, M., R. Safari, H. Monji, and M. Faraei. 2014. Influence of different level of Mentha piperita on growth, survival and fish larvae white carcass composition (*Rutilus frisii kutum*). Aquatic Ecology Journal, 5(1):95-102.
3. Agradi, E., G. Abrami, G. Serrini, D. Mckenzie, C. Bolis, and P. Bronzi. 1993. The role of dietary N-3 fatty acid and vitamin E supplements in growth of sturgeon (*Acipenser naccarii*) Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 105: 187-195.
4. Agradi, E., G. Abrami, G. Serrini, D. Mckenzie, C. Bolis, and P. Bronzi. 1993. The role of dietary N-3 fatty acid and vitamin E supplements in growth of sturgeon (*Acipenser naccarii*) Comp. Biochemistry and Physiology, Part A 105: 187-195.
5. Ako, H., C. S. Tamani, P. Bass, and C. S. Lee. 1994. Enhancing the resistance to physical stress in larvae of Mugil cephalus by the feeding of enriched *Artemia nauplii* Aquaculture, 122:81-90.
6. Alishahi, M., M. M. Ranjbar, M. Ghorbanpour, R. Peyghan, M. Mesbah, and M. Razi Jalali. 2010. Effects of dietary Aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). International Journal of Veterinary Research, 4(3): 189-195.
7. AOAC, 1995. Official methods of analysis of AOAC, VOL.1, 15TH edn. the Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
8. Armando, A. 2009. Fecundity, growth, and survival off the angelfish pterophyllum scalar under laboratory

- condition, 99(4): 741-746.
9. Avella, M. A., I. Olivotto, G. Gioacchini, F. Maradonna, and O. Carnevali. 2007. The role of fatty acids enrichments in the larviculture of false percula clownfish *Amphiprionocellaris*. *Aquaculture*, 273: 87-95.
 10. Azari Takami, G., H. Mahmoodzadeh, and Z. Grailou. 2001. Survey of the stability of n-3 highly nsaturated fatty acids following enrichment of Artemia by various oil and subsequent starvation. *International Workshop on Artemia*. Urmia-Iran. 12-1May. 13.
 11. Azimirad, M., M. Meshkini, N. Ahmadifard, and S. H. Hoseinifar. 2016. The effects of feeding with symbiotic (*Pediococcus acidilactici* and *fructooligosaccharide*) enriched adult Artemia on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*pterophyllum scalare*). *Fish and Shellfish Immunology*, 54:516.
 12. Bahmani, M., F. Askarian, A. Matinfar, A. Kousha, K. Khorshidi, and A. Shenavar. 2008. Diversity of Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Tracts of Reared Beluga (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3(5):302-311.
 13. Blanchard, G., J. G. Makombu, and P. Kestemonte. 2008. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 on growth performance, fatty acid composition a hepatic ultrastructure in Eurasianperch, *Perca fluviatilis* L., *Aquaculture*, pp.144-150.
 14. Boesen, H. T., K. Pedersen, J. Larsen, C. Koch, and A. E. Ellis. 1999. *Vibrio anguillarum* resistance trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopoly-saccharide. *Infection and Immunity*, 67(1): 294-301.
 15. Boshra, H. L. J., and J. O. Sunyer. 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20(2): 239.
 16. Burr, G., and D. Gatlin. 2006. Microbial Ecology of the Gastrointestinal tract of Fish and the potential Application of prebiotics and probiotics in *Finfish Aquaculture*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4): 425-437.
 17. Copeman, L. A., C. C. Parrish, J. A. Brown, and M. Harel. 2002. Effects of docosa hexaenoic eicosa pentaenoic, and arachidonicacids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): A live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210: 285-304.
 18. Demers, N. E., and C. J. Bayne. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasmlysozyme in rainbow trout. *Dev Comp Immunol*, 21:363-73.
 19. Dhert, P., L. Lim, W. Yen Chew, V. Dermaux, H. Nelis, and P. Sorgeloos. 2004. Vitamin C Enhancement of Stress Resistance of the Guppy (*Poecilia reticulata*) through Feeding with Supplement. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(1): 32-40.
 20. Dixon, B., and R. J. M. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and in-nate immunity in *teleost fish*. *Developmental and Comparative Immunology*, 25: 683-700.
 21. Dorjani, M., M. Mohammadzadeh khoshro, M. SHamsaeimehrjan, and Y. Abdollahtabar. 2014. Studying the effects of live food and commercial on growth and survival of azad fish larvae (*Salmotrutta caspius*), 2(2): 23-34.
 22. Ebrahimi Dorche, E., M. R. Hemami, M. Nemati, and R. Sefaderani. 2009. Comparison of cultivated tubifex worm (*Tubifex tubifex*) in the bed of lettuce and cow manure. *History of Biology in Iran*, 22(1): 103-110.
 23. Ebrahimi, E., N. Agh, and M. Yaghoobi. 2015. Use of enriched of with LC - PUFA on survival and resistance to pH stress of anjel fish (*Peterophyllum scalare*). *Journal of Fisheries in Iran*, 24 (2):77-86.
 24. Farahi, A., and M. Sodagar. 2015. Effects of different levels of dietary immunogen prebiotic on reproductive indices of angel fish breeders (*Pterophyllum scalare*) and Evaluation of the survival of the larvae in the face of stress the sudden increase in temperature. *Ornamental Aquatic Science Magazine*, 2(4):1-9.
 25. Farhangi, M., and C. G. Carter. 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research*, 32(Supplemented 1): 329-340.
 26. García-Alonso, J., C. T. Müller, and J. D. Hardege. 2008. Influence of food regimes anseasonality on fatty acid composition in the ragworm. *Aquaticbiology*, 4(5): 7-13.
 27. Garsia-Ollua, M., and H. J. Gomez-Romero. 2005. Growth of angel fish (*pterophyllumscalare*) juveniles Fed inert diets. *Avances en Investigacion Agropecuaria*, 9(3):49-60.
 28. Gazerani Farahani, Sh. 2009. The survey of amount of hematological factors in *Acipenseridae* family. *Journal of Animal Biology*, 2(1): 57-61. (In Persian).
 29. Ghaedi, A., H. Hoseinzadeh Sahafi, and D. Zargham. 2015. Role of nutrition in improving fish immuno system Efficiency. *Quarterly Journal of Ornamental Aquatic*, 1(4):21-28.
 30. Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis, and A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex*, during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381-387.
 31. Hassantabar, F., H. Oraj, and S. S. Babaei. 2012. Studying the activity anzymes digestion of alkaline phosphatase, alkaline phosphatase and amylase, in larvae fish white (*Rutilus frisiikutum*) fed of artemianauplii. *Research Science Animal Biology*, 5(2):25-33.

