



عنوان مقالات

- تغذیه نشخوارکنندگان
معرفی مدل خطی تخمین انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای با استفاده از اجزای الیاف ۲۶۵
حسین غلامی و محمد بابایی
- ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آئومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه
در شرایط برون تنی ۲۷۷
محسن مجتهدی، محسن دانش مسگران، مجید حیاتی آشتیانی، سید علیرضا وکیلی و سید مرتضی وقار سیدین
- ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری
شده با پرتو میکروویو ۲۹۱
سیدروح اله ابراهیمی محمودآباد، علی نیکخواه و علی اصغر صادقی
- اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی بر عملکرد، رشد اسکلتی، فعالیت تغذیه، فراسنجه‌های خونی و
ایمنی در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین ۳۰۷
مهدی جمالی، فرزاد میرزایی آقچه قشلاق، جمال سیف دواتی، بهمن توندشاد، رضا سید شرقی و رقیه ولی‌زاده یونجالی
- تغذیه طیور
بررسی تأثیر نانوذرات سلنیوم بر عملکرد، وضعیت آنتی اکسیدانی، فراسنجه‌های خونی و پایداری اکسیداتیو تخم مرغ
در مرغان تخم‌گذار ۳۲۳
امیرحسین شفیعی، مختار فتحی و تیمور تنها
- تأثیر سلنیوم به همراه ویتامین E بر عملکرد تولیدی، پاسخ ایمنی و متابولیت‌های خونی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار ۳۳۷
حسین احمدیان، ذبیح اله نعمتی، امیر کریمی، رشید صفری، محمدرضا شیخلو و مقصود بشارتی
- ژنتیک و اصلاح
طراحی ساختار پروتئینی آنزیم رانپیرناز به عنوان ایمونوتوکسین براساس ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با استفاده از
مطالعات دینامیک و استاتیک مولکولی ۳۵۱
حمید آریان‌نژاد، محمدرضا نصیری، علی جوادمنش، شاهرخ قویتی، حسام دهقانی و احمد آسوده
- تجزیه و تحلیل ژنتیکی صفات تولیدی گاوهای هلشتاین ایران با در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی ۳۶۱
یحیی خالقی‌فرد، محمد رکوئی، احمد مقیمی اسفندآبادی و هادی فرجی آروق
- آنالیز بیوانفورماتیکی اثر پروتئین و پپتیدهای زیست‌فعال SI کازئین شیر انسان بر مهار آنزیم ACE و هپاتیت آن با
گونه‌های مختلف پستانداران ۳۷۳
حجت الله یامی، مجتبی طهمورث پور و مرجان ازغندی
- تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی ۳۸۷
حیدررضا سیدآبادی، خدیجه نصیری، زهرا رoudباری، سیدعبدالله حسینی و ابوالفضل اکبری
- سایر
بررسی عملکرد هفت هیبرید کرم ابریشم در تربت‌حیدریه ۳۹۹
مسعود علی پناه، ذبیح الله عابدیان، عبدالعظیم نصیری و فرید سرجمعی

Contents

- Ruminant Nutrition**
Introducing a linear model for estimating forage sorghum metabolizable energy by using fiber
components 275
Hossein Gholami and Mohammad Babaei
- Effect of aflatoxin B1 and aluminosilicate toxin adsorbents on the parameters of gas production,
fermentation and ruminal digestion *in vitro* 288
Mohsen Mojtahedi, Mohsen Danesh Mesgaran, Majid Hayati-Ashtiani, Seyed Alireza Vakili and Seyed
Morteza Vaghar Seyedin
- Chemical composition and ruminal dry matter and protein degradation parameters of canola meal
treated by microwave irradiation 304
Sayyed Roohollah Ebrahimi, Mahmoudabad, Ali Nikkhar and Ali Asghar Sadeghi
- Effect of different levels of probiotics and organic acid supplements on performance, skeletal growth,
nutrition activity and blood and immune metabolites in Holstein calves 321
Mehdi Jamali, Farzad Mirzaei, Aghajeh gheslslag, Jamal Seifdavati, Bahman Navidshad, Reza Seyedshariif
and Roghaye Valizadeh Yonjali
- Poultry Nutrition**
Effect of selenium nanoparticles on performance, antioxidant status, blood parameters and oxidative
stability of eggs in laying hens 334
Amir Hossein Shafiei, Mokhtar Pathi and Timour Tanha
- Effect of selenium with vitamin E on production performance, immune response and blood
metabolites of laying Japanese quail 348
Hossein Ahmadian, Zabehollah Nemati, Amir Karimi, Rashid Safari, Mohammad Reza Sheeikhlo and
Maghsoud Besharati
- Genetic and Breeding**
Designing of Protein Structural of Ranpirinase Based on Bovine Pancreatic Ribonuclease with Using
Molecular Dynamic and Static Simulation 359
Hamid Ariannejad, Mohammadreza Nassiri, Ali Javadmanesh, Shahrokh Ghovvati, Hesam Dehghani
and Ahmad Asoudeh
- Genetic analysis of production traits in Iranian Holstein cows considering genetic grouping 371
Yahya Khaleghi fard, Mohammad Rokouei, Ahmad Moghimi Esfand Abadi and Hadi Faraji-Arough
- Bioinformatics Analysis of Human Milk Protein and Bioactive Peptides alpha s-1 casein
Effect on Inhibiting ACE Enzyme and Its Comparison In Different Mammalian Species 384
HojatallahYami, Mojtaba Tahmoorepur and Marjan Azghandi
- Effect of Different Levels of Methionine on Immune Function and IFN- γ Gene Expression in Broilers
Chickens 397
Hamidreza Seyedabadi, Khadijeh Nasiri, Zahra Roudbari, Seyyad Abdollah Hosseini and Abolfazl Akbari
- Other**
Performance of seven silkworm varieties in Torbat Heydarieh 408
Masoud Alipanah, Zabihoallah Abedian, Abdolazim Nasiri and Farid Sarjamei

نشریه علمی

پژوهشهای علوم دامی ایران

با شماره پروانه ۳۶۵۵ در تاریخ ۸۷/۸/۱۹ از وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی و درجه علمی-پژوهشی به شماره ۳/۳۱۴۹ در تاریخ ۸۹/۴/۳۰ از وزارت علوم تحقیقات و فناوری (از جلد ۱ سال ۱۳۸۸)

بر اساس مصوبه وزارت عتف از سال ۱۳۹۸، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند.

جلد ۱۲ شماره ۳ پاییز ۱۳۹۹

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر حسن نصیری مقدم

سرمدیر: 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 مرتضی چاجی	دانشیار تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
دکتر حسن نصیری مقدم	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر ابوالقاسم گلیان	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 احمد حسن آبادی	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر بهروز دستار	استاد تغذیه طیور	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر جواد ضمیری	استاد فیزیولوژی حیوانی	دانشگاه شیراز
دکتر نصراله پیرانی	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه شهرکرد
دکتر محمدرضا نصیری	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر مجتبی طهمورث پور	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر سعید زره داران	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر مهدی سرگلزایی	دانشیار ژنتیک	دانشگاه گولف، کانادا

ناشر: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

چاپ: چاپخانه دانشگاه فردوسی مشهد

نشانی: مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، دبیرخانه نشریات علمی، دفتر نشریه پژوهشهای

علوم دامی ایران. صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۱۶۳

نمابر: ۰۵۱-۳۸۷۸۷۴۳۰

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

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

صفحه	تغذیه نشخوار کنندگان
۲۶۵	معرفی مدل خطی تخمین انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای با استفاده از اجزای الیاف حسین غلامی و محمد بابایی
۲۷۷	ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی محسن مجتهدی، محسن دانش مسگران، مجید حیاتی آشتیانی، سید علیرضا وکیلی و سید مرتضی وقار سیدین
۲۹۱	ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با پرتو میکروویو مهدی روح اله ابراهیمی محمودآباد، علی نیکخواه و علی اصغر صادقی
۳۰۷	اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی بر عملکرد، رشد اسکلتی، فعالیت تغذیه، فراسنجه‌های خونی و ایمنی در گوساله‌های شیر خوار هلشتاین شیر خوار، فرزاد میرزایی آقچه قشلاق، جمال سیف دواتی، بهمن نویدشاد، رضا سید شریفی و رقیه ولی‌زاده یونجالی
	تغذیه طیور
۳۲۳	بررسی تأثیر نانوذرات سلنیوم بر عملکرد، وضعیت آنتی اکسیدانی، فراسنجه‌های خونی و پایداری اکسیداتیو تخم مرغ در مرغان تخم‌گذار امیرحسین شفیعی، مختار فتحی و تیمور تنها
۳۳۷	تأثیر سلنیوم به همراه ویتامین E بر عملکرد تولیدی، پاسخ ایمنی و متابولیت‌های خونی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار حسین احمدیان، ذبیح اله نعمتی، امیر کریمی، رشید صفری، محمدرضا شیخلو و مقصود بشارتی
	ژنتیک و اصلاح
۳۵۱	طراحی ساختار پروتئینی آنزیم رائپیرناز به عنوان ایمونوتوکسین براساس ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با استفاده از مطالعات دینامیک و استاتیک مولکولی حمید آریان نژاد، محمدرضا نصیری، علی جوادمنش، شاهرخ قوتی، حسام دهقانی و احمد آسوده
۳۶۱	تجزیه و تحلیل ژنتیکی صفات تولیدی گاوهای هلشتاین ایران با در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی یحیی خالقی‌فرد، محمد رکوعی، احمد مقیمی اسفندآبادی و هادی فرجی آروق
۳۷۳	آنالیز بیوانفورماتیکی اثر پروتئین و پپتیدهای زیست‌فعال آلفا S1 کازئین شیر انسان بر مهار آنزیم ACE و مقایسه آن با گونه‌های مختلف پستانداران حجت الله یامی، مجتبی طهمورث پور و مرجان ازغندی
۳۸۷	تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی حمیدرضا سیدآبادی، خدیجه نصیری، زهرا رودباری، سیدعبدالله حسینی و ابوالفضل اکبری
	سایر
۳۹۹	بررسی عملکرد هفت هیبرید کرم ابریشم در تربت‌حیدریه مسعود علی پناه، ذبیح الله عابدیان، عبدالعظیم نصیری و فرید سرجمعی

دکتر سید هادی ابراهیمی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر قربانعلی اسدی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر فاطمه بحری بیناباج	دانشگاه گنبد کاووس
دکتر عطیه بهلولی قائن	دانشگاه پیام نور مشهد
دکتر مهدی بهگر	پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج. پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای
دکتر حسین جهانی	دانشگاه کرمانشاه
دکتر علی جوادمنش	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر آرش جوانمرد	دانشگاه تبریز
دکتر احمد حسن آبادی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر حیدر زررقی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محمدهادی سخاوتی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر سید داوود شریفی	دانشگاه تهران
دکتر محمدرضا شیخلو	دانشگاه تبریز
دکتر بلال صادقی	دانشگاه شهید باهنر کرمان
دکتر آیه سادات صدر	واحد بین الملل دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر حمیدرضا طاهری	دانشگاه زنجان
دکتر مسعود علی پناه	دانشگاه تربت حیدریه
دکتر یونس علی علی جو	دانشگاه ارومیه
دکتر مرضیه قدمی کوهستانی	شرکت کیمیا آنزیم
دکتر محمدرضا محمدآبادی	دانشگاه شهید باهنر کرمان
دکتر حمید محمدزاده	دانشگاه تبریز
دکتر مازیار محیطی اصل	دانشگاه گیلان
دکتر بهمن نویدشاد	دانشگاه محقق اردبیلی
دکتر محمود وطن خواه	دانشگاه شهرکرد

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 گردهمایی 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.

ت) 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، ویrgول و ... به درستی استفاده شود.
- ✓ رعایت نیم فاصله در کلمات ترکیبی و جمع مانند اندازه گیری، شده اند، می شود، می توان، نکته ها و ... ضروری است.
- ✓ معادله ها در متن مقاله باید به ترتیب از ابتدا تا انتها شماره گذاری شوند.
- ✓ واحدهای مورد استفاده در متن مقاله باید بر اساس سیستم بین المللی متریک (SI) باشد.
- ✓ تعداد پاورقی ها به حداقل برسد و شماره پاورقی ها در هر صفحه از عدد یک آغاز شود.

ث) 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 واژه های 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 علامت‌های عددی در بالا و سمت راست جمله‌ها، 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 نویس‌ها 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 dietaryon plasma metabolites (mg/dl)

متابولیت‌های پلاسما 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
آسپارات 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

میانگین‌های 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.

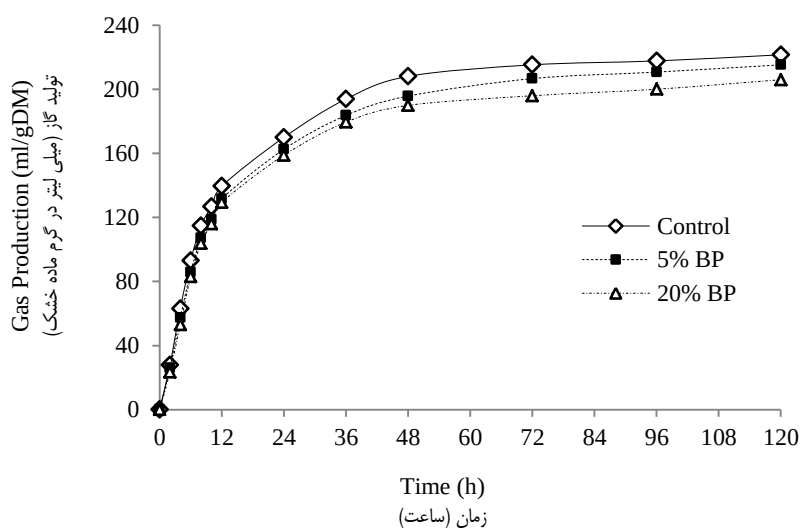
²Blood urea nitrogen

³Aspartate Aminotransferase

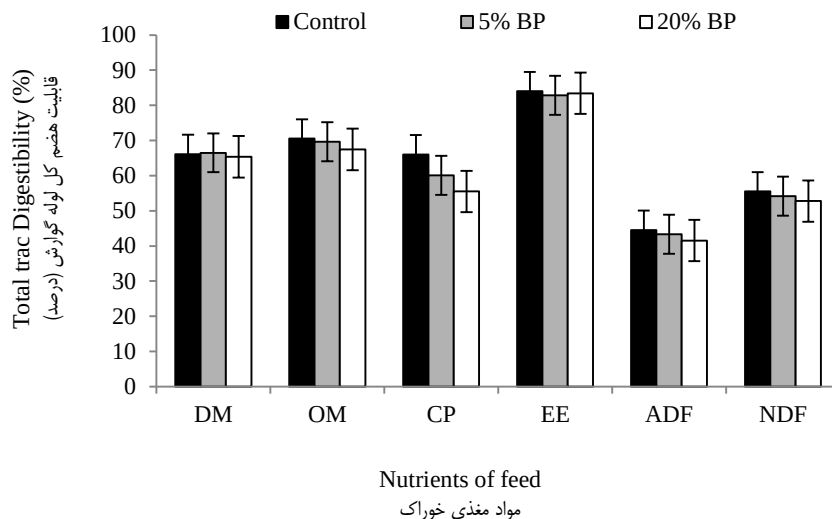
⁴Alanine Aminotransferase

⁵Low density lipoprotein

- ✓ **الگوی شکل باید دقیقاً مشابه با شکل‌های 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 ارایه 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 شکل‌ها 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 می‌توان 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 جیره‌بر 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). خیری 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 در انتهای منبع داخل پرانتز ذکر شود).**

۹-۱- نکات مهم درمورد نوشتن منابع

- ✓ نحوه نگارش منابع اتخاذ شده از نشریه های علمی، کتاب، همایش ها و یا درگاه الکترونیکی بایستی به صورت ذیل باشد.
- ✓ نام نشریه و یا همایش علمی باید به صورت کامل نوشته شود و از نوشتن مخفف آنها جداً خودداری شود.
- ✓ 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>.

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

بر اساس رویکرد دانشگاه فردوسی مشهد مبنی بر لزوم توجه به نظام‌های رتبه‌بندی و علم‌سنجی 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][illegible][illegible][illegible]

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



مقاله علمی - پژوهشی

معرفی مدل خطی تخمین انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای با استفاده از اجزای الیاف

حسین غلامی^{۱*} - محمد بابایی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۴

چکیده

این پژوهش به منظور تعیین انرژی قابل متابولیسم، ترکیبات شیمیایی و تولید معادلات رگرسیونی تخمین انرژی قابل دسترس سورگوم علوفه‌ای انجام گرفت. برای رسیدن به این مهم، با استفاده از ۵۴ داده انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از ۱۸ رقم سورگوم علوفه‌ای، معادلات خطی، درجه دوم و تابع نمایی حاصل از اجزای الیاف سورگوم علوفه‌ای شامل: درصد ADF، NDF و لیگنین سورگوم علوفه‌ای برازش شدند. کل معادلات حاصل از مقدار ADF و NDF و لیگنین دارای ضریب تعیین قابل قبولی بودند و دقت معادلات در حد متوسط بود. از بین معادلات فوق، معادله خطی حاصل از ADF به دلیل سادگی و تقریب نزدیکتر به ME تعیین شده سورگوم علوفه‌ای از طریق آزمون گاز، برای تخمین انرژی قابل متابولیسم پیشنهاد می‌شود ($ADF\% = 0.29 - 3/320 = \text{انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در هر کیلوگرم ماده خشک)}$). در مقایسه با معادلات خطی پیشنهادی معتبر بین المللی مانند منک و استین گاس و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع، معادله منک و استین گاس به انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای تعیین شده در این تحقیق نزدیکتر و تفاوت معنی داری نداشت. برای تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای، معادله خطی بالا به دلیل سادگی و تقریب نزدیکتر به ME سورگوم علوفه‌ای اندازه گیری شده، پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آزمون گاز، تخمین انرژی قابل متابولیسم، سورگوم علوفه‌ای، ADF

مقدمه

(مواد مغذی تشکیل دهنده آن) و قابلیت هضم مواد آلی همبستگی مثبت و بالایی دارد. ترکیبات شیمیایی را به راحتی می‌توان در آزمایشگاه‌های تغذیه با انجام آنالیز تقریبی و قابلیت هضم مواد آلی را از آزمایش‌های درون تنی^۳ و برون تنی^۴ تعیین کرد و از طریق این داده‌ها می‌توان به مقدار انرژی قابل دسترس هر ماده خوراکی برای دام دست یافت (۷، ۱۸ و ۲۲). تعیین انرژی قابل دسترس در خوراک‌ها رکن اصلی و مهم در علم تغذیه دام است و برای فرموله کردن یک جیره متوازن و متعادل برای تمام دامهای مزرعه‌ای ضرورت دارد (۲، ۱۳، ۱۵ و ۱۶).

انرژی قابل سوخت و ساز بیانگر بخشی از انرژی خام خوراک است که پس از کسر مقدار انرژی دفع شده از طریق مدفوع و ادرار و گازهای حاصل از هضم به مصرف حیوان می‌رسد (۳). امروزه از سیستم انرژی قابل متابولیسم که شکل اولیه آن در سال ۱۹۵۶ میلادی توسط شورای تحقیقات کشاورزی انگلستان برای نشخوارکنندگان ابداع شده، استفاده می‌گردد (۱۳). یکی از روشهای آزمایشگاهی تعیین انرژی مواد خوراکی، روش آزمون تولید گاز است.

ضرورت توجه به منابع جدید علوفه‌ای مقاوم به خشکی و نیز افزایش بهره‌وری از آب و خاک در فهرست اهداف بلند مدت وزارت جهاد کشاورزی قرار گرفته است. در این راستا سورگوم علوفه‌ای و دانه‌ای گیاهان مناسبی هستند که می‌توان آنها را در برنامه‌ریزیهای کشت قرار داد و به اشکال متفاوت در تغذیه دامها به کار برد (۸). کیفیت علوفه، به مجموع کل مواد مغذی تشکیل دهنده گیاهان علوفه‌ای اطلاق می‌شود که میزان مصرف دام از خوراک یا جیره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. کیفیت علوفه بستگی به ترکیب شیمیایی و قابلیت هضم آن دارد. کیفیت علوفه همبستگی مثبت و بالایی با انرژی قابل دسترس برای دام دارد (۲، ۱۳، ۱۵ و ۱۷). میزان انرژی زایی یک ماده غذایی با مقدار ترکیبات شیمیایی

۱- استاد یار پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲- مربی پژوهشی بازنشسته موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

(* - ایمیل نویسنده مسئول: (Email: Ho.gholami@areeo.ac.ir

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75350

3- In vivo

4- In vitro

مشترک المنافع^۶ (۲۰۰۷) با استفاده از مدل مینسون (۱۹۹۰) از ADF مواد خوراکی برای رسیدن به انرژی قابل متابولیسم استفاده کرد (۳).

$$ME (Mj/Kg DM) = ۱۶/۶۵۴ - ۰/۰۲۴ (ADF g/Kg DM) \quad (۳)$$

ویز در مقاله " تخمین انرژی قابل دسترس مواد خوراکی"، از اجزای تشکیل دهنده فیبر مواد خوراکی مانند NDF، ADF و لیگنین برای تخمین انرژی مواد خوراکی قابل دسترس دام مانند انرژی قابل متابولیسم، قابل هضم و خالص استفاده کرد. از این معادلات و با استفاده از ADF و NDF به عنوان متغیر مستقل برای تخمین انرژی مواد علوفه ای در آزمایشگاه‌های تغذیه استفاده می‌شوند (۲۲). اوزن و همکاران در یک مقاله جامع مروری نشان دادند که ADF حدود ۶۵ درصد میزان تغییرات انرژی در علوفه‌ها را باعث می‌شود (۲۰).

هدف از این تحقیق سنجش میزان ترکیبات شیمیایی و انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای و در نهایت تخمین میزان انرژی قابل متابولیسمی براساس مدل‌های خطی، نمایی و درجه دوم و بر اساس میزان ADF و NDF آنها بود.

مواد و روش‌ها

ارقام آزمایشی سورگوم در خرداد ماه ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی- آموزشی موسسه اصلاح و نهال و بذر در کرج کاشته شدند. سورگوم های آزمایشی در شهریور برداشت شدند. هر رقم در مزرعه در سه ردیف مجزا کاشته شده بودند. از هر رقم سورگوم علوفه ای ۳ نمونه یعنی جمعا حدود ۵۴ نمونه جمع‌آوری شد و به قطعات ۳ تا ۵ سانتی‌متری خرد شدند (۸).

نمونه‌های علوفه در آون تحت جریان هوا با دمای ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت (۷۲ ساعت) خشک شدند و پس از آسیاب کردن نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب داری الک یک میلی‌متری آسیاب و جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند. در نمونه های آزمایشی بعد از خشک و آسیاب شدن، ترکیبات مغذی شامل: پروتئین خام، خاکستر خام، ADF، NDF، کربوهیدرات‌های محلول در آب، نشاسته و لیگنین تعیین گردیدند. قابلیت هضم نمونه ها با روش آزمون گاز تعیین شد و با استفاده از مقدار گاز تولیدی در ساعت بیست و چهارم و مقدار پروتئین خام میزان انرژی قابل متابولیسم ارقام سورگوم تعیین شد. بعد از تعیین انرژی قابل متابولیسم از درصد NDF، ADF و لیگنین به عنوان متغیرهای مستقل استفاده و انرژی قابل متابولیسم برآورد شدند (۱۴، ۱۵).

نام و کد ارقام آزمایشی در جدول زیر آورده شده است.

این روش بر اساس اندازه گیری مقدار گاز آزاد شده در واحد زمان پایه گذاری شده است. مقدار انرژی تخمینی به دست آمده از این روش (پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون) همبستگی بسیار بالایی با مقدار انرژی به دست آمده از روش درون تنی دارد (۱۴).

گتاچو و همکاران (۶) نشان دادند که مقادیر انرژی موجود موادخوراکی در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا که از آزمون تولید گاز برای تخمین انرژی قابل متابولیسمی استفاده کرده‌اند یکسان نیست و تفاوت‌های وجود دارد. چون تعیین مستقیم انرژی قابل دسترس دام از مواد خوراکی نیاز به صرف زمان و هزینه زیادی دارد و چون انرژی قابل دسترس، رابطه مثبت و بالایی با برخی از ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده مواد خوراکی دارد، متخصصین علم تغذیه دام از اجزای تشکیل دهنده الیاف مانند NDF^۱، ADF^۲ و لیگنین برای تخمین انرژی مواد خوراکی استفاده کرده‌اند (۴، ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۹، ۲۰ و ۲۲). چون مقدار ADF گیاهان با میزان انرژی قابل متابولیسم رابطه مثبت و مستقیمی دارد، در اکثر منابع معتبر از ADF به عنوان یک متغیر مستقل برای تخمین انرژی قابل متابولیسم استفاده می‌شود. غلامی و همکاران، میزان ADF و انرژی قابل متابولیسم علوفه تازه سورگوم را به ترتیب برابر ۳۷/۴۰ درصد و ۲/۱۳ مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک گزارش کردند (۹، ۱۷). پایگاه فیدی پدیا^۳ وابسته به سازمان فائو^۴ و اینراه^۵ فرانسه متوسط میزان ADF و انرژی قابل متابولیسم علوفه تازه سورگوم را به ترتیب ۳۵ درصد و ۲/۳۶ مگا کالری در هر کیلو گرم ماده خشک ذکر کرده است (۲۳).

$$DE (Mcal/Kg DM) = ۴/۱۲۱ - ۰/۰۴۴۲ (\%ADF) \quad (۱)$$

هارلان و همکاران در یک آزمایش با یونجه، شیدر و ذرت سیلوشده از اجزای تشکیل دهنده الیاف مانند NDF، ADF و لیگنین برای تخمین انرژی قابل هضم مواد خوراکی استفاده کردند و ADF را بهترین متغیر مستقل برای تخمین انرژی قابل هضم یونجه معرفی کردند آنها پیشنهاد کردند که انرژی قابل هضم یونجه را می‌توان با رابطه ۱ واز درصد ADF یونجه به دست آورد (۱۰).

منک و استین‌گاس از ADF برای به دست آوردن انرژی قابل متابولیسم علوفه‌ها از معادله زیر استفاده کردند (۱۴).

$$ME (Mj/Kg DM) = ۱۴/۷۸ - ۰/۰۱۴۷ (ADF g/Kg DM) \quad (۲)$$

آنها مقدار ضریب تعیین (R^2) برای برآورد انرژی قابل متابولیسم مواد خوراکی از میزان ADF را از ۰/۵۲ تا ۰/۹۲ گزارش کرده اند (۱۴). و همچنین سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای

جدول ۱- اسامی ارقام سورگوم علوفه ای آزمایشی

Table 1-Names of experimental forage sorghum

شماره رقم	نام رقم	منبع تامین بذر
F1	CSSH.1	NAVAJOSEEDS
F2	اسپید فید	SPII
F3	FGCSI09	Euralis(ES)
F4	FS one BMR	NAVAJOSEEDS
F6	Juicy Sweet BMR SSH.1	NAVAJOSEEDS
F7	Juicy Sweet BMR SSH-.2	NAVAJOSEEDS
F8	تیتان	نگین سبز برنا
F9	سیلو کینگ	نگین سبز برنا
F10	PHFS-27	Pajpal
F11	PFS-21	Pajpal
F12	FGCSI10	Euralis(ES)
F13	FGCSI12	ES
F17	ساکارز-فتو - بی ام آر	NAVAJOSEEDS
F18	KFS-2	SPII
F19	KFS-18	SPII
F20	پگاه	SPII
17	HFS1	مؤسسه کنترل و گواهی بذر
18	Juicy sweet2	مؤسسه کنترل و گواهی بذر

مخصوص، مقدار ۳۰ میلی لیتر محلول تهیه شده به هرسرنگ وارد شد، با نگه داشتن سرنگ به صورت عمودی و فشار دادن پیستون هوای اضافی سرنگ تخلیه گردید و پس از آن مجدد گیره سرنگ بسته شد. زمان دقیق انجام تزریق هر سرنگ و حجم آن بلافاصله یادداشت و سپس سرنگ در دستگاه انکوباسیون با دمای ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شد. قرائت حجم گاز تولیدی در فاصله های زمانی ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت صورت پذیرفت.

برآورد انرژی قابل متابولیسم (ME)

مقدار انرژی قابل متابولیسم، با استفاده از حجم گاز حاصل از تخمیر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک در طول ۲۴ ساعت و با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (۱۴).

$$ME = \frac{2}{2} + \frac{0.1357(GP)}{0.0057(XP)} + \frac{0.0002859(XP)^2}{0.0002859(XP)^2} \quad (4)$$

که در آن ME، انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)، GP، حجم گاز تولیدی (میلی لیتر در ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک در ۲۴ ساعت انکوباسیون) و XP، پروتئین خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک) است.

روش های تجزیه آماری

برای مقایسه نتایج معادلات استاندارد معتبر بین المللی مانند منک و استین گاس و سازمان پژوهش های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (CSIRO) با معادلاتی که نگارندگان در این مقاله

تعیین ترکیبات شیمیایی

میزان خاکستر خام با سوزاندن نمونه ها در کوره الکتریکی و پروتئین خام با استفاده از روش کلدال تعیین شدند (۱). برای تعیین غلظت ADL و به منظور حل کردن سلولز موجود در ADF، نمونه های ADF به مدت سه ساعت در اسید سولفوریک ۷۲ درصد قرار داده شدند (۱).

کربوهیدرات های محلول در آب (WSC)

هنگامی که کربوهیدرات ها در مجاورت معرف انترون و در اسید سولفوریک حرارت داده شوند، کمپلکسی به رنگ سبز-آبی ایجاد می کنند که می توان به کمک رنگ ایجاد شده و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، غلظت کربوهیدرات های محلول را تعیین کرد. برای تعیین غلظت کربوهیدرات های محلول در نمونه ها، ابتدا عصاره گیری از نمونه ها انجام شد و سپس طبق شرح جزئیات روش کار کربوهیدرات های محلول در آب تعیین شد (۱).

تعیین انرژی قابل متابولیسم با روش تولید گاز (Gas test)

برای انجام این آزمایش، از روش منک و استین گاس^۱ (۱۹۸۸) استفاده شد. شیرابه شکمبه از گوسفندان نر فیستوله شده مغانی و قبل از خوراک دهی وعده صبح، گرفته شد (۱۴).

تزریق محلول نهایی به سرنگ ها و انکوباسیون

گیره هر سرنگ قبل از تزریق باز شد و با استفاده از پمپ

ارایه کرده‌اند از آزمون t جفتی استفاده شد. داده‌های مربوطه به صورت دو به دو با مدل زیر مقایسه آماری شدند.

$$T = D - 0 / SED$$

که در آن:

D = تفاضل هر جفت داده در مقایسه دو روش

SED = خطای معیار تفاضل داده‌ها

T = عدد تی استیودنت با درجه آزادی n-1 که n تعداد جفت داده‌ها می‌باشد.

برای مقایسه روش نمونه‌ای جفت شده از نرم افزار SPSS استفاده شد (۲۰).

برای برآزش معادلات جهت برآورد انرژی قابل متابولیسم بر اساس درصد NDF، ADF و لیگنین، با استفاده از نرم افزار SPSS معادلات خطی، درجه دوم و تابع نمایی برآزش شدند و متغیر مستقلی که بهترین R^2 را داشت انتخاب شد (۲۰).

نتایج و بحث

در جدول ۲ آمار توصیفی ترکیبات شیمیایی و انرژی قابل متابولیسم تعیین شده سورگوم علوفه‌ای آورده شده است. میانگین ماده خشک ۱۹/۵۴ است، ولی با حداقل مطلوب مورد نیاز برای سیلاژ مرغوب (۲۵ درصد) فاصله دارد (۲ و ۱۱). مقدار قند نیز که از بخش‌های مهم برای نشخوارکنندگان و تهیه سیلاژ در علوفه‌ها است و منابع معتبر در تغذیه دام حداقل ۵ درصد ماده خشک علوفه را ذکر کرده‌اند (۲ و ۱۳)، در این پژوهش حداقل ۸ درصد بود که برای تهیه سیلاژ پایدار و مرغوب در حد مناسبی است. انرژی قابل متابولیسم ۲/۴۰ مگا کالری در هر کیلوگرم ماده خشک تعیین شد که از میزان اعلام شده توسط غلامی و همکاران (۷ و ۹) و دیری وان^۱ (۴) بالاتر است که دلیل احتمالی آن می‌تواند وجود هیبریدهای سورگوم BMR^۲ در این آزمایش باشد.

میانگین NDF، ADF، لیگنین و انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای به ترتیب برابر ۶۰/۳۶، ۳۱/۱۶، ۱/۷۸ و ۲/۴۰ تعیین شد.

در جدول ۳ انرژی قابل متابولیسم تعیین شده از طریق روش گاز (واقعی) سورگوم علوفه‌ای با انرژی قابل متابولیسم تخمینی حاصل از دو معادله سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (مینسون) و منک و استین گاس به دست آمده از میزان ADF سورگوم به عنوان متغیر مستقل مقایسه شده است. مقایسه آماری داده‌های جفتی جدول نشان می‌دهند که معادله منک و استین گاس با ۲/۴۱ انرژی قابل متابولیسم تخمین بهتری در مقایسه با معادله سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع با

۲/۱۹ انرژی قابل متابولیسم در هر کیلوگرم ماده خشک، تخمین بهتری از انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای ارایه می‌دهد و تفاوت بین آنها خیلی معنی دار است.

مقدار تفاوت ۰/۲۱ بین انرژی قابل متابولیسم تعیین شده سورگوم و تخمینی از معادله مینسون زیاد و معنی دار است و نشان می‌دهد که این معادله تخمین خوبی از ME سورگوم به دست نمی‌دهد و برعکس معادله منکی (دومین جفت) نشان می‌دهد که با میانگین تفاوت ۰/۰۸ - تخمین خوبی از انرژی قابل متابولیسم سورگوم علوفه‌ای می‌دهد که میزان تفاوت هم معنی دار نیست.

در زیر شکل‌های رگرسیونی خطی، درجه دوم و تابع نمایی مربوط به انرژی قابل متابولیسم بر اساس درصد NDF و ADF نمونه‌های سورگوم به ترتیب آورده شده‌اند.

میزان R^2 در توابع خطی، نمایی و درجه دوم حاصل از درصد NDF سورگوم علوفه‌ای (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) در حد متوسط است و از معادلات تابعیت ADF (شکل‌های ۴، ۵ و ۶) پائین‌تر است. NDF حاوی سلولز، همی سلولز، لیگنین است که رابطه منفی با میزان ME علوفه‌ها دارند و این رابطه رگرسیونی برای بقولات (لگوم‌ها) و گراس‌ها متفاوت است. در علوفه بقولات قابلیت هضم ماده خشک، در میزان NDF مساوی، ۰/۱۶ واحد از گراس‌ها کمتر است.

ADF در بخش فیبری علوفه‌ها شامل سلولز و لیگنین است. در اکثر علوفه‌های بقولات و گراس‌ها میزان رابطه رگرسیونی قابلیت هضم ماده خشک (انرژی علوفه) با مقدار ADF رابطه منفی و مستقیم است ($r = -0.79$). عمده‌ترین مزیت ADF نسبت به NDF به عنوان متغیر مستقل در تعیین انرژی قابل دسترس علوفه‌ها، عدم وجود تفاوت در رابطه رگرسیونی برای بقولات (لگوم‌ها) و گراس‌ها است و این سبب می‌شود تا بتوان از یک معادله برای بقولات و لگوم‌ها استفاده کرد.