32. Higgs, D. A., B. S. Dosanj, A. F. Prendergast, R. M. Beams, R. W. Hardy, W. Riley, and G. Deacon. 1995. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In: Sessa, D. J. & Lim. C. (Eds), Nutrition and Utilization technology in Aquaculture. AOAC Press, 22: 130-156.
33. Hoseinifar, S. H., Z. Roosta, A. Hajimoradloo, and F. Vakili. 2015. The effects of lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*xiphorushellri*). Fish and Shellfish Immunology, 42:533-538.
34. Irianto, A., and B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Wal-baum). Journal of Fish Diseases, 25:333-342.
35. Jafari kenari, S. S., and B. Edhami. 2015. Comparison feed of diet biomar, shrimp, blood worm on growth performance, survival and parameter blood in larvae Joel (*Hemichromis bimaculatus*). Two Quarterly Reproduction Quarterly, 3(7):43-52.
36. Kakade, M. L., D. E. Hoffa, I. E. Leiner. 1973. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. Journal of Nutrition, 103: 1772-1778.
37. Koven W. M., R. J., Henderson, and J. R. Sargent. 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): I. Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. Fish Physiology and Biochemistry, 13: 69- 79.
38. Lavens, P., and P. Sorgeloos. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO. Fisheries Technical paper, 181:295-361.
39. Lietz, D. M. 2004. Potential for aquatic oligochaetes as live food in commercial aquaculture. Hydrobiology, 155: 309-310.
40. Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20(2):137-151.
41. Mahious, A. S., and F. Ollevier. 2005. Probiotics and prebiotics in aquaculture: Review. 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use in Larviculture, 17-26.
42. Mahious, A. S., J. Van Loo, and F. Liefbrig. 2007. Inulin and oligofructose in aquaculture: A review. Aquaculture Europe, 14:326-327.
43. Mandal, B., A. Mukherjee, and S. Banerjee. 2010. Growth and Pigmentation Development efficiencies in fantail guppy, *Poecilia reticulata* fed with Commercially available feeds. The Agriculture and Biology Journal of North America, 1(6):1264-1267.
44. Martinez-Porchas, M., M. Hernandez-Rodriguez, J. Davila-Ortiz, V. Vila-Cruz, and J. R. Ramos Enriquez. 2011. A preliminary study about the effect of benzo[a] pyrene (BaP) injection on the thermal behavior and plasmatic parameters of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) acclimated to different temperatures. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 6: 76-85.
45. Martino, R. C., J. E. P. Cyrino, L. Portz, and L. C. Trugo. 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. Aquaculture, 209:233-246.
46. Mauri, I., A. Romero, L. Acerete, S. Mackenzie, N. Roher, A. Callol, I. Cano, M. C. Alvarez, and L. Tort. 2011. Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. Fish and Shellfish Immunology, 30(1): 182-188.
47. Mohammadnejad shamshaki, M., S. Heydari, and S. H. MousaviSabet. 2011. Nutritional comparison of Biomar, Celery, Compact worm, Blood worm, Gammarus and Artemia on growth and survival indices of severom fish (*Heros Severus*). Quarterly Journal Research, 3(3).
48. Mousavi sabet, H., H. Ershadilangroodi, and B. Falahatkar. 2009. The effect of Artemia Urmiana enriched with Non- Saturated Fattyacid and Ascorbic Acid on the productivity of reproductive angel fish production (*Pterophyllum scalare*). Naval Science and Marine Science, 1(1):61-69.
49. Neissi A., G. Rafiee, M. Nematollahi, and O. Safari, 2013. The effect of *Pediococcus acidilactici* bacteria used as probiotic supplement on the growth and non-specific immune responses of green terror, *Aequidens rivulatus*. Fish and Shellfish Immunology, 35: 1976-1980.
50. Petrović, S., B. Ozreti, and M. Krajnovic-Ozretic. 1996. Cytosolic aspartate aminotransferase from grey mullet (*Mugil auratus* Risso) red muscle: Isolation and properties. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 28(8): 873-881.
51. Rahmani Mazari, M. 2014. Evaluate the effects feed with Chironomidae larvae and concentrate feed on the growth performance, feed efficiency, survival rate and maturation in rosy barb (*Puntius conchonius*). Master of Science.
52. Rajabipour, F., D. Shahsavani, A. Moghimi, S. Jamili, and N. Mashaii. 2009. Comparison of serum enzyme activity in great sturgeon, *Huso huso*, cultured in brackish and freshwater earth ponds in Iran. Comparative ClinicalPathology, 19: 301-305.
53. Rao, J. V. 2006. Toxic effects of novel organo phosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 86(2): 78-84.
54. Safari, O., D. Shahsavani, M. Paolucci, and M. M. S. Atash. 2014. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements on the growth performance, nutrient digestibility, immune responses and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 182. Aquaculture, 432:

- 192-20.
55. Sales, J., and P. J. Janssens. 2003. Nutrition requirement of ornamental fish. Review, Aquatic Living Resources, 16: 533-540.
56. Schley, P. D., and C. J. Field. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. British Journal of Nutrition, 87: 221-230.
57. Segner, H., R. Rosch, H. Schmidt, and K. Von Poeppinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. Journal of Fish Biology, 35: 249-63.
58. Shahsavani, D., M. Mohri, and H. Gholipour Kanani, 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus* Pallas. Fish Physiology and Biochemistry, 36: 39-43.
59. Shalaby, A. 2005. The opposing effect of ascorbic acid (Vitamin C) on Ochratoxin toxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Philipines, 2(3): 150-157.
60. Siwicki, A. K., and D. P. Anderson, 1993. Immuno stimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden, 13:87-91.
61. Sotoudeh, E., A. Abedian Kenari, and M. Habibi Rezaei. 2011. Growth response, body composition and fatty acid profile of *Caspian brown trout* palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid. Lipids, 35:633-664.
62. Stickney, R. 2000. Encyclopedia of aquaculture. John Wiley and Sons, Inc, United State of America, 1063p.
63. Tamaru, S., and H. Ako. 2003. Enrichment of Artemia for use in fresh water ornamental fish production. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication, 48p.
64. Tatina, M., Z. A. Pazhand., and M. GHaribkhani. 2010. The effect of using dafnia powder and nereis worm on food rations and some indices of *Acipenser Persicus* larvae. Journal of Sea Biology, 2(7):27-36.
65. Waley, K., and J. North. 1997. Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. in: A. W. Dodds, and R. B. Sim, editors. Complement: a Practical Approach. Oxford University Press, Great Britain, 296 p.
66. Worthington, C. C. 1991^a. Worthington enzyme manual related Biochemical. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, 46(4): 38-42.
67. Worthington, C. C. 1991^b. Worthington enzyme manual related Biochemical. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, 34: 212-215.
68. Yufera, M., and M. J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture Journal, 268(1-4): 53-63.
69. Zilberga, D., R. Ofira, T. Rabinskib, and A. Diamantc. 2004. Morphological and genetic characterization of swimbladder non-inflation in angel fish *pterophyllum scalare* (cichlidae), Aquaculture, 230:13-27.