از بین متغیرهای مستقل آزمون شده، ADF بهترین تقریب را از مقدار انرژی قابل متابولیسم نشان داد. معادلات برآزش شده از ADF سورگوم علوفه‌ای در جدول پنج آورده شده است. ضریب تعیین (R^2) معادلات در برآورد انرژی قابل متابولیسم، برای معادلات خطی، درجه دو و نمایی متوسط و قابل قبول است و این معادلات در سطح یک درصد معنی دار هستند. تابع خطی به دلیل سادگی و تقریب نزدیکتر به ME سورگوم علوفه‌ای اندازه گیری شده، برای تخمین انرژی قابل متابولیسم پیشنهاد می‌شود.

$$ME (Mcal/Kg DM) = 3/320 - 0/29 (ADF\%)$$

1 - Dairy One

2- Brown Mid Rib

جدول ۲- آمار توصیفی ترکیبات شیمیایی سورگوم علوفه‌ای (درصد)

Table 2- Descriptive statistics of chemical compounds of eighteen forage sorghum cultivars

ترکیب شیمیایی Chemical composition	تعداد number	حداکثر Maximum	حداقل Minimum	میانگین Mean	اشتباه معیار Standard error	انحراف معیار standard deviation
ماده خشک Dry matter	54	31.64	13.00	19.54	0.53	3.93
پروتئین خام Crude protein	54	7.23	4.49	6.36	0.06	0.41
خاکستر خام Crude ash	54	9.20	4.80	7.20	0.14	1.02
لیگنین lignin	54	4.41	1.00	1.78	0.13	0.93
ADF Acid detergent fiber	54	41.60	3.55	31.16	0.72	5.29
NDF Neutral detergent fiber	54	70.95	53.25	60.36	0.49	3.57
قند (کربوهیدرات‌های محلول در آب) Water soluble carbohydrate	54	16.73	8.00	11.09	0.30	2.20
نشاسته starch	54	36.86	18.05	26.08	0.60	4.44
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک) Metabolizable energy (Mcal/Kg DM)	54	2.74	1.95	2.40	0.02	0.16

جدول ۳- توصیف آماری مقایسه جفتی انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از آزمایش و انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از معادله سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (مینسون) و منک و استین گاس

Table 3- Statistical Characteristic Table Comparison of the Pairs of metabolizable energy Derived from Experiment and metabolizable energy Derived from the Mineson and Stein Gus Equation

مقایسه جفتی انرژی قابل متابولیسم Comparison of the Pairs of metabolizable energy		توصیف آماری نمونه‌های جفت شده Statistical Characteristic of paired samples			
		تعداد نمونه Number of sample	میانگین mean	اشتباه معیار Standard error	سطح معنی داری P_ value
اولین جفت first pair	انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از آزمایش Metabolism energy obtained from the experiment	54	2.40	0.02	5.747
	انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از معادله سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (مینسون) Metabolized energy obtained from the Mineson equation	54	2.19	0.04	5.747
دومین جفت Secound pair	انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از آزمایش Metabolism energy obtained from the experiment	54	2.40	0.02	-.0333
	انرژی قابل متابولیسم به دست آمده بر اساس معادله منکی و استین گاس Metabolism energy derived from Menke and Steingass equation	54	2.41	0.02	-.0333

جدول ۴- مقایسه میزان تفاوت دو میانگین درمقایسه جفتی انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از آزمایش و انرژی قابل متابولیسم به دست آمده از معادله سازمان پژوهش های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (مینسون) و منک و استین گاس

Table 4- Difference between the two mean values and the significance level of the differences in the comparison of the metabolizable energy obtained from the experiment and the metabolizable energy obtained from the Minson and Stein Gus equations

مقایسه میزان تفاوت دو میانگین درمقایسه جفتی انرژی قابل متابولیسم	تفاوت میانگین	اشتباه معیار تفاوت Standard error of mean	بالا upper	پائین Lower	t	سطح معنی دار شدن Significant level	فاصله اطمینان ۹۵ درصدی تفاوتها 95% confidence interval of the Difference
انرژی قابل متابولیسم تعیین شده- انرژی قابل متابولیسم مینسون	0.21	0.03	0.28	0.14	5.75	0.000	
انرژی قابل متابولیسم تعیین شده- انرژی قابل متابولیسم منک و استین گاس	-0.008	0.02	0.04	-0.05	-0.33	0.74	

جدول ۵ - معادلات برازش شده برای تخمین انرژی قابل متابولیسم بر اساس ADF نمونه های سورگوم علوفه ای

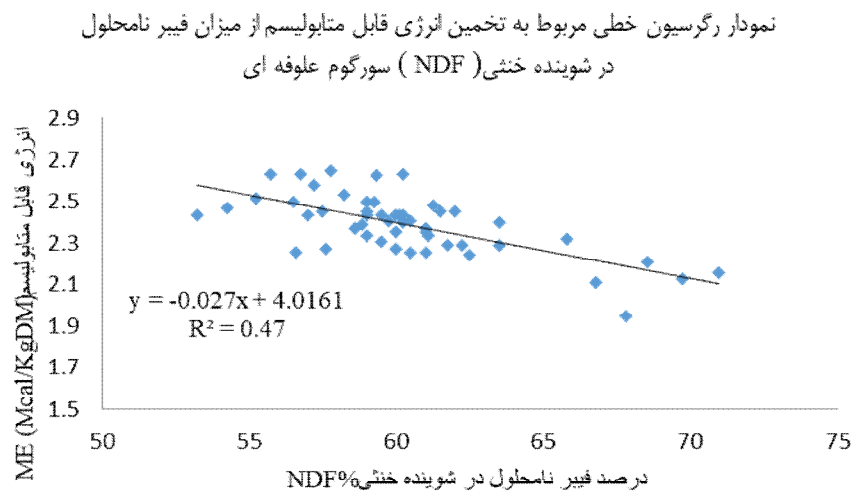
Table 5- Fitted Equations for estimating metabolizable energy Based on ADF Forage Sorghum Samples

نام تابع برازش شده Fitted Equations	درجه معنی داری Significant level	ضریب تبیین Coefficient of determination	معادلات برازش شده بر اساس درصد ADF Fitted Equations Based on ADF%
خطی Linear	0.001	0.592	$ME (Mcal/Kg DM) = 3.320 - 0.029 (ADF\%)$
درجه دوم Quadratic	0.001	0.624	$ME (Mcal/Kg DM) = 5.1012 - 0.1349 (ADF\%) + 0.0015 (ADF\%)^2$
تابع نمایی Exponential	0.001	0.602	$ME (Mcal/Kg DM) = 3.561 * e^{-0.013 ADF\%}$

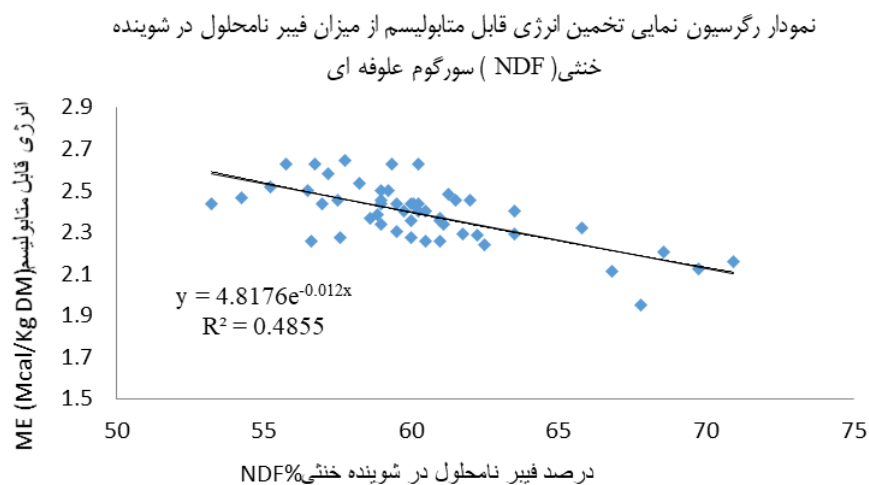
جدول ۶ - معادله خطی برازش شده برای تخمین انرژی قابل متابولیسم از NDF مربوط به سورگوم علوفه ای

Table 6- Fitted Equations for estimating metabolizable energy Based on NDF Forage Sorghum Samples

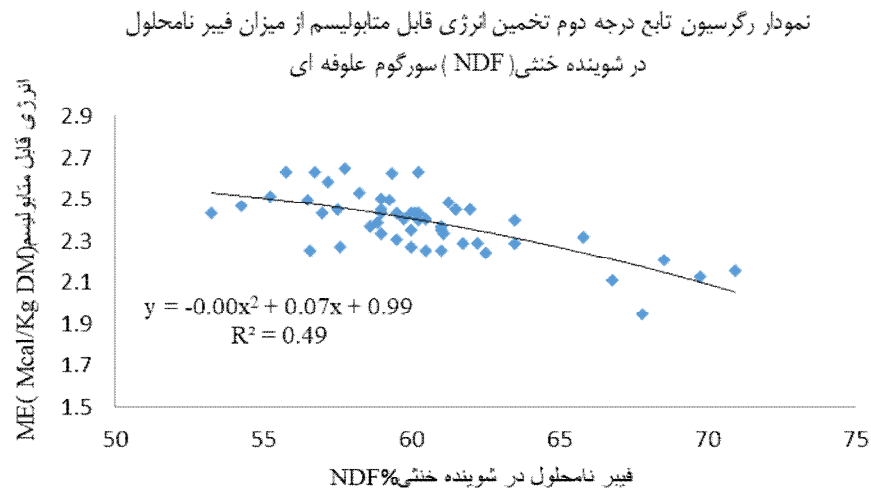
نام تابع برازش شده Fitted Equations	درجه معنی داری Significant level	ضریب تبیین Coefficient of determination	معادلات برازش شده بر اساس درصد NDF Fitted Equations Based on NDF%
خطی Linear	0.001	0.470	$ME (Mcal/Kg DM) = 4.016 - 0.027 (NDF\%)$
درجه دوم Quadratic	0.001	0.490	$ME (Mcal/Kg DM) = 0.990 + 0.070 (NDF\%) - 0.0008 (NDF\%)^2$
تابع نمایی Exponential	0.001	0.485	$ME (Mcal/Kg DM) = 4.818 * e^{-0.012 NDF\%}$



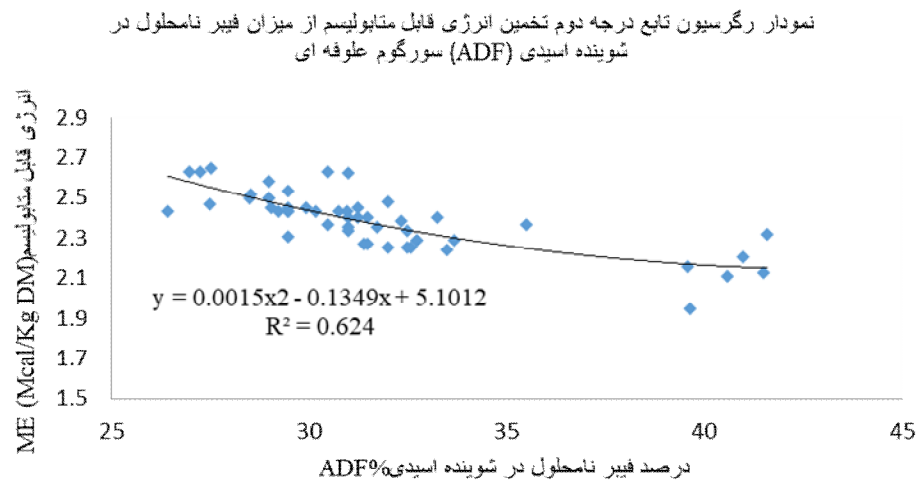
شکل ۱- نمودار رگرسیونی خطی برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان NDF سورگوم
Figure 1- Fitted linear regression curve and model for estimating metabolizable energy value of sorghum NDF



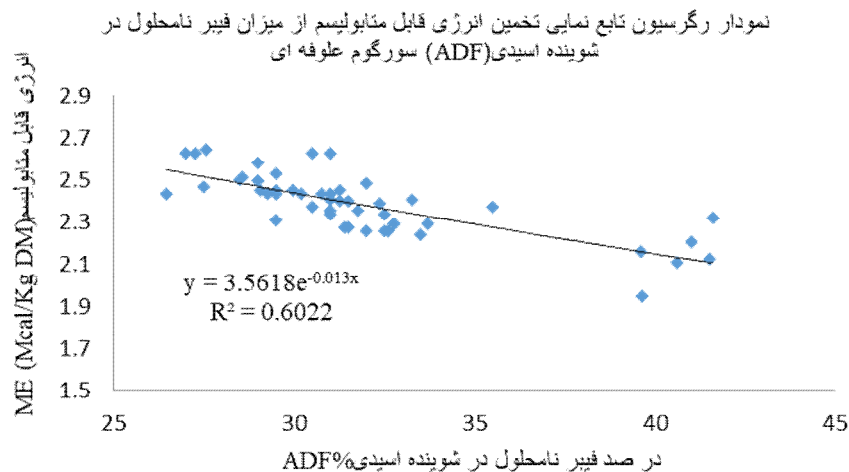
شکل ۲- نمودار رگرسیونی نمایی برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان NDF سورگوم علوفه‌ای
Figure 2. Fitted exponential regression curve and model for estimating the amount of metabolizable energy from NDF forage sorghum



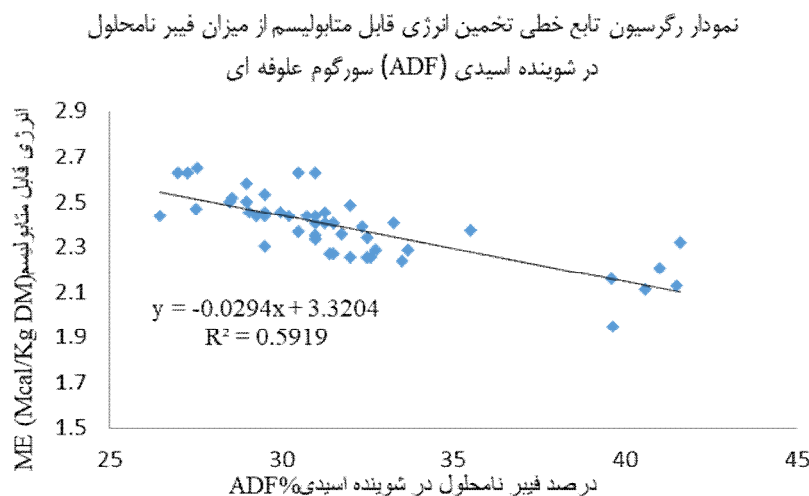
شکل ۳- نمودار رگرسیونی درجه دوم برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان NDF سورگوم علوفه ای
Figure 3. Fitted quadratic regression curve and model for estimating the amount of metabolizable energy from NDF forage sorghum



شکل ۴- نمودار رگرسیونی درجه دوم برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان ADF سورگوم علوفه ای
Figure 6. Fitted quadratic regression curve and model for estimating the amount of metabolizable energy from ADF forage sorghum



شکل ۵- نمودار رگرسیونی نمایی برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان ADF سورگوم علوفه‌ای
Figure 7. Fitted exponential regression curve and model for estimating the amount of metabolizable energy from ADF forage sorghum



شکل ۶- نمودار رگرسیونی خطی برازش شده و مدل مربوط به تخمین مقدار انرژی قابل متابولیسم از میزان ADF سورگوم علوفه‌ای
Figure 8. Fitted linear regression curve and model for estimating the amount of metabolizable energy from ADF forage sorghum

قرار دارند (۲/۴۱) ولی مدل سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع با تخمین ۲/۱۹ مگا کالری، انرژی قابل متابولیسم سورگوم‌های آزمایشی در این پژوهش راکمتر از مقدار واقعی و تعیینی آن (۲/۴۰) برآورد می‌کند.

نتیجه گیری کلی

نتایج تجزیه شیمیایی و تعیین ME سورگوم‌های آزمایشی با روش آزمون گاز نشان دادند که میزان ADF و ME سورگوم به

معادله فوق رابطه درصد ADF با انرژی قابل متابولیسم در سورگوم علوفه‌ای را نشان می‌دهد و در آن از تابع خطی استفاده شده است و ضریب تعیین آن در حد خوب و قابل قبول است ($R^2 = 0.592$). در نمودار رگرسیونی یک رابطه مستقیم و صعودی بین انرژی قابل متابولیسم و درصد ADF مشاهده می‌شود. میانگین‌های به دست آمده از سه مدل، غلامی (۸)، منک و استین گاس (۱۴) و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشورهای مشترک المنافع (۳) نشان می‌دهند که انرژی قابل متابولیسم تخمینی سورگوم علوفه‌ای از ADF در مدل غلامی و منکی و استین گاس تقریباً در یک محدوده

$$ME \text{ (Mcal/Kg DM)} = ۳/۳۲۰ - ۰/۰۲۹ \text{ (ADF\%)}$$

ترتیب ۳۱/۱۶ درصد و ۲/۴۱ مگا کالری در کیلو گرم ماده خشک است و بهترین رابطه رگرسیونی برای تخمین ME در سورگوم علوفه‌ای و با استفاده از متغیر مستقل ADF، رابطه پیشنهادی زیر است.

منابع

- 1- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- 2- Church, D. C., and W. C. Pond. 1988. Basic Animal Nutrition and Feeding. Third Edition. Jhon Wiley & Sons.
- 3- Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. (CSIRO). 2007. Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants. Australia. Colling wood VIC 3066.
- 4- Dairy One. 2009. Feed composition library. <http://www.dairyone.com/Forage/FeedComp/disclaimer.asp> Accessed Sep. Interactive Feed Composition Library . sorghum.
- 5- Detmann, E., S. C. Valadares Filho, D. S. Pina, L. T. Henriques, M. F. Paulino, K. A. Magalhães, P. A. Silva, and M. L. Chizzotti. 2008. Prediction of the energy value of cattle diets based on the chemical composition of the feeds under tropical conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 143:127-147.
- 6- Getachew, G., G.M. Crovetto., M. Fondevila., U. Krishnamoorthy., B. Singh., M. Spanghero., H. Steingass., P.H. Robinson. and M.M. Kailas. 2002. Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 102: 169-180.
- 7- Gholami, H. 2014. Estimation of metabolizable energy and net nutrients available in Iranian feedstuffs, based on chemical compounds and prediction equations. Final report of research project. National Animal Science Research Institute of Iran. P. 43(In Persian).
- 8- Gholami, H. 2018. Determination of nutritional value of different varieties of forage sorghum in Alborz province. Final report of research project. National Animal Science Research Institute of Iran. Pp 23-43 (In Persian).
- 9- Gholami, H., H. fasaeli., S. A. Mir Hadi., K. Reza Zadi., M. Rezae., M. Zahedi Far., A. grami., N. Timour nejad. and M. Babaie. 2018. Nutrient tables of Iranian feedstuffs. First Edition. Agricultural Research, Training and Promotion Organization. Animal Science Research Institute. Karaj, Iran pp 42-43 (In Persian).
- 10- Harlan, D. W., J. B. Holter, and H. H. Hayes. 1991. Detergent Fiber Traits to Predict Productive Energy of Forages Fed Free Choice to Nonlactating Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 74:1337-1353.
- 11- Harris, L. E. and L. C. Kearl. 1976. In Feed Composition, Animal Nutrient Requirements and Computerization of Diets. Utah agricultural Experimental station. Utah State University, Logan. Utah. USA. pp.44-46
- 12- Lee, M., J. Hwang, S. Wen-Shyg, and P. Chiou. 2000. Metabolizable energy of roughage in Taiwan. *Small Ruminant Research*, 36: 251-259.
- 13- Macdonald, P., R.A. Edwards, and J. F. D. Greenhalgh. 1995. Animal Nutrition. 5th Edition. Copublished in the United States with Johan Wiley & Sons Inc. New York. pp. 273-311
- 14- Menke, K. H. and H. Steingass. 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.
- 15- Minson, D. J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press, Washington DC. USA. Pp. 150-161
- 16- National Research Council. 2007. Nutrient Requirments of small ruminants. Washington DC. USA. Pp.39-81
- 17- National Research Council. 1959. United States and Canadian Tables of Feed Composition: Nutritional Data for United States and Canadian Feeds. Washington, D. C. : National Academy Press. Washington DC. USA. Pp.5-18
- 18- National Forage Testing Association (NFTA). 2007. Estimates of energy availability. Appendix A3. http://www.foragetesting.org/lab_procedure/appendix/A/EnergyEstimates.htm Accessed Sep. pp1-15
- 19- Owens, F. N., D. A., Sapienza, and A. T., Hassen, 2010. Effect of nutrient composition of feeds on digestibility of organic matter by cattle: A review. *Journal of Animal Science*, 88; 151-159.
- 20- SPSS. 2009. Statistical Package for the Social Sciences. Longproduced by SPSS Inc.
- 21- Weiss, W. P. 1993. Predicting Energy Values of Feeds. *Journal of Dairy Science*, 76:1802-1811.
- 22- www.feedipedia.org/node/703.



Introducing a linear model for estimating forage sorghum metabolizable energy by using fiber components

H. Gholami^{1*} - M. Babaei²

Submitted: 12-09-2018

Accepted: 06-10-2019

Introduction: The metabolizable energy represents a part of the gross energy of the feed, which after the deduction of the amount of feces and urine energy and the gases. One of the laboratory methods for determining the metabolizable energy of feedstuff is the gas method. This method is based on the measurement of the amount of released gas at the specified time. The estimated energy obtained from this method has a very high correlation with the amount of energy derived from the live animal method (*in vivo*). The direct determination of the energy available of feeds requires a great deal of time and cost, and since the available energy has a positive and high relationship with some of the chemical constituents of the feed, livestock nutritionists use fiber components such as NDF, ADF and lignin to estimate the available energy of feeds. Another approach is using equations to obtain the ADF for metabolizable energy of forages. It was reported that the amount of determination coefficient (R^2) for estimating the metabolizable energy of forages from ADF levels was from 0.52 to 0.92. This study conducted to determine the nutritional value and introduce regression equations for estimating the available energy of some forage sorghum.

Materials and Methods: Eighteen sorghum varieties planted in May 2016 at the research and educational farm in Karaj province of IRAN. Experimental varieties were harvested in September. Three samples of each sorghum forage cultivar, which planted in three separate rows, after crushing into 3 to 5 cm pieces, totaling about 54 samples, collected. Nutrient compositions including crude protein, crude ash, ADF, NDF, water-soluble carbohydrates, starch and lignin analyzed by AOAC official methods. The amount of crud ash determined by burning samples in an electric furnace and crude protein. To determine the concentration of ADL and to dissolve cellulose present in ADF, ADF samples placed in 72% sulfuric acid for three hours. The digestibility of the samples determined by gas test method. The amount of ME calculated using the volume of gas produced from fermentation of 200 mg of dry matter over a period of 24 hours. $ME = 2/2 + 1357/0 (GP) + 0057/0 (XP) + 00002859/0 (XP)^2$, Where ME is the metabolizable energy (MJ per kg of dry matter), GP, the volume of produced gas (ML in 200 mg dry matter per 24 hours incubation) and XP, crude protein (g / kg dry matter). For fitting the equations for estimating metabolizable energy based on NDF, ADF and lignin, SPSS software used to fit the linear, quadratic and exponential equation, and selected the independent variable that had the best R^2 .

Results and Discussion: The average dry matter of total 54 experimental samples is 19.54, and it is less than minimum required for high-grade silage (25%). The amount of sugar and starch are enough, which is an important part for the preparation of stable and quality silage. Determined metabolism energy was 2.40, which is higher than that announced by researchers, which could be the reason for the presence of BMR hybrids in this experiment. The mean of NDF, ADF, lignin and metabolizable energy of forage sorghum was determined to be 60.36, 31.16, 1.78 and 2.40, respectively. The whole equations obtained from NDF, ADF, lignin had an acceptable coefficient of determination, but the equations obtained from the ADF value, as an independent factor, have a higher coefficient of determination and the accuracy of the equations is moderate and acceptable. Among the equations, the linear equation derived from ADF suggested for estimating metabolizable energy due to the simplicity and approximation closer to actual ME of forage sorghum measured. Compared to the international linear equations, which ADF were independent factor, the Menke

1-Assistant professor of animal nutrition department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Animal Science research Institute, Karaj, Iran.

2-Assistant professor of animal nutrition department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Animal Science research Institute, Karaj, Iran.

(* - Corresponding Author Email: Ho.gholami@areeo.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75350

and Steingas metabolizable energy from ADF equations do not have any significant difference with the estimated ME of forage sorghum in this study.

Conclusion: The results of chemical analysis and determination of ME of sorghum by gas test showed that the amount of ADF and ME of sorghum was 31.16% and 2.41 Mcal/kg of dry matter, respectively. The best correlation for estimating ME, which ADF was as independent factor, was the following proposed linear equation. ME (Mcal/Kg DM) = 3.320 - 0.029 (ADF %).

Keywords: ADF, estimation of Metabolizable energy, forage sorghum, gas testing.



مقاله علمی - پژوهشی

ارزیابی تأثیر متقابل آفاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی

محسن مجتهدی^{۱*} - محسن دانش مسگران^۲ - مجید حیاتی آشتیانی^۳ - سید علیرضا وکیلی^۴ - سید مرتضی وقار سیدین^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۲

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر متقابل آفاتوکسین B1 (AFB1) و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون‌تنی پژوهشی در قالب دو آزمایش انجام گرفت. در آزمایش اول ابتدا تأثیر مقادیر مختلف AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز، پتانسیل تولید گاز، غلظت نیروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش یافت، ولی افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH نداشت. در آزمایش دوم تأثیر متقابل AFB1 و سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، میکوباند و میلپاند (در سطح ۶ درصد ماده خشک جیره) بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه با استفاده از روش کشت ثابت بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بر خلاف انتظار، هیچکدام از جاذب‌ها نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی را خنثی نموده و یا کاهش دهند که احتمالاً به دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکاته برای جذب AFB1 باشد. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی برای کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آفاتوکسین، برون‌تنی، تخمیر شکمبه‌ای، جاذب آلومینوسیلیکاته.

مقدمه

آفاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات بسیار سمی از دسته میکوتوکسین‌ها هستند که دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌باشند. آفاتوکسین B1 (AFB1) بخش عمده آفاتوکسین‌ها را تشکیل داده و به‌عنوان قوی‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی شناخته می‌شود (۲۶). هنگامی که خوراک‌های آلوده به آفاتوکسین به حیوانات شیرده داده می‌شود،

متابولیتی از آفاتوکسین به نام M1 در شیر ترشح می‌شود. از آنجا که پاستوریزاسیون، استریلیزاسیون و فرآوری شیر بر بقا و کاهش سمیت AFM1 تأثیر زیادی ندارد، این سم سرانجام به فرآورده‌های مختلف لبنی انتقال می‌یابد و سلامت مصرف کنندگان را به خطر می‌اندازد. در کنار تأثیرات منفی میکوتوکسین‌ها بر سلامتی و محصولات تولیدی دام، این ترکیبات احتمالاً بر هضم، متابولیسم و جمعیت‌های میکروبی شکمبه نیز موثر خواهند بود. حد مجاز AFB1 در خوراک برابر ۵ میکروگرم در کیلوگرم و مقدار آفاتوکسین‌های مخلوط (B1، B2، G1 و G2) ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم عنوان شده است (۲۰). از طرفی حد مجاز آفاتوکسین M1 در ایالات متحده آمریکا ۵۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم است، که در ایران نیز همین میزان به‌عنوان مقدار استاندارد این توکسین در شیر در نظر گرفته می‌شود (۲۰).

در نشخوارکنندگان (به‌ویژه گاوهای شیرده) تغذیه شده با خوراک آلوده به AFB1 مشکلات سلامتی از قبیل سرطان کبد، تضعیف سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های تولیدمثلی، ناقص‌الخلقه‌زایی، کاهش مصرف خوراک و تولید شیر بروز می‌کند همچنین مشخص شده است

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

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

۳- استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه کاشان

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

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه بیرجند

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: mojtahedi@birjand.ac.ir

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75843

گاز با افزودن AFB1 کاهش یافت و این ممانعت از تولید گاز را بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه تحت تأثیر AFB1 عنوان نمودند. تاکنون مطالعه جامعی امکان کاهش اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم میکروبی شکمبه را بررسی نکرده است. بنابراین هدف از این آزمایش ارزیابی تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های سم آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: تأثیر آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولیدگاز، تخمیر و هضم شکمبه

در آزمایش اول تأثیر سطوح مختلف AFB1 شامل صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت، بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم با استفاده از روش کشت ثابت بررسی شد. برای تهیه محلول AFB1 ویال حاوی ۵ میلی گرم AFB1 خالص (کد ۶۶۳۶ شرکت Sigma-Aldrich) را با استفاده از متانول را با استفاده از متانول و آب مقطر دوبار تقطیر رقیق کرده تا محلول‌هایی به غلظت‌های ۱۵/۳، ۳۰/۶ و ۴۵/۹ میکروگرم در میلی لیتر از AFB1 بدست آید.

مایع شکمبه قبل از خوراک وعده صبح از ۳ راس گاو نر هلشتاین دارای فیستولای شکمبه ای (تغذیه دو بار در روز و در سطح نگهداری با جیره حاوی ۷۰ درصد علوفه و ۳۰ درصد کنسانتره) گرفته شد و بلافاصله توسط ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید و به سرعت در فلاسک‌های حاوی آب گرم (حدود ۳۸ درجه سانتی‌گراد)، به آزمایشگاه منتقل شد. سپس مایع شکمبه گرفته شده از سه گاو به نسبت مساوی با هم مخلوط شده و تا قبل از شروع انکوباسیون، در داخل حمام آب گرم ۳۹ درجه و در زیر جریان مداوم گاز دی اکسید کربن قرار گرفت.

در این آزمایش انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. تولید گاز بر اساس روش تئودور و همکاران (۳۹) و با استفاده از بطری‌های شیشه‌ای میلی لیتری مخصوص و فشارسنج اندازه گیری گردید. بدین منظور ۵۰۰ میلی گرم از خوراک پایه (جدول ۱) به داخل شیشه‌ها ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی لیتر از مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. لازم به ذکر است که خوراک پایه و مایع شکمبه مورد استفاده فاقد آفلاتوکسین بود. سپس یک میلی لیتر از محلول‌های AFB1 مختلف تهیه شده در مرحله قبل به هر ویال افزوده شد تا غلظت‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم AFB1 در میلی لیتر محیط کشت، بدست آید. همچنین یک میلی لیتر از متانول رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمار صفر AFB1،

که آفلاتوکسین در نشخوارکنندگانی مثل گاو و گوساله باعث کوری، راه رفتن چرخشی و دایره وار، دندان قروچه، دهان کف آلود، التهاب قرنیه و پلک چشم، بیقراری، راه رفتن روی مفصل خرگوشی، اسهال، سقط جنین، تشنج و به دنبال آن زمین گیر شدن و در نهایت باعث مرگ می‌شود و از علائم کالبد شکافی می‌توان به افزایش آنزیم‌های کبدی اشاره کرد (۱۵، ۲۷). شدت بروز سمیت و بیماری ناشی از آفلاتوکسین‌ها به مقادیر سم، مدت تغذیه و وجود دیگر تنش‌های اثرگذار بر حیوان، بستگی دارد. با این وجود تشخیص بیماری‌های ناشی از مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسیکوزیس به دلیل نداشتن علائم اختصاصی، مشکلات و هزینه‌های خاص نمونه گیری و آنالیز خوراک و برهم کنش با دیگر فاکتورهای تنش، مشکل می‌باشد.

برای غیرفعال کردن و یا کاهش اثرات آفلاتوکسین‌ها روش‌های زیادی بررسی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل جداسازی فیزیکی، غیر فعال کردن توسط حرارت، اشعه‌دهی، استخراج توسط حلال، تخریب شیمیایی، غیر فعال کردن توسط میکرب‌ها و تخمیر می‌باشد. روش‌های فوق تاحدودی قادر به غیرفعال کردن و کاهش آفلاتوکسین‌ها می‌باشند اما عمدتاً به دلیل ایجاد باقیمانده‌ها (کاهش ایمنیت) و کاهش کیفیت مواد غذایی، روش‌هایی عملی و قابل قبول نبوده‌اند. نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که آسان‌ترین، عملی‌ترین و ارزان‌ترین شیوه در کاهش بروز اختلالات مربوط به سموم قارچی یا جلوگیری از ورود این سموم در شیر و محصولات دامی استفاده از مواد جاذب یا مواد کمپلکس کننده در خوراک می‌باشد. ترکیبات جاذب مختلفی برای کاهش جذب آفلاتوکسین در خوراک و دستگاه گوارش حیوانات اهلی و به‌ویژه گاوهای شیرده استفاده شده‌اند، اما پرکاربردترین ترکیبات جاذب، ترکیبات معدنی آلومینوسیلیکاتی مانند بنتونیت‌ها هستند. بنتونیت‌ها ترکیبات نانوساختار و نانوحفره رسی هستند که ساختار کریستالی لایه ای داشته و در جذب مایکوتوکسین‌ها و به‌ویژه آفلاتوکسین‌ها کاربرد دارند. همچنین مونتموریلونیت کانی نانو ساختار و نانو حفره‌ای آلومینوسیلیکاتی (فیلسیلیکاتی) ۲:۱ لایه‌ای (T:O:T) است که فاز غالب تشکیل دهنده بنتونیت‌هاست و کلیه خواص و مشخصات بنتونیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. هاروی و همکاران (۱۵) گزارش نمودند که افزودن مقادیر مختلف آلومینوسیلیکات (HSCAS) به جیره‌های حاوی ۲۰۰ قسمت در بیلیون AFB1 منجر به کاهش ۲۴ درصدی در ترشح AFM1 شده است. استفاده از بنتونیت جهت جذب آفلاتوکسین برای اولین بار توسط ماسیمانگو و همکاران (۲۳) آزمایش شد. این محققین مشاهده کردند که افزودن ۲ درصد از چندین نوع بنتونیت در چندین محلول بافری باعث جذب ۴۰۰ میکروگرم AFB1 در دامنه ۹۴ تا ۱۰۰ درصد گردید. جیانگ و همکاران (۱۹) و همچنین هلفریچ و همکاران (۱۶ و ۱۷) با بررسی سطوح مختلف AFB1 بر تولید گاز در شرایط برون تنی گزارش کردند که فراسنجه‌های تولید

افزوده شد. سپس با تزریق گاز دی اکسید کربن به داخل شیشه‌ها، محیط داخل شیشه بی هوای گردید و سپس درب شیشه‌ها فوراً با استفاده از درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی پرس گردید. سپس شیشه‌ها در بن ماری شیکردار ۱۲۰ لیتری در شرایط دمایی (دمای ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد) و فیزیکی شبیه سازی شده بر اساس شرایط شکمبه دام تحت انکوباسیون قرار گرفتند و تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون و بر

اساس کیلوپاسکال اندازه‌گیری شد و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (۱ اتمسفر و دمای صفر درجه سانتی‌گراد) تبدیل شد. این روش انکوباسیون در ۲ نوبت (و ۸ تکرار برای هر تیمار در هر نوبت) انجام شد و در هر نوبت، سه شیشه فاقد نمونه خوراک جهت تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه و بافر، مورد انکوباسیون قرار گرفت.