Comparison of Cultivated Tubifex Worm (*Tubifex tubifex*) Powder and Commercial Tubifex Worm on Growth Performance and Immunity Indices in Angel Fish (*Pterophyllum scalare*) Resistance to Air exposure Challenge Stress

M. Barkhordar¹- R. Valizadeh²- O. Safari³- M. R. Ahmadi⁴- A. A. Naserian²

Received: 03-06-2017

Accepted: 14-08-2017

Introduction The aquaculture industry in the world, with an 8-million-dollar transaction rate, has 8% growth annually. It also has the most value-added rate among different fishery activities based on the food and Agriculture Organization (FAO). The angelfish belonging to Cichlid family, is known as a famous species in this industry. This fish feeds on various live feedstuffs. Regarding the significance of suitable feedstuffs in aqua feed industry, the live feeds used to provide nutritional requirements, immunity tuning and stimulation will be of important. Tubifex worm, containing considerable crude protein, diverse sorts of amino acids and essential fatty acids, has a deserving role and checking the nutritional value of Tubifex worm with aim of improving the growth performance, boosting immune responses and survival rate, reducing expenditure cost and increasing productivity is so crucial. The objective of the current experiment was to compare the effect of the cultured and commercial Tubifex worm powder in the diet of juvenile angelfish on growth performance and immune responses.

Materials and methods The experimental rations included 3 rations: 1) control ration as pellet 2) commercial Tubifex powder as freeze-dried food and 3) the rations containing mass-produced Tubifex as freeze-dried food. One-hundred thirty five Angel fishes with an average initial weight of 0.2 ± 0.5 gr were tested for 63 days. The fishes were placed randomly into nine 920 liter-capacity of 15 fishes. The average temperature was ($27 \pm 1^\circ\text{C}$), pH (7.5 ± 0.1) and dissolved oxygen (7.68 ± 0.35) was regulated according to required conditions. The length of light-dark cycles was considered 14 and 10 hours, respectively. The fishes were fed 3% body weight in three times a day (7, 13 and 20). Biometry was conducted at 1st, 31st and 63rd days and the criteria related to the growth performance, nutrient utilization efficiency and survival rate were computed.

At the end of the experimental period, five samples were taken from each aquarium, exposed to the air-challenge for 3 min and bleed 3 h after challenge. After that, biochemical analyses including trypsin, amylase and lipase were measured by using benzoyl-arginine p-nitroanilide substrate, starch and olive oil as substrate, respectively through titration method. At the end of the experimental period, total immunoglobulin, lysosome and complement, liver enzymes including ALT and AST were measured by kinetic enzymatic method and the microbial parameters including (plate count agar, and lactobacillus count) were measured. Chemical analysis of experimental diets including crude protein by Kjeldahl method, crude fat by Soxhlet extractor and ash by electrical furnace were measured. Normality Test of was done by Shapiro-wilk test. Analysis of alterations in growth performance, nutritional and biochemical factors were done by one-way analysis of variance (ANOVA) and comparing means based on Duncan multiple test using SPSS software, version 19.0.