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه (درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient and chemical composition of the main diet (% of Dry matter)

اجزا Ingredient	مقدار amount
علف خشک یونجه Alfalfa hay	15.0
سیلاژ ذرت Corn silage	30.0
دانه جو Barley grain	14.0
دانه ذرت Corn grain	10.0
کنجاله سویا Soybean meal	10.0
کنجاله تخم پنبه Cottonseed meal	8.0
سیوس گندم Wheat bran	7.0
پودر گوشت Meat powder	3.0
پودر چربی Fat powder	1.2
نمک salt	0.2
مکمل مواد معدنی و ویتامینی Mineral and vitamin supplements	1.6
ترکیب شیمیایی جیره Chemical composition of diet	
انرژی خالص شیردهی (مگا کالری در کیلوگرم) Net energy for lactation (Mcal/kg)	1.58
پروتئین خام (درصد) Crude protein	16.2
چربی خام (درصد) Crude fatty	3.8
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد) NFC	40.8
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد) ADF	20.3
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد) NDF	33.8

مخلوط بافر و مایع شکمبه (به نسبت ۱:۲) اضافه شد. سپس مقدار ۳۰ میلی گرم از جاذب‌های مختلف توزین شده و به شیشه‌های مورد نظر حاوی ماده خوراکی اضافه شد. از طرف دیگر یک میلی‌لیتر از محلول AFB1 با غلظت ۳۰/۶ به شیشه‌های مورد نظر تزریق شد (تا غلظت ۶۰۰ نانوگرم از AFB1 در میلی‌لیتر محیط کشت بدست آید) و یک میلی‌لیتر از آب متانولی رقیق شده با آب مقطر دوبار تقطیر به شیشه‌های تیمارهای فاقد AFB1، افزوده شد. سایر مراحل انکوباسیون و نمونه‌گیری مشابه به آزمایش اول بود.

آنالیز شیمیایی نمونه‌ها

غلظت نیتروژن آمونیاکی در نمونه‌های مایع کشت بر اساس روش رنگ سنجی و بر طبق پروتکل برودریک و کانگ (۶) اندازه‌گیری شد. اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips- PU4410) و بر طبق پروتکل اوتستین و بارتلی (۲۸) آنالیز شدند. در این دستگاه از ستونی (PEG۱۰) با طول ۴۵ متر (با قطر ۰/۴۵ میلی متر) استفاده شد. هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد و در دمای اولیه و پایانی به‌ترتیب روی ۵۵ و ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای دتکتور (FID) و انژکتور نیز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کرتونیک اسید (۱:۷ حجمی) به‌عنوان استاندارد داخلی به تمامی نمونه‌ها تزریق شد.

معادلات و روش‌های آماری

از مدل نمایی با فاز تأخیر شوفیلد (۳۶) برای برآزش داده‌های تولید گاز با به کارگیری روش مقایسات گوسن - نیوتن در رویه NLIN نرم افزار آماری SAS (۳۵) به شیوه رگرسیون غیر خطی استفاده گردید.

$$P = v(1 - \exp(-k(t - \text{lag})))$$

در این مدل P گاز تولیدی در زمان t، v گاز مرتبط با سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر، k نرخ تولید گاز در زمان و lag با مفهوم زمان مربوط به فاز تأخیر به کار رفت.

فراسنجه‌های تولید گاز و سایر نتایج (غلظت نیتروژن آمونیاکی، اسیدهای چرب فرار و قابلیت هضم ماده خشک) با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۳۵) و طرح کاملاً تصادفی به‌صورت زیر مورد تجزیه آماری قرار گرفت. میانگین مشاهدات توسط Lsmeans در سطح احتمال ۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند. مدل آماری طرح به این صورت بود:

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

که در این مدل Y_{ij} : مشاهده i در تیمار j، μ : میانگین کل مشاهدات، T_i : اثر تیمار i و e_{ij} : خطای تصادفی در نظر گرفته شد.

برای تعیین pH محیط کشت، نیتروژن آمونیاکی و غلظت اسیدهای چرب فرار محیط کشت و همچنین محاسبه قابلیت هضم ماده خشک به روش برون‌تنی، پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، ۴ شیشه کشت از هر تیمار را برداشته و به منظور متوقف کردن فعالیت میکروبی، شیشه‌ها بلافاصله به داخل ظرف آب سرد منتقل گردید. سپس به‌ترتیب شیشه‌ها باز شدند و pH محیط کشت با استفاده از pH متر دیجیتال (مدل ۶۹۱، شرکت Metrohm) ثبت گردید. سپس محتویات شیشه‌ها با دقت به فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد و فالكون‌ها در دمای ۴ درجه و سرعت ۱۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع‌رویی هر فالكون با ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ نرمال اسید کلریدریک مخلوط شده و جهت آنالیز نیتروژن آمونیاکی بعدی، در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. علاوه بر این ۲ میلی‌لیتر دیگر از مایع‌رویی هر فالكون نمونه‌گیری و جهت آنالیز اسیدهای چرب فرار، منجمد و نگهداری شدند. در نهایت برای محاسبه قابلیت هضم ماده خشک، مایع‌رویی باقیمانده هر فالكون به آرامی تخلیه و پلت باقیمانده در کف، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید تا مقدار ماده خشک باقیمانده تعیین گردد.

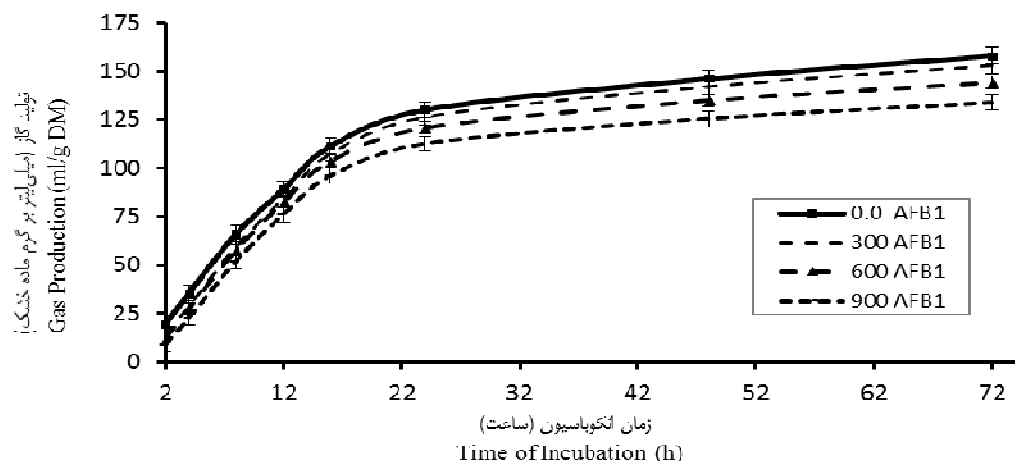
آزمایش دوم: تأثیر متقابل آفلاتوکسین B1 و جاذب‌های آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

در این بخش از آزمایش کارایی سه جاذب آلومینوسیلیکاته با ساختار پایه بنتونیت سدیم بر سمیت‌زدایی AFB1 مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این مرحله از ۳ نوع جاذب با ساختار پایه آلومینوسیلیکاته، استفاده شد. جاذب میل‌باند (MilBond) به‌عنوان جاذب تجاری محصول شرکت Milwhite آمریکا انتخاب و تهیه گردید. جاذب‌های بومی با نام‌های تجاری مگا‌باند (MegaBond) و مایکوباند (MycoBond) از شرکت دانش بنیان مگافراور تهیه شدند. در ابتدا به‌منظور یکنواختی، نمونه‌های مختلف جاذب با استفاده از الک با اندازه منافذ ۱۰۵µm (الک شماره ۱۴۰) غربال شدند و ذرات کوچکتر از این اندازه برای انجام آزمایش جداسازی گردید.

در این مرحله تیمارهای آزمایشی شامل افزودن جاذب‌های آلومینوسیلیکاته (۶ درصد ماده خشک خوراک پایه)، با و بدون افزودن AFB1 (به مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محیط کشت) در روش کشت ثابت بودند. در این مرحله نیز انکوباسیون آزمایشگاهی به روش کشت ثابت و بر اساس پروتکل آرکوئی و همکاران (۵) انجام شد. بدین‌منظور ۵۰۰ میلی‌گرم از خوراک پایه داخل شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری مخصوص، ریخته شده و به هر شیشه ۵۰ میلی‌لیتر از

نتایج و بحث

تأثیر مقادیر افزایشی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار و قابلیت هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی در جدول ۲ و شکل ۱ آورده شده است. نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 به محیط کشت، نرخ تولید گاز و پتانسیل تولید گاز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$)، به‌طوری که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، نرخ تولید گاز از ۰/۱۳۴ به ۰/۰۹۲ میلی‌لیتر در ساعت و پتانسیل تولید گاز از ۱۶۰/۷ میلی‌لیتر به ۱۳۱/۳ کاهش یافت، ولی تفاوت معنی‌داری بین مقادیر صفر و ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. علاوه بر



شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 (صفر، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) بر الگوی تولید گاز
Figure 1- Effect of different levels of aflatoxin B1 (0, 300, 600 and 900 ng/ml) on gas production pattern

در نتیجه‌ی اختلال در فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه از طریق کاهش هضم فیبر و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار باشد (۱۳، ۱۶، ۱۷).

نتایج بدست آمده در این آزمایش نشان داد که با افزودن AFB1 غلظت نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش یافت، به‌طوری که کمترین غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 (به‌ترتیب ۱۵/۲ و ۱۵/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) مشاهده شد. نتایج بدست آمده در این آزمایش درباره غلظت نیتروژن آمونیاکی، تا حدود زیادی با نتایج دیگر محققان (۱۳، ۱۹، ۳۷) مطابقت دارد. این پژوهشگران گزارش کردند که افزودن AFB1 در یک سیستم شکمبه مصنوعی موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید. آفلاتوکسین B1 ممکن است سنتز پروتئین میکروبی را مختل کرده و احتیاجات میکروب‌ها به مواد مغذی را افزایش دهد (۱۲) در شکمبه، پروتئین خوراک معمولاً توسط میکروارگانیسم‌ها هیدرولیز و آمین‌زدایی شده و

افزودن AFB1 به محیط کشت تأثیری بر pH آن نداشت، ولی قابلیت هضم ماده خشک به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش غلظت AFB1 کاهش یافت (جدول ۲). قابلیت هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت از ۰/۵۹۳ در تیمار فاقد AFB1 به ۰/۵۵۴ در تیمار حاوی ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر AFB1 رسید ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی صفر و ۳۰۰ و همچنین بین تیمارهای حاوی ۶۰۰ و ۹۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده نشد. نتایج گزارش شده در مورد تأثیر AFB1 بر قابلیت هضم ماده خشک متناقض است. نتایج این آزمایش یافته‌های وستلیک و همکاران (۴۱) را تأیید می‌نماید. فهر و دلاگ (۱۳) و اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش هضم سلولز شد. از طرف دیگر جیانگ و همکاران (۱۹) و پترسون و کیسلینگ (۳۰) گزارش کردند که افزودن AFB1 بر قابلیت هضم ماده خشک در شرایط برون‌تنی، تأثیری نداشت. در آزمایش حاضر کاهش مشاهده شده در قابلیت هضم ماده خشک در اثر افزودن AFB1 می‌تواند

در نهایت پیتیدها و آمونیاک آزاد را تشکیل می‌دهد (۳۲) حال اگر هضم و متابولیسم پروتئین خوراک توسط AFB1 مهار گردد، غلظت آمونیاک آزاد در شکمبه کاهش خواهد یافت. مقدار آمونیاک آزاد در شکمبه نتیجه‌ی تعادل بین هیدرولیز پروتئین (تولید آمونیاک) و جذب و مصرف آن (توسط شکمبه و میکروباها) است (۳۲). کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش AFB1 در مطالعه حاضر، ممکن است به دلیل اثرات منفی AFB1 بر میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه مهار یا محدود شدن مسیر هیدرولیز یا آمین‌زدایی پروتئین (کاهش آزادسازی آمونیاک از خوراک)، باشد.

در این آزمایش، غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش مقدار AFB1 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$)، اما نسبت مولی اسیدهای چرب فرار شامل استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزووالرات تحت تأثیر مقدار AFB1 قرار نگرفتند ($P > 0.05$) که با نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی، تاحدی متناقض است. ادرینگتون و همکاران (۱۲) تفاوتی در غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه بره‌های در حال رشد تغذیه شده با ۲/۵ میلی‌گرم AFB1 در کیلوگرم جیره مشاهده نکردند. هلفریچ و همکاران (۱۶) نیز گزارش کردند که افزودن ۶۰۰-۶۰ میکروگرم در کیلوگرم AFB1 به جیره گوساله‌های نر، تأثیری بر تولیدی اسیدهای چرب فرار نداشت. در آزمایشی دیگر تغذیه ۰/۷۱۴ میکرومول AFB1 به بزهای شیرده، بر تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه ای تأثیری نگذاشت (۱۷). در مقابل، هضم سلولز، تولید اسیدهای چرب فرار، غلظت نیتروژن آمونیاکی و تجزیه پروتئین‌ها با تغذیه ۰/۲ تا ۰/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنی AFB1 به گوساله‌های نر و در شرایط آفلاتوکسیکوز حاد گاوی، کاهش یافت (۸). اسکودامور و لایوزی (۳۷) نیز گزارش کردند که آفلاتوکسین موجب کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه می‌گردد. فهر و دلاگ (۱۳) نیز مشاهده کردند که مقادیر آفلاتوکسین بالاتر از ۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش تولید اسیدهای چرب فرار شد. همچنین نسبت اسیدهای چرب فرار تغییر کرد بگونه‌ای که استات کاهش و پروپیونات و بوتیرات افزایش یافتند اما نسبت والرات تغییری نکرد. دیووراک و همکاران (۱۱) نیز با انجام آزمایشی در شرایط درون‌تنی مشاهده کردند که یک بار تزریق ۲۰۰ میلی‌گرم AFB1 و ۸۰ میلی‌گرم AFB2 به داخل فیستولای یک گاو موجب کاهش نسبت استات، افزایش بوتیرات و نسبت‌های متغیری پروپیونات گردید. در توجیه نتایج بدست آمده در این آزمایش می‌توان گفت که تغییر الگوی جمعیت و فعالیت میکروبی در اثر افزودن AFB1 به محیط کشت، ممکن است بر جنبه‌های دیگری از ظرفیت تخمیر شکمبه مانند تولید اسیدهای چرب فرار، تأثیرگذار باشد.

اختلاف زیاد مشاهده شده بین گزارشات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت‌ها در تکنیک مورد استفاده، مقادیر مختلف AFB1 و یا منبع آلودگی آفلاتوکسین مورد استفاده باشد. به‌عنوان مثال در روش

استفاده شده توسط فهر و دلاگ (۱۳)، ۲۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه به مدت ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت، درحالی‌که پترسون و کیسلینگ (۳۰) از یک میلی‌لیتر مایع شکمبه به همراه سوبسترا و به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون، استفاده کردند. مدت زمان انکوباسیون طولانی و مقدار کم مایع شکمبه اولیه می‌تواند منجر به جمعیت میکروبی محدود و انتخاب شده ای گردد که ممکن است نشان دهنده شرایط واقعی شکمبه نباشد. به علاوه اینکه تخمیر طولانی مدت می‌تواند موجب محو شدن نتایج بدست آمده در سیستم‌های کشت برون‌تنی گردد، زیرا تفاوت‌های اولیه در نرخ و مقدار هضم از بین خواهد رفت. از طرف دیگر تقریباً به‌طور قطع می‌توان گفت که برخی از دیگر عوامل ضد میکروبی و مایکوتوکسین‌ها، علاوه بر AFB1، و همچنین برخی از مایکوتوکسین‌های غیر قابل تشخیص در خوراک و یا عصاره‌های خام اسپرژیلوس فلاووس مورد استفاده، وجود دارد. این عامل می‌تواند تفاوت در اثرات مشاهده شده در مطالعات با خوراک آلوده شده طبیعی در مقایسه با آزمایشات با مایکوتوکسین‌های خالص را توضیح دهد (۲۲،۲۱).

به‌طور کلی در این آزمایش افزودن AFB1 موجب کاهش تولید گاز (نرخ و کل تولید گاز)، کاهش قابلیت هضم خوراک و کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی گردید که این نتایج می‌تواند بیانگر اثرات منفی و ممانعت کنندگی AFB1 بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه باشد. مایر و همکاران (۲۵) مشاهده کردند که آفلاتوکسین باعث مهار کشت‌های خالص استرپتوکوکوس بویس و مخلوط باکتری‌های شکمبه می‌گردد. اگرچه که مقدار مصرفی AFB1 در این آزمایش (۵۰ و ۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، بسیار بیشتر از مقادیر مشاهده شده و مورد انتظار در شکمبه حیوانات تغذیه شده با AFB1 می‌باشد، دیگر محققان ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها در مقادیر بسیار کمتر را نیز مشاهده کرده‌اند. بورمیستر و هسلتاین (۷) از عصاره خام آفلاتوکسین شامل ۳۶ درصد کل آفلاتوکسین و ۲۴ درصد AFB1 استفاده کردند و حساسیت باکتری‌ها را نسبت به آفلاتوکسین‌ها بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که از ۳۲۹ میکروارگانیسم آزمایش شده، رشد ۱۲ گونه از باسیلوس‌ها، یک گونه از کلوستریدیوم و یک گونه از استرپتومایسس تحت تأثیر آفلاتوکسین محدود می‌شود. نتایج آزمایشات دیگر ثابت کرد که AFB1 عامل اصلی تأثیرات ضد میکروبی مشاهده شده توسط عصاره خام آفلاتوکسین می‌باشد. با فرض اینکه AFB1 عامل اصلی اثرات ضد میکروبی در عصاره‌های خام آفلاتوکسین می‌باشد، بورمیستر و هسلتاین (۷) ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌ها را با ۷-۸ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، مشاهده کردند. از آنجا که نشان داده شده که چندین گونه باکتریایی با غلظت‌های کمتر از ۱۰ میکروگرم AFB1 بر میلی‌لیتر، به‌صورت کامل ممانعت می‌شوند، منطقی خواهد بود اگر فرض کنیم که رشد و فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه

می‌تواند با مقادیر آفلاتوکسین مشاهده شده به‌صورت معمول در مزرعه، مختل گردد (۲۶). بنابراین از آنجا که آفلاتوکسین‌ها می‌توانند اثرات ضد میکروبی (تخریب میکروب و یا ممانعت و کاهش رشد آن‌ها) داشته باشند، ممکن است باعث تغییر نسبت‌های محصولات نهایی هضم و مختل شدن شکمبه گردیده و در نتیجه هضم، مصرف خوراک و در نهایت تولید حیوان را مختل نمایند (۲۶).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 2- Effect of different levels of Aflatoxin B1 on gas production parameters, fermentation and rumen degradability

فراسنجه Parameters	غلظت آفلاتوکسین B1 در محیط کشت (نانوگرم در میلی لیتر) ^۱ Aflatoxin B1 levels in the culture (ng/ml) ¹				SEM	P- Value
	0	300	600	900		
نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت) Gas production rate (ml/h)	0.134 ^a	0.121 ^b	0.107 ^c	0.092 ^d	0.005	0.031
تولید گاز (میلی لیتر بر گرم ماده خشک) Gas production (ml/gr DM)	160.7 ^a	154.1 ^a	142.0 ^b	131.3 ^c	4.1	0.012
فاز تأخیر (ساعت) Lag time (h)	0.07 ^c	0.64 ^b	1.03 ^a	1.39 ^a	0.27	0.019
فراسنجه‌های تخمیر و هضم (در ۲۴ ساعت) Fermentation and digestion parameters (over 24 hours)						
pH	6.63	6.58	6.61	6.54	0.09	0.43
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک) Dry matter digestibility (g/g DM)	0.593 ^a	0.584 ^a	0.560 ^b	0.554 ^b	0.011	0.023
غلظت نیترژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر) N-NH3 (mg/dL)	17.8 ^a	16.9 ^b	15.2 ^c	15.3 ^c	0.34	0.04
کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر لیتر) Total VFA (mM/l)	83.6 ^a	77.2 ^b	71.7 ^c	60.8 ^d	2.1	0.014
استات (میلی مول بر لیتر) Acetate (mM/l)	67.5	68.1	67.4	67.8	0.52	0.17
پروپیونات (میلی مول بر لیتر) Propionate (mM/l)	18.8	18.1	19.0	18.4	0.4	0.11
بوتیرات (میلی مول بر لیتر) Butyrate (mM/l)	9.6	9.7	9.3	9.6	0.36	0.37
والرات (میلی مول بر لیتر) Valerate (mM/l)	2.44	2.51	2.59	2.47	0.081	0.16
ایزوالرات (میلی مول بر لیتر) Isovalerate (mM/l)	1.66	1.58	1.71	1.72	0.077	0.13

نتایج بدست آمده نشان داد که مشابه با یافته‌های مرحله قبل، به‌طور کلی افزودن AFB1 به محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابلیت هضم ماده خشک و غلظت نیترژن آمونیاکی گردید ($P < 0.05$)، در حالی که اثر معنی‌داری بر pH محیط کشت نداشت ($P > 0.05$). از طرف دیگر افزودن جاذب‌های آلومینوسیلیکاته مختلف به‌طور کلی موجب کاهش معنی‌دار نرخ و مقدار تولید گاز، کاهش قابل توجه قابلیت هضم ماده خشک و غلظت نیترژن آمونیاکی گردید ($P < 0.05$)، و علاوه بر این موجب افزایش معنی‌دار pH محیط کشت در تمامی تیمارهای حاوی جاذب شدند ($P < 0.05$). در توافقی با نتایج این آزمایش جاسکوز و همکاران (۱۸) گزارش کردند که افزودن ۲ یا ۱۰ درصد بنتونیت سدیم به جیره

داده‌های مربوط به تأثیر متقابل AFB1 و جاذب‌های آلومینوسیلیکاته بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه در شرایط برون تنی در جدول ۳ نشان داده شده است. در این مرحله فرض بر این بود که جاذب‌های سم، مولکول‌های AFB1 را در محیط کشت شکمبه جذب کرده و بدین ترتیب اثرات منفی AFB1 بر تخمیر و هضم شکمبه را حذف نموده و یا کاهش می‌دهند. لذا در این آزمایش AFB1 و ترکیبات جاذب سم در یک زمان، به‌صورت جدا و یا باهم به یک سیستم کشت ثابت در شرایط برون تنی اضافه شدند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات قبلی، مقدار ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر AFB1 و همچنین مقدار ۶ درصد جاذب‌های آلومینوسیلیکاته، جهت انجام آزمایش انتخاب شدند.

گاوه‌های شیرده، باعث کاهش تجزیه پذیری ماده خشک گردید، اما، صالح (۳۳) گزارش کرد که استفاده از ۲/۵ درصد جاذب آلومینوسیلیکاته در جیره، باعث افزایش معنی دار ناپدید شدن ماده خشک می‌گردد.

نتایج گزارش شده قبلی در ارتباط با تأثیر جاذب آلومینوسیلیکاته بنتونیت بر pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه، تا حدودی متناقض است. مشابه با نتایج بدست آمده در این آزمایش، آیتچیسون و همکاران (۴) با بررسی تأثیر بنتونیت بر تخمیر شکمبه و قابلیت هضم، گزارش کردند که افزودن بنتونیت به جیره موجب افزایش pH نسبت به گروه شاهد گردید. از طرف دیگر، برخی محققان گزارش کردند که افزودن مقادیر مختلف بنتونیت سدیم به جیره، تأثیری بر pH شکمبه نداشت (۳۷،۹،۳). افزایش معنی دار pH محیط کشت با افزودن جاذب‌های بنتونیتی می‌تواند به این دلیل باشد که بنتونیت به دلیل داشتن کاتیون‌های قابل تعویض با یون هیدروژن، به عنوان تعدیل کننده یون هیدروژن در محیط عمل نموده و از کاهش شدید pH شکمبه جلوگیری می‌نماید.

عبدالرحمان و هلال (۱) گزارش کردند که افزودن ۴ درصد بنتونیت به جیره میش‌های شیرده موجب کاهش معنی دار غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه گردید. عبدالله و همکاران (۲) نیز بیان کردند که اضافه کردن بنتونیت به میزان ۲ درصد به کنجاله خرمای روغنی سبب کاهش جمعیت پروتوزایی و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه شد. صالح و بنف (۳۴) گزارش کردند که بنتونیت سدیم قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالاست، آن را جذب کرده و پس از کاهش غلظت آن در محیط، شروع به آزادسازی مجدد آن می‌کند. بنابراین افزودن بنتونیت سدیم به جیره می‌تواند تا حدودی دسترسی میکروارگانیسم‌ها به نیتروژن را متعادل ساخته و همچنین به عنوان یک ماده افزودنی با ارزش در جهت بهبود ارزش غذایی خوراک مورد توجه قرار بگیرد (۱۴). همچنین والاس و نیوبولد (۴۰) گزارش کردند که افزودن بنتونیت سدیم به جیره، موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد گردید. ویلیامز و ویتز (۴۲) بیان کردند که احتمالاً بنتونیت سدیم از طریق کاهش جمعیت پروتوزوایی (۴۱) و به تبع آن افزایش جمعیت باکتری‌های شکمبه، موجب برداشت بیشتری از نیتروژن آمونیاکی توسط میکروارگانیسم‌ها شده و در نهایت غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه کاهش می‌یابد.

اعتقاد بر این است که بنتونیت‌ها، قادر به جذب و رهاسازی دوباره پروتئین‌ها و سایر سوبستراهای نیتروژنه هستند، از این رو وقتی که تجمع آمونیاک در شکمبه بالا باشد، آن را جذب کرده و زمانی که غلظت آمونیاک کاهش یابد، مقدار زیادی از آن را آزاد می‌کنند و از

این طریق باعث افزایش راندمان استفاده از آمونیاک و پروتئین در شکمبه می‌شوند. گروهی از محققان در دانشگاه تگزاس گزارش کردند که مکانیسم اصلی جذب مولکول AFB1 توسط مونتموریلنیت‌ها از طریق واکنش‌های گیرنده/دهنده‌گی الکترون می‌باشد (۳۱،۱۰) به طوری که گروه کربونیل مولکول AFB1 یک سیستم غنی از الکترون بوده و می‌تواند با کاتیون‌های قابل تبادل در ساختار مونتموریلنیت تشکیل کمپلکس پایدار دهد. از طرف دیگر این محققان بیان نمودند که مولکول‌های AFB1 عمدتاً در لبه‌ها و سطح پایه و همچنین فضاهای بین لایه‌های ذرات مونتموریلنیت جذب می‌گردند. مقایسه بین جاذب‌های آلومینوسیلیکاته مختلف بیان می‌کند که تیمار حاوی جاذب میلانند، قابلیت هضم ماده خشک، نرخ و مقدار تولید گاز بالاتر ($P < 0.05$) و غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری ($P < 0.05$) نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند و مایکوباند داشت، ولی بین تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند و مایکوباند، اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$)، با این وجود از نظر عددی، تیمارهای حاوی جاذب مایکوباند، قابلیت هضم ماده خشک، نرخ و مقدار تولید گاز بالاتر و غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری نسبت به تیمارهای حاوی جاذب‌های مگاباند داشتند. در عین حال هیچ‌گونه اختلاف معنی داری در pH محیط کشت، بین جاذب‌های مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$). تفاوت‌های مشاهده شده در تأثیر نمونه‌های مختلف جاذب‌های بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه می‌تواند به دلیل نوع بنتونیت مورد استفاده، خلوص و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت آن‌ها باشد (۲۹).

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش مقدار AFB1 از صفر به ۹۰۰ نانوگرم در میلی لیتر، نرخ تولید گاز، پتانسیل تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم کاهش می‌یابد، ولی pH محیط کشت تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. همچنین، هیچکدام از جاذب‌های آلومینوسیلیکاته نتوانستند تأثیرات منفی AFB1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه ای در شرایط برون تنی را خنثی نموده و یا کاهش دهند که می‌تواند به دلیل مکانیسم جذب سطحی جاذب‌های آلومینوسیلیکاته برای جذب AFB1 باشد. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که احتمالاً جاذب‌ها نمی‌توانند اثرات منفی AFB1 بر گوارش و تخمیر شکمبه را کاهش دهند و تنها راهکار پیشنهادی، جلوگیری از ورود این سموم به خوراک دام می‌باشد.

جدول ۳- تأثیر آفلاتوکسین B1 و نمونه‌های جاذب بنتونیتی بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و هضم شکمبه

Table 3. Effect of aflatoxin B1 and bentonite adsorbent on the parameters of gas production, fermentation and rumen digestion

فراسنجه‌ها Parameters	جاذب Adsorbent AFB1	—		مگاباند MegaBond		مایکوباند MycoBond		میل‌باند MilBond		SEM	P-Value
		—	AFB1	—	AFB1	—	AFB1	—	AFB1		
فراسنجه‌های تولید گاز Gas production parameters											
نرخ تولید گاز (میلی لیتر بر ساعت)		0.143 ^a	0.128 ^{bc}	0.121 ^{cd}	0.110 ^e	0.124 ^c	0.115 ^{de}	0.134 ^b	0.122 ^{cd}	0.003	0.044
Gas production rate (ml/h)											
تولید گاز (میلی لیتر بر گرم ماده خشک)		163.7 ^a	146.9 ^{bc}	139.5 ^{cd}	126.4 ^e	143.2 ^c	132.1 ^{de}	152.6 ^b	140.4 ^{cd}	3.80	0.021
Gas production parameters of fermentation and digestibility (24h)											
pH		6.53 ^b	6.57 ^b	6.80 ^a	6.74 ^a	6.79 ^a	6.77 ^a	6.73 ^a	6.75 ^a	0.04	0.038
قابلیت هضم ماده خشک (گرم بر گرم ماده خشک)		0.58 ^a	0.55 ^{bc}	0.51 ^{de}	0.48 ^f	0.53 ^{cd}	0.50 ^{ef}	0.55 ^b	0.52 ^{de}	0.01	0.024
Dry matter digestibility (g/1g DM)											
غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر)		18.3 ^a	16.7 ^b	16.9 ^b	15.8 ^{cd}	16.4 ^{bc}	15.3 ^d	15.5 ^d	15.1 ^d	0.41	0.033
N-NH3 (mg/dL)											

* تیمارهای آزمایشی بر اساس افزودن سه نوع جاذب آلومینوسیلیکاته شامل مگاباند، مایکوباند و میل‌باند به مقدار ۶ درصد ماده خشک خوراک پایه، و افزودن آفلاتوکسین B1 (به مقادیر صفر و ۶۰۰ نانوگرم در میلی لیتر محیط کشت) تنظیم شدند.

منابع

- 1- Abdel-Rahman, F. I. S, and K. A. Helal. 2010. Productive Performance of lactating ewes fed diets supplementing with dry yeast and or bentonite as feed additives. World Journal of Agricultural Sciences, 6:43-53.
- 2- Abdullah, N., H. Hanita, Y. W. Ho, H. Kudo, S. Jalaludin, and M. Ivan. 1995. The effects of bentonite on rumen protozoa population and rumen fluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. Asian Australian Journal of Animal Science, 8:249-254.
- 3- Aghashahi, A., A. Nikkhah, S. A. Mirhadi., M. Zahedifar, and H. Mansouri. 2005. Effects of different level of unprocessed bentonite, processed bentonite, and clinoptilolite at different rumen degradable protein level, on ammonia concentration, soluble and digestible protein (*in-vitro*). Pajouhesh and Sazandegi, 70: 80-90. (In Persian).
- 4- Aitchison, E. M., J. B. Rowe, and G. S. Rix. 1986. Effect of bentonite clays on rumen fermentation and diet digestibility. Proceeding of Nutrition Society. Proceeding of Nutrition Society, 11:111-114.
- 5- Arroquy, J. I., R. C. Cochran., T. G. Nagaraja, E. C. Titgemeyer, and D. E. Johnson. 2005. Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. Animal Feed Science and Technology, 120:93-106.
- 6- Broderick, G. A, and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63:64-75.

- 7- Burmeister, H. R., and C. W. Hesseltine. 1966. Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. *Applied Microbiology*, 14: 403-404.
- 8- Cook, W. O., J. L. Richard, G. D. Osweiler, and D. W. Trampel. 1986. Clinical and pathologic changes in acute bovine aflatoxicosis: rumen motility and tissue and fluid concentrations of aflatoxins B1 and M1. *American Journal of Veterinary Research*, 47:1817-1825.
- 9- Davison, T. M., and W. K. Ehrlich. 1997. Adding bentonite to sorghum grain-based supplements has no effect on cow milk production. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37:505-508.
- 10- Deng, Y., A. L. Barrientos Velazquez, F. Billes, and J. B. Dixon. 2010. Bonding mechanisms between aflatoxin B1 and smectite. *Applied Clay Science*, 50: 92-98.
- 11- Dvorak, R., and P. Jagos. 1977. Changes of the clinico-biochemical indices in the ruminal juice and urine in experimental aflatoxicosis of dairy cows. *Veterinary Medicine*, 22:161-169.
- 12- Edrington, T. S., R. B. Harvey, and L. F. Kubena. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of Animal Science*, 72:1274-1281.
- 13- Fehr, P. M., and J. Delage. 1970. Effect de l'aflatoxine sur les fermentations dans le rumen. *C.R. Academy Science Paris*, 270:550-553.
- 14- Fenn, P. D., and R. A. Leng. 1989. Wool growth and sulfur amino acid entry rate in sheep fed roughage-based diets supplemented with bentonite and sulfur amino acids. *Australian Journal of Agriculture Research*, 40:889-896.
- 15- Harvey, R. B., L. F. Kubena, T. D. Phillips, D. E. Corrier, M.H. Elissalde, and W.E. Huff. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Journal of Veterinary Research*, 52:152-156.
- 16- Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. H. Hsieh. 1986. [14C]-aflatoxin B1 metabolism in lactating goats and rats. *Journal of Animal Science*, 62:697-705.
- 17- Helferich, W. G., W. N. Garrett, D. P. H. Hsieh, and R.L. Baldwin. 1986. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *Journal of Animal Science*, 62: 691-696.
- 18- Jacques, K. A., D. E. Axe., T.R. Harris, and D. L. Harmon. 1986. Effect of sodium bicarbonate and sodium bentonite on digestion, solid and liquid flow, and ruminal fermentation characteristics of forage sorghum silage-based diets fed to steers. *Journal of Animal Science*, 63:923-932.
- 19- Jiang, Y. H., H. J. Yang, and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B1 on in vitro ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. *Animal Feed Science and Technology*, 175:85-89.
- 20- Joint FAO/WHO food standards programme. Codex committee on food additives and contaminants. Thirty-third session. 2001 Mar 12-16; The Netherlands 11.
- 21- Korosteleva, S. N., T. K., Smith, and H. J Boermans. 2007. Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90:3867-3873.
- 22- Korosteleva, S. N., T. K. Smith, and H. J. Boermans. 2009. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92:1585-1593.
- 23- Lindemann, M. D., D. J. Blodgett, E. T. Kornegay, and G. G. Schurig. 1993. Potential ameliorations of aflatoxicosis in weanling/growing swine. *Journal of Animal Science*, 71:171-178.
- 24- Masimango, N., J. Remacle, and J. L. Ramaut. 1978. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B1 from contaminated media. *European Journal of Applied Microbiology* 6:101-105.
- 25- Mathur, C. F., and R. C. Smith. 1976. Growth and morphology of *Streptococcus bovis* and of mixed rumen bacteria in the presence of aflatoxin B1, in vitro. *Journal of Dairy Science* 59:455-458.
- 26- Mertens, D. R. 1979. Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows. In *Proc. Interaction of Mycotoxins in Animal Production*. National Academy Science, Washington, DC.
- 27- Morgavi, D., H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. In: Oswald IP, Taranu I. *Mycotoxins in Farm Animals*. Transworld Research Network, Kerala, India.
- 28- Ottenstein, D. M., and D. A. Bartley. 1971. Determination of rumen VFA. *Analytical Chemistry*, 43:952-955.
- 29- Papaioannou, D., P. D. Katsoulos, and H. Karatzias. 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: a review. *Microporous and mesoporous materials*, 84:161-170.
- 30- Pettersson, H., and K. H. Kiessling. 1976. Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and sterigmatocystin on

- microorganisms from sheep rumen. Swedden Journal of Agriculture Research, 6: 161.
- 31- Phillips, T. D., A. B. Sarr, and P. G. Grant. 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. Natural Toxins, 3:204-213.
- 32- Reynal, S. M., I. R. Ipharraguerre, M. Linheiro, A. F. Brito, G. A Broderick, and J. H. Clark. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradabilities. Journal of Dairy Science, 90:1887-1903.
- 33- Saleh, M. S. 1994. Using of feed additives for feeding farm animals, Tanta University, Egypt.
- 34- Saleh, M. S, and A. B. Bonf. 2000. Bentonite supplementation to concentrate for buffaloes. Egyptian Journal of Nutrition and Feed, 6:67-78.
- 35- SAS Institute Inc. 2009. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, S. I., Cary, NC, USA.
- 36- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. Journal of Animal Science, 72:2980-2991.
- 37- Scudamore, K. A., and C. T. Livesey. 1998. Occurrence and Significance of Mycotoxins in Forage Crops and Silage: A Review. Journal of Science and Food Agriculture, 77:1-17.
- 38- Stephenson, R. G. A., J. L. Huff, G. Krebs, and C. J. Howitt. 1992. Effect of molasses, sodium bentonite and zeolite on urea toxicity. Australian Journal of Agricultural Research, 43:301-314.
- 39- Theodorou, M. K, and B. A. Williams. 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.
- 40- Wallace, R. J, and C. J. Newbold. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. Animal Feed Science and Technology, 116:163-168.
- 41- Westlake, K., R. I. Mackie, and M. F. Dutton. 1989. In vitro metabolism of mycotoxins by bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. Animal Feed Science and Technology, 25:169-178.
- 42- Williams, A. G, and S. E. Withers. 1993. Changes in the rumen microbial populations and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. Canadian Journal of Microbiology, 31:61-69.