Results and Discussion The highest rate of final weight (about 30%), initial length (about 14%) and the rate of special growth (about 27%) were belonged to the angel fishes fed on the diet containing cultured Tubifex. The activity of the immunity parameters including total immunoglobulin, lysosome as well as complement were also significantly higher in the treatment with the diets containing Tubifex after air exposure challenge. The activities of the lipase, protease and amylase increased in the culturing Tubifex treatment in compared with two other ones. The number of the intestinal lactobacillus indicated that the most colonies forming unit of lactobacillus was significantly higher in angel fish fed the diet containing cultured Tubifex treatment. The results indicated that the angel fishes fed on the cultured Tubifex showed higher weight increment, special growth rate, survival rate as well as better nutrient utilization efficiency which may be attributed to the existence of higher rate of protein, unsaturated fatty acids

Improvement of the immunity in fish fed the diet containing cultured Tubifex can be related to the role of

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Faculty of Natural Resources and Environment, University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Professor of Health and Aquatic Diseases. Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

(*- Corresponding author email: valizadeh@um.ac.ir)

lysosome as an important factor in natural perseverance for fishes, immunoglobulin as an important factor in antibody secretion as well as complement which has a basic role in acquired natural immunity for the fishes. The enzymes ALT and ALP which have an important role in using amino acids in oxidation process The increase of intestinal LAB count in angel fish fed the cultured Tubifex can be enhanced absorbing nutrients, disease resistance and finally, higher growth performance Considering the higher mortality rate among the larvae in the first 20-30 days and the initial time of the active feeding because of changing the nutritional modes, use of Tubifex worm powder as a live food may be effective in better growth function, external form as well as promotion of immunity system for the fishes.

Conclusion Feeding the angel fishes on cultured Tubifex worm powder especially in the initial steps of the active feeding may result in improvement in growth performance and some specific and nonspecific immune responses.

Keywords: Tubifex Worm, Growth performance, Angel Fish (*pterophylum scalare*)

Contents

Ruminant nutrition

Determining Chemical Composition and Nutritional Value of Tomato Shoot Silage Supplemented with Different levels of Beet Pulp by Using Nylon Bag and *in vitro* Gas Production Method 162

A. Naserian- R. Khodaverdi- R. Valizadeh- A. Tahmasbi

The Effect of pH and Fennel, Pine and Eucalyptus Essential Oils on Rumen Fermentation Properties (*in vitro*) 177

A. Vakili- S. Saki- M. Danesh Mesgaran- F. Alipour

The Effects of Bacterial Inoculant and Prebiotic Additive on Chemical Composition, Gas Production and Aerobic Stability of Corn Silage 192

S. Alaei Baher- H. Mohammadzadeh- A. Taghizadeh- A. Hoseinkhani

Determination of Nutritive Value of Seven Species of Alfalfa Weeds Using *in vitro* Techniques 207

M. Dadashi- A. Hosseinkhani- H. Mohammadzadeh

Poultry nutrition

Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Post- molting Diet of Laying Hens on Egg Production 222

Performance and Egg Quality during Different Storage Times

S. A. Mirghelenj- L. Fathollahzadeh- R. Kianfar- M. Olyae

The Performance and Egg Quality Parameters Effect of Pomegranate Pulp on of Laying Hens in Peak Production 235

S. J. Hosseini-Vashan- T. Ghaznavi

Genetic and breeding

Estimating the Effective Population Size of Sangsari Sheep Using Different Methods Based on Pedigree Analysis 246

M. R. Sheikhlou- E. Abdi Ghezeljeh- R. Safari- Z. Nemati

Gene Expression Network Analysis on Angiogenesis Pathway in Low Temperature-Induced Ascites Susceptible Chickens in B-line Pedigree of Iranian Meat-Type Strain, Arian 261

V. Taghizadeh- M. R. Nassiri- M. Tahmoorespur- M. R. Bakhtiarizadeh- A. Javadmanesh

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Kerman Province's Dairy Cows using Microbial Culture, PCR and Nested PCR Methods 272

M. Soltani

Nucleotide Sequence Analysis of Phylogenetic and Evolutionary Status of Leptin Gene in Camel 284

M. Piri- Gh. R. Dashab- B. Asghari

Physiology

Antioxidant Effect of Melatonin on Arabic Ram Semen Parameters after Freeze - Thawing Process 295

S. Mohamadi- M. Mamouei- S. Tabatabaei Vakily- J. Fayazi

Other

Comparison of Cultivated Tubifex Worm (*Tubifex tubifex*) Powder and Commercial Tubifex Worm on Growth Performance and Immunity Indices in Angel Fish (*pterophylum scalare*) Resistance to Air exposure Challenge Stress 309

M. Barkhordar- R. Valizadeh- O. Safari- M. R. Ahmadi- A. A. Naserian