Effect of Aflatoxin B1 and Aluminosilicate Toxin Adsorbents on the Parameters of Gas Production, Fermentation and Ruminal Digestion (*in vitro*)

M. Mojtahedi^{1*} - M. Danesh Mesgaran² - M. Hayati-Ashtiani³ - S. A. Vakili⁴ - S. M. Vaghar Seyedin⁵

Submitted: 07-10-2018

Accepted: 03-11-2019

Introduction: When aflatoxin contaminated food is given to lactating animals, the metabolite of aflatoxin, called M, is secreted in milk. Since pasteurization, sterilization, and milk processing have little effect on the survival and reduction of AFM1 toxicity, this poison ultimately transports to various dairy products and endangers consumer health. Along with the negative effects of mycotoxins on health and livestock products, these compounds can be effective in digestion, metabolism and ruminal microbial populations. In ruminants (especially lactating cows) fed with AFB1 contaminated feeds, health problems such as liver cancer, reduce immunity, reproductive disorders, malformation, decreased feed intake and milk production have also been reported. An increase in liver enzymes can be attributed to the signs of an abnormal body. In addition, previous studies aluminosilicate has been show to tightly bind aflatoxins *in vitro*. This significantly reduce mortality and morbidity in animals, decrease molecular biomarkers of aflatoxin exposure in humans and animals.

Materials and Methods: Two experiments were conducted to investigate the effect of aflatoxin B1 and aluminosilicate toxin adsorbents on the parameters of gas production contains gas production potential (b) and gas production rate (c), *in vitro* fermentation parameters includes pH, ammonia nitrogen concentration, volatile fatty acids and ruminal digestion. In the first experiment, the effects of different levels of AFB1, including 0, 300, 600 and 900 ng/ml, were investigated on the parameters of gas production, fermentation and digestion using batch culture method. In the second experiment the effectiveness of three aluminosilicate adsorbents on the AFB1 detoxification was investigated. MegaBond and MycoBond as native adsorbents and MilBond as a commercial adsorbent were used in 6% of DM. The gas produced was recorded at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 h of the incubation. The data obtained were fitted to the non-linear equation to calculate parameters of gas production. Also, at the end of 24 h incubation, four bottles were transferred to refrigerator to stop fermentation. Then, pH, ammonia nitrogen concentration and volatile fatty acid (VFA) of batch culture medium was measured, as well as the dry matter digestibility.

Results and Discussion: Results of first experiment indicated that with increasing the AFB1 from 0.0 to 900 ng/ml, the gas production rate (c) decreased from 0.134 to 0.092 ml/h and the gas production potential (b) decreased from 160.7 to 131.3, but there was no significant difference between the treatments 0 and 300 ng/ml AFB1. In addition, the gas production lag phase increased significantly with increasing level of AFB1 ($P<0.05$). Addition of AFB1 to the batch culture did not affect its pH, but the dry matter digestibility significantly decreased ($P<0.05$) with increasing AFB1. Ammonia nitrogen concentration decreased significantly ($P<0.05$) with AFB1 addition, so that the lowest concentration of ammonia nitrogen was observed at 600 and 900 ng/ml AFB1 (15.2 and 15.3 mg/dL, respectively). In this experiment the total VFA concentration decreased significantly with AFB1 ($P<0.05$), but the molar ratio of acetate, propionate, butyrate, valerate and isovalerate was not affected ($P>0.05$). In the second addition of different aluminosilicate adsorbents significantly reduced the rate and potential of gas production. Likewise, dry matter digestibility and ammonia nitrogen concentration reduced significantly ($P<0.05$). Significant increase in pH of the culture medium by addition of aluminosilicate adsorbents can be attributed to the fact that aluminosilicate acts as a modifier of hydrogen ion in the environment due to the replacement of cations with hydrogen ion and prevents a significant decrease in rumen pH. Probably lowering the ammonia nitrogen concentration is due to the fact that the protozoan population is affected by aluminosilicate adsorbent and decreases; consequently, the population of the ruminal bacteria increases, which results in the removal of more ammonia nitrogen by microorganisms, and ultimately the concentration ammonia nitrogen decreases in the rumen.

Conclusion: The results of this study showed that AFB1 reduced gas production rate (c), the gas production potential (b), the concentration of ammonia and digestibility, but the pH is not affected *in vitro*. Also, none of the adsorbents was able to neutralize or reduce the negative effects of AFB1 on the parameters of gas production,

fermentation and rumen digestion, which could be due to the absorption mechanism of aluminosilicate adsorbents for AFB1 absorption. The results of this study indicate that adsorbents cannot reduce the negative effects of AFB1 on digestion and rumen fermentation, therefore only proposed strategy is to prevent the contamination animal feed with mycotoxins.

Keywords: Adsorption aluminosilicate, Aflatoxin, *in vitro*, Ruminal fermentation.



مقاله علمی - پژوهشی

ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با پرتو میکروویو

سیدروح اله ابراهیمی محمودآباد^{۱*} - علی نیکخواه^۲ - علی اصغر صادقی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۹

چکیده

این آزمایش به منظور مطالعه اثرات پرتو میکروویو بر تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام و حقیقی، قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام، ترکیبات ضد تغذیه‌ای (گلوکوسینولات و اسید فایتیک) و ترکیبات شیمیایی کنجاله منداب اصلاح شده انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری نشده و کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با پرتو میکروویو با قدرت ۸۰۰ وات به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه بودند. میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام و حقیقی به روش کیسه‌های نایلونی اندازه‌گیری شد. مقدار ۶ گرم از هر تیمار به مدت صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکمبه سه رأس گاو نر تالشی انکوباسیون شد. میزان پروتئین حقیقی با روش برادفورد و نحوه تجزیه شدن آن در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شکمبه با روش الکتروفورز SDS-PAGE تعیین شد. قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام به روش آنزیمی سه مرحله‌ای تعیین شد. عمل‌آوری با پرتو میکروویو سبب کاهش اسید فایتیک و گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب اصلاح شده به صورت روند خطی و درجه دو شد. پرتوتابی با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه اسید فایتیک کنجاله منداب اصلاح شده را به ترتیب به میزان ۱۳، ۳۰ و ۵۱ درصد نسبت به کنجاله منداب عمل‌آوری نشده کاهش داد. مقدار گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب پرتوتابی شده با میکروویو به مدت ۶ دقیقه به میزان ۶۷ درصد نسبت به کنجاله عمل‌آوری نشده کاهش یافت. پرتو میکروویو کاهش بخش سریع تجزیه، نرخ ثابت تجزیه و تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک و افزایش بخش کند تجزیه ماده خشک و پروتئین خام و حقیقی کنجاله منداب اصلاح شده را سبب شد. قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده با عمل‌آوری با میکروویو تا ۴ دقیقه به طور معنی‌دار افزایش یافت. الکتروفورز پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده نشان داد که عمده پروتئین در آنها شامل ناپین (آلبومین ۲S) با دو زیرواحد و کروسیفرین (گلوبولین ۱۲S) با چهار زیرواحد بود. تجزیه‌های الکتروفورز پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده نشان داد که در کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری نشده چهار زیرواحد کروسیفرین؛ در کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده، چهار زیرواحد کروسیفرین و زیرواحدهای ناپین بخش عمده پروتئین عبوری را تشکیل دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که عمل‌آوری با میکروویو سبب کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین خام و حقیقی در شکمبه، افزایش قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام و کاهش مقدار ترکیبات ضد تغذیه‌ای کنجاله منداب اصلاح شده شد.

واژه‌های کلیدی: پرتوتابی، تجزیه پذیری، کنجاله منداب اصلاح شده، مواد ضد تغذیه‌ای.

مقدمه

ادامه یابد. با افزایش تولید شیر در گاوهای شیرده، نیاز پروتئینی گاوهای شیرده نیز افزایش یافته و تأمین این نیازها مستلزم افزایش مقدار مواد خوراکی با پروتئین با کیفیت در جیره است (۳۵). به منظور تأمین احتیاجات پروتئینی گاوهای پرتولید و ممتاز، در نظر گرفتن مقدار کافی پروتئین سریع تجزیه در شکمبه برای تأمین نیاز میکروارگانیزم‌ها و بازدهی مطلوب اکوسیستم میکروبی و همچنین مقدار کافی پروتئین عبوری برای عملکرد قابل قبول حیوان، با حداقل مقدار پروتئین خام جیره ضروری است (۳۵ و ۵۱).

یکی از راهکارهای تأمین پروتئین عبوری مورد نیاز نشخوارکنندگان پرتولید (شیرده یا پرواری) استفاده از پودر ماهی یا کنجاله گلوتن ذرت است. استفاده از این مواد خوراکی علاوه بر

تولید شیر گاوهای شیرده به دلیل بهبود پتانسیل ژنتیکی و مدیریت تغذیه‌ای و عوامل محیطی در طی دو دهه گذشته افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته و به نظر می‌رسد این روند افزایشی همچنان

۱-دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استاد و دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: (Email: ebrahimiyaazd@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.77304

قطب‌های مغناطیسی به طور همزمان می‌دهد. هر چه طول موج کمتر باشد انرژی بیشتری توسط موج منتقل می‌شود (۱۷ و ۳۷). میکروویو فرکانس مناسبی برای واکنش نشان دادن با مولکول‌های آب و گرم کردن مواد خوراکی دارد. آب به دلیل داشتن طبیعت دوقطبی، مولکول اصلی تحت تأثیر امواج الکترومغناطیس است. وقتی امواج الکترومغناطیس به ماده خوراکی یا غذا برخورد می‌کند، مولکول‌های آب به شدت شروع به چرخیدن می‌کند که سبب زیاد شدن برخورد مولکول‌ها و تولید گرما در سطح و درون غذا به صورت یکسان می‌شود. این امواج به درون ماده خوراکی نفوذ می‌کند و سبب گرم شدن یکنواخت مواد غذایی می‌شوند. در این فرآیند زمان لازم برای عمل آوری مواد خوراکی نسبت به روش‌های دیگر که گرما از سطح به درون غذا باید نفوذ کند، کمتر است (۳۷). حرارت سبب واسرشتی پروتئین‌ها، همچنین بروز واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی (میلارد^۲) بین گروه آلدیدی قندها و گروه آمین آمینواسید پروتئین‌ها شده و کمپلکس آمینو-قند تشکیل می‌شود. این کمپلکس در مقابل تجزیه میکروبی در شکمبه مقاوم‌تر از پلی‌پپتیدهای معمولی است ولی آمینواسیدهای موجود در کمپلکس در روده باریک قابل هضم و جذب هستند (۵۶).

اخیراً گزارشاتی در ارتباط با اثر عمل‌آوری مواد خوراکی مورد استفاده در جیره دام و طیور با میکروویو ارائه شده است. نتایج این آزمایش‌ها نشان دادند که عمل‌آوری با میکروویو می‌تواند سبب کاهش مواد ضد تغذیه‌ای، کاهش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین و افزایش قابلیت هضم روده‌ای برخی مواد خوراکی شود (۱۵، ۱۶، ۳۹، ۴۲ و ۴۴)؛ ولی در رابطه با اثر عمل‌آوری با میکروویو بر مواد ضد تغذیه‌ای، تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام و حقیقی و قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده اطلاعات کمی در دسترس است؛ بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات عمل‌آوری با پرتو میکروویو بر مواد ضد تغذیه‌ای (گلوکوسینولات‌ها و اسید فایتیک)، ترکیبات شیمیایی، روند تجزیه‌پذیری پروتئین خام و حقیقی، تعیین وزن مولکولی و مشخص کردن الگوی زیرواحدهای پروتئینی کنجاله منداب اصلاح شده بود.

مواد و روش‌ها

عمل‌آوری با میکروویو

کنجاله منداب اصلاح شده از شرکت دامداران استان یزد تهیه و پس از آسیاب و تعیین ماده خشک، رطوبت ماده خوراکی به ۲۵ درصد رسانده شد. سپس، نمونه‌ها شامل ۵۰۰ گرم کنجاله منداب در دستگاه میکروویو با قدرت ۸۰۰ وات به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه در معرض امواج میکروویو قرار گرفتند. نمونه‌های ماده خوراکی از میکروویو خارج و در سینی قرار داده شد تا خنک شوند. سپس به کیسه‌های پلاستیکی

محدودیت‌هایی که دارند، معمولاً مقرون به صرفه نیستند. امروزه کنجاله دانه‌های روغنی بطور وسیع در تغذیه گاوهای شیرده پرتولید بکار می‌روند؛ ولی میزان تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای بعضی از کنجاله‌ها زیاد بوده و مقدار زیادی از پروتئین آنها در شکمبه به آمونیاک تبدیل می‌شود. لذا افزایش پروتئین عبوری این منابع پروتئینی با ارزش، از اهمیت ویژه‌ای در تغذیه نشخوارکنندگان پرتولید برخوردار است.

منداب اصلاح شده (براسیکا کامپستر^۱) دانه روغنی است که در چند سال اخیر، تولید آن در ایران افزایش یافته است. بر اساس آمار مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ میزان تولید دانه کانولا ۱۸۱ هزار تن بوده است (۱). مصرف کنجاله منداب اصلاح شده به دلیل بالا رفتن قیمت سایر کنجاله‌های رایج (کنجاله سویا و کنجاله پنبه دانه) در تغذیه گاو شیرده افزایش یافته است، ولی علی‌رغم ترکیب آمینواسید مناسب، به جهت تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای زیاد، بخش زیادی از پروتئین آن در شکمبه تجزیه شده و ارزش غذایی آن کاهش می‌یابد. تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله کنجاله منداب اصلاح شده در شکمبه حدود ۶۵ درصد است که نسبت به تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله سویا و کنجاله پنبه دانه به ترتیب ۳۱ و ۵۳ درصد بالاتر است (۳۵). همچنین، هر چند در نوع اصلاح شده منداب (کانولا)، مقدار مواد ضد تغذیه‌ای کاهش یافته است، ولی هنوز مقداری مواد ضد تغذیه‌ای بویژه گلوکوسینولات‌ها و اسید فایتیک وجود دارد (۱۹، ۲۳ و ۶۰).

گلوکوسینولات‌ها، ترکیبات حاوی گوگرد، از متابولیت ثانویه گیاهان بوده و از نظر بیولوژیکی غیر فعال‌اند؛ ولی محصولات حاصل از تجزیه آنزیمی آنها دارای فعالیت بیولوژیکی‌اند. مصرف این ترکیبات سبب کاهش مصرف خوراک، کاهش باروری و کاهش تولید شیر در گاوهای شیرده (۲ و ۵۴)، کاهش وزن میش‌های شیرده در زمان آبستنی (۲۹)، کاهش رشد روزانه بره‌های پرواری (۴۹) و کاهش مصرف خوراک، کاهش رشد و افزایش مرگ و میر جوجه‌های گوشتی (۳۰) می‌شود.

در طی سالیان گذشته روش‌های مختلف عمل‌آوری برای کاهش ترکیبات ضد تغذیه‌ای و تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین کنجاله دانه‌های روغنی شامل حرارت خشک و مرطوب، استفاده از فرمالدئید، لیگنو سولفونات، زایلوز و اسیدهای آلی (۱۳، ۱۸، ۱۹، ۲۴، ۳۲ و ۵۹) استفاده شده است. عمده‌ترین روش عمل‌آوری فیزیکی استفاده از حرارت بوده است (۳۵). یکی از عمل‌آوری‌های حرارتی که در صنایع غذایی و مهندسی مواد خوراکی کاربرد زیادی پیدا کرده است، عمل آوری با میکروویو است. امواج کوتاه مانند امواج نور یا امواج رادیویی، قسمتی از طیف الکترومغناطیس انرژی است که دو میدان الکتریکی و مغناطیسی دارند و به آنها اجازه اعمال فشار بر بارهای الکتریکی و

منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

تعیین ترکیبات شیمیایی کنجاله منداب اصلاح شده

تجزیه شیمیایی کنجاله منداب عمل‌آوری نشده و عمل‌آوری شده با پرتو میکروویو با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی (۵) در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تعیین شد. ماده خشک با قرار دادن نمونه‌های مواد خوراکی در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، و با قرار دادن نمونه‌های مواد خوراکی در کوره الکتریکی با دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت، خاکستر آنها اندازه‌گیری شد. چربی خام با استفاده از دستگاه Soxtec مدل ۱۰۳۴ و یک ساعت شستشو با دی اتیل اتر اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین خام مواد خوراکی نیز با استفاده از دستگاه کج‌لدال تعیین شد (نیتروژن $\times 6/25$). مقدار پروتئین حقیقی هر یک از مواد خوراکی با روش برادفورد (۹) تعیین شد. برای تعیین مقدار پروتئین حقیقی هر یک از مواد خوراکی از آلبومین سرم گاوی برای رسم منحنی استاندارد و کماسی بریلینت بلو برای اتصال به پروتئین (آمینواسید ترئونین و آروماتیک) استفاده شد. مقدار پروتئین حقیقی با استفاده دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دقت $0.02/0.02$ میکروگرم در میلی‌لیتر قرائت شد. الیاف نامحلول در شوینده خنثی به روش ون سوست و همکاران (۵۴) و با استفاده از دستگاه Fibertic (فایبرتک سیستم، تکتاور، سوئد) اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام

برای تعیین تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین، کنجاله با الک ۲ میلی‌متری آسیاب شدند. مقدار ۶ گرم نمونه ماده خوراکی عمل‌آوری نشده و عمل‌آوری شده به مدت صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکمبه سه راس گاو نر نژاد تالشی با میانگین وزن ۴۱۶ کیلوگرم دارای فیستولای شکمبه در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور طبق روش میچالت-دورا و اولدبا (۳۱) انکوباسیون شد. گاوها با جیره حاوی ۷۰ درصد علوفه (یونجه خشک و کاه گندم به نسبت ۷۰ به ۳۰) و ۳۰ درصد کنسانتره (۵۳ درصد آرد جو، ۱۳ درصد کنجاله کانولا، ۱۶ درصد دانه کانولا، ۴ درصد کنجاله پنبه دانه، ۱۲ درصد سبوس گندم، ۱ درصد کربنات کلسیم و ۱ درصد مکمل مواد معدنی و ویتامینی) به مقدار ۸ کیلوگرم ماده خشک در روز به صورت جیره کاملاً مخلوط در دو نوبت صبح و عصر در ساعت‌های ۸ و ۱۶ دو هفته قبل و طی دوره آزمایش تغذیه شدند. گاوها در جایگاه‌های انفرادی نگهداری و دسترسی آزاد به آب و بلوک‌های لیسیدنی نمک داشتند. کیسه‌های مورد استفاده از جنس پلی استر و در ابعاد 10×20 سانتی‌متر با قطر منافذ ۴۵ میکرون بود. مقدار نمونه با رعایت نسبت وزن نمونه به

سطح کیسه تعیین شد به طوری که فضای خالی مناسب در کیسه فراهم باشد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، کیسه‌های حاوی مواد باقیمانده از داخل شکمبه خارج و بلافاصله با آب شستشو داده شد. پس از شستشوی کامل، کیسه‌ها داخل آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. اختلاف وزن محتویات کیسه‌ها قبل و بعد از انکوباسیون به عنوان مقدار ناپدید ماده خشک در زمان‌های مختلف انکوباسیون در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری مقدار ناپدید شدن کنجاله در زمان صفر یا مقدار مواد محلول در آب، کیسه‌های حاوی ۶ گرم نمونه در دو تکرار با آب سرد شستشو داده شد. پس از خشک کردن، اختلاف وزن محتویات کیسه‌ها قبل و بعد از شستشو به عنوان مقدار ناپدید شدن ماده خشک در زمان صفر در نظر گرفته شد. مقدار پروتئین خام و حقیقی باقیمانده‌های داخل کیسه‌ها برای تعیین روند تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام

قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین به روش سه مرحله‌ای کالسامیگلیا و استرن (۱۰) اندازه‌گیری شد. کیسه‌های حاوی نمونه‌های مواد خوراکی به مدت ۱۶ ساعت در شکمبه نگهداری و باقیمانده هضم نشده شکمبه‌ای (تقریباً حاوی ۱۵ میلی‌گرم نیتروژن) به مدت ۱ ساعت در ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال که حاوی ۱ گرم پپسین در هر لیتر بود، انکوباسیون شد. سپس pH مخلوط با ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ نرمال و ۱۳/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH ۷/۸ خنثی و ۳۷/۵ میلی‌گرم پانکراتین اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعته در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس پروتئین‌های هضم نشده با محلول اسید تری کلرو استیک رسوب داده شد. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه ($10000 \times g$) سانتریفیوژ شد و محلول بالائی برای تجزیه نیتروژن جدا شد. قابلیت هضم پروتئین به صورت نیتروژن محلول در اسید تری کلرو استیک تقسیم بر مقدار نیتروژن در نمونه (مواد باقیمانده در کیسه‌های نایلونی) اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری اسید فایتیک و گلوکوسینولات‌ها

اسید فایتیک با استفاده از روش دبولند و همکاران (۱۴) اندازه‌گیری شد. در این روش نمونه‌های ماده خوراکی به طول ۲ میلی‌متر آسیاب شدند. مقدار ۲ گرم نمونه از هر ماده خوراکی در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۱/۲ درصد اسید کلریدریک و ۱۰ درصد سولفات سدیم به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و سپس با سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۵ دقیقه ($14300 \times g$) عصاره‌گیری شدند. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ها پس از رقیق کردن با ۱۰ میلی‌لیتر آب و فرآوری

با ۵ میلی لیتر کلرید آهن و اسید کلریدریک حاوی سولفات سدیم جوشانده و به مدت ۱۵ دقیقه ($3220 \times g$) سانتریفیوژ شدند. فسفر موجود در نمک آهن غیر محلول پس از هضم با ۳ میلی لیتر اسید سولفوریک و ۵ میلی لیتر اسید نیتریک، به وسیله اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. با فرض اینکه اسید فایتیک حاوی ۲۸/۲ درصد فسفر است، اسید فایتیک نمونه ها محاسبه شد. گلوکوسینولات ها به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (۱۲). در این روش ابتدا نمونه ها با آسیاب دارای الک یک میلی متری آسیاب شدند و در پلیت های مختلف مقدار یک گرم از هر ماده خوراکی ریخته شد. سپس به نمونه شاهد ۲۰ سی سی متانول ۴۰ درصد برای از بین بردن فعالیت آنزیم اضافه و به نمونه های اصلی ۲۰ سی سی آب اضافه شد. پس از ۵ دقیقه روی کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم به نمونه ها اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. گلوکز ایجاد شده به گلوکز ۶-فسفات تبدیل می شود که با اسپکتروفتومتر تعیین شد.

پس از بیرون آوردن ژل ها از شیشه های الکتروفورز با محلول حاوی ۰/۰۲۵ گرم رنگ کوماسی بلو G-250، ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۴۰ درصد متانول به مدت ۲۴ ساعت رنگ آمیزی و سه مرتبه با محلول حاوی ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۵ درصد متانول با قرار دادن بر شیکر رنگ بری و سپس با دوربین معمولی تصویربرداری شدند (۲۷).

برآورد وزن مولکولی زیرواحدهای پروتئین ها

برای تعیین وزن مولکولی زیرواحدهای پروتئینی از نرم افزار Phopto Capture (ویرایش ۱۹۹۹) استفاده شد. نرم افزار فوق بر اساس محاسبه حرکت نسبی هر پروتئین مارکر در ژل و مقایسه آن با حرکت نسبی هر زیرواحد، وزن مولکولی آن زیرواحد را تعیین می کند (۴۱).

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات:

پس از محاسبه درصد تجزیه پذیری نمونه ها در ساعت های مختلف انکوباسیون در شکمبه، فراسجده های مختلف تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک و پروتئین خام و حقیقی در نرخ های عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت با استفاده از بسته نرم افزاری Fit curve و رابطه ارسکوف و مکدونالد (۳۸) محاسبه شد.

$$ED = a + b / (c + k)$$

در این دو رابطه a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c نرخ ثابت تجزیه در واحد زمان، k نرخ عبور از شکمبه و ED تجزیه پذیری مؤثر است.

آزمایش تجزیه پذیری و قابلیت هضم در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با شش تکرار (سه حیوان $\times$ دو کیسه برای هر زمان انکوباسیون در هر گاو) انجام شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk}$ بود. به منظور تعیین اثر پرتو میکروویو بر مواد ضد تغذیه ای (گلوکوسینولات و اسید فایتیک) و ترکیبات

الکتروفورز پروتئین

برای تعیین وضعیت زیرواحدهای پروتئین ماده خوراکی، از تکنیک الکتروفورز ژل پلی آکریلامید با اندکی تغییرات به روش لاملی (۲۷) استفاده شد.

استخراج پروتئین حقیقی مواد خوراکی برای انجام الکتروفورز:

برای استخراج پروتئین حقیقی مقدار ۱۵ میلی گرم نمونه های عمل آوری نشده و میکروویو شده و یا انکوباسیون شده در ساعات مختلف در شکمبه به درون لوله های اپندورف منتقل شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی ۰/۶۲۵ مولار Tris-HCl ($pH=6.8$)، ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۲/۵ درصد بتا مرکاپتو اتانول، ۷ درصد گلیسرول، ۴ میلی گرم بروموفنل بلو اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه به هم زدن بر روی همزن مخصوص لوله اپندورف در دمای ۴ درجه سانتی گراد، پروتئین نمونه ها استخراج و پس از قرار دادن در آب ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه ($10000 \times g$) مایع صاف شده بالائی جدا شد. مایع بالائی به لوله های اپندورف منتقل و برای انجام الکتروفورز استفاده شد (۲۷).

از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل TV400 برای الکتروفورز استفاده شد. ۳۰ میکرولیتر از مایع بالائی نمونه های انکوباسیون نشده و انکوباسیون شده در ساعات مختلف به چاهک های الکتروفورز با ژل بالائی حاوی ۳/۷۵ درصد آکریلامید-بیس آکریلامید و ژل پائینی حاوی ۱۴ درصد آکریلامید-بیس آکریلامید منتقل شد. ابعاد ژل

شیمیایی کنجاله منداب اصلاح شده آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$ بود. در این مدل ها Y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین صفت مورد مطالعه، T_i اثر عمل‌آوری، B_j اثر حیوان و e_{ij} خطای آزمایشی است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در این مطالعه با استفاده از نسخه ۶/۱۲ بسته نرم افزاری SAS (۴۵)، Proc GLM صورت گرفت. پس از تجزیه واریانس، میانگین‌ها با آزمون کمترین اختلاف معنی دار مقایسه شدند. اثرات تیمارهای آزمایشی در تمامی متغیرها به اثرات خطی (linear) و درجه دو (quadratic) متعامد تفکیک شد.

نتایج و بحث

اثرات پرتو میکروویو بر ترکیبات شیمیایی و مواد ضدتغذیه‌ای کنجاله منداب اصلاح شده

اثرات عمل‌آوری با پرتو میکروویو بر ترکیبات شیمیایی و مواد ضدتغذیه‌ای کنجاله منداب اصلاح شده در جدول ۱ گزارش شده است. عمل‌آوری با پرتو میکروویو اثر معنی‌داری بر ترکیبات شیمیایی

کنجاله منداب اصلاح شده نداشت ($P > 0.05$)؛ ولی سبب کاهش مواد ضد تغذیه‌ای آن به صورت خطی و درجه دو شد ($P < 0.01$) که با نتایج آزمایش‌های سایر محققین (۱۵، ۱۶، ۲۶ و ۴۸) هماهنگی دارد؛ ولی با نتایج آزمایش پیر عدل و همکاران (۴۲) هماهنگی ندارد. پرتوتابی با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه اسید فایتیک کنجاله منداب اصلاح شده را به ترتیب به میزان ۱۳، ۳۰ و ۵۱ درصد نسبت به کنجاله منداب عمل‌آوری نشده کاهش داد. میزان گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب پرتوتابی شده با میکروویو به مدت ۶ دقیقه به میزان ۶۷ درصد نسبت به کنجاله عمل‌آوری نشده کاهش یافت. شیخعلی پور و همکاران (۴۷) گزارش کردند که پرتوتابی دانه ماشک با میکروویو به مدت ۳ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات تأثیری بر ترکیبات شیمیایی آن نداشت. پیر عدل و همکاران (۴۲) گزارش کردند که پرتوتابی واریته‌های مختلف جو با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه با قدرت ۹۰۰ وات سبب کاهش ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و الیاف نامحلول در شوینده خنثی آن شد. نتایج مشابهی به وسیله سایر محققین نیز گزارش شده است (۳ و ۳۳).

جدول ۱- اثر عمل‌آوری با میکروویو بر میانگین ترکیبات شیمیایی و مواد ضد تغذیه‌ای کنجاله منداب اصلاح شده بر مبنای ماده خشک

Table 1-effects of microwave irradiation on chemical composition and anti-nutritional factors of CM

Untreated CM	Microwave-irradiated CM				SEM	P Value	Untreated vs Irradiated	Orthogonal contrasts	
	2 min	4 min	6 min					Linear	Quadratic
ماده خشک Dry matter (g/kg)	892	891	893	895	4.6	0.86	0.86	0.51	0.60
پروتئین خام Crude protein (g/kg DM)	366	362	364	367	2.7	0.46	0.52	0.67	0.14
عصاره اتری Ether extract (g/kg DM)	30	30	30	29.8	5.8	0.87	0.47	0.66	0.68
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral Detergent Fiber (g/kg DM)	269	268	269	272	0.97	0.79	0.90	0.48	0.49
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid Detergent Fiber (g/kg DM)	171	174	175	176	6.9	0.67	0.27	0.24	0.77
خاکستر Ash (g/kg DM)	69.2	69.7	69.8	71.5	1.44	0.37	0.31	0.11	0.55
اسید فایتیک Phytic acid (g/kg DM)	44.7 ^a	38.8 ^b	31.2 ^c	22.0 ^d	0.83	0.01	0.01	0.01	0.20
گلوکوسینولات Glucosinolate (mmol/g)	21.6 ^a	13.3 ^b	9.5 ^c	7.1 ^d	2.01	0.01	0.01	0.01	0.01

^{a, b, c, d} میانگین‌های هر ردیف با حروف مختلف از لحاظ آماری اختلاف معنی دار دارند.

CM: کنجاله کانولا، SEM: اشتباه معیار میانگین

^{a, b, c, d} Means in the same row with different letters are different
CM, canola meal, SEM, standard error of mean

مبارک (۳۳) گزارش کرد که با عمل آوری لوبیا با میکروویو به مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز، مقدار اسید فایتیک لوبیا کاهش یافت. همچنین، الاجاجی و ال-ادوای (۳) نشان دادند که عمل آوری نخود با میکروویو به مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز و اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سبب کاهش اسید فایتیک نخود به ترتیب به میزان ۳۸ و ۴۲ درصد شد.

اثرات منفی اسید فایتیک شامل کاهش زیست‌فراهمی مواد معدنی و کاهش قابلیت هضم اسیدهای آمینه در روده کوچک است (۱۰ و ۴۸). همچنین اسید فایتیک قابلیت هضم نشاسته را در طیور کاهش می‌دهد (۴۹ و ۶۱). به نظر می‌رسد که امواج میکروویو سبب تجزیه شیمیایی فیتات به اینوزیتول فسفات‌های با گروه‌های فسفر کمتر و یا با شکاف حلقه فیتات سبب کاهش مقدار اسید فایتیک می‌شود (۱۷).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عمل آوری با میکروویو سبب کاهش مقدار گلوکوسینولات ماده خوراکی مورد مطالعه شد ($P < 0.01$) که با نتایج مطالعه‌های سایر محققین (۱۵، ۲۸ و ۵۲) هماهنگی دارد. مقدار گلوکوسینولات‌ها با افزایش مدت زمان عمل آوری با میکروویو کاهش یافت. عمل آوری با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه به ترتیب سبب کاهش مقدار گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب اصلاح شده در حد ۳۸، ۵۶ و ۶۷ درصد نسبت به کنجاله عمل آوری نشده شد. نتایج آزمایش‌های ماهشوری و همکاران (۲۸) نشان داد که عمل آوری کنجاله منداب (۹۸/۷ درصد ماده خشک) با میکروویو به مدت ۲/۵ دقیقه با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز سبب تجزیه کل گلوکوسینولات‌ها به میزان ۳۷ درصد شد. مقدار گلوکوسینولات‌ها با افزایش رطوبت و مدت زمان عمل آوری کاهش یافت (۲۸). والجو و همکاران (۵۳) گزارش کردند که عمل آوری کلم (۱۵ درصد رطوبت) با میکروویو به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۱۰۰۰ وات سبب تجزیه گلوکوسینولات‌ها به میزان ۷۴ درصد شد. همچنین ابراهیمی محمودآباد و همکاران (۱۵) گزارش کردند که عمل آوری دانه منداب بومی با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات سبب کاهش مقدار گلوکوسینولات‌های به ترتیب به میزان ۳۵، ۵۲ و ۶۴ درصد نسبت به دانه عمل آوری نشده شد. کاهش در مقدار گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب با سایر عمل‌آوری‌های حرارتی نیز گزارش شده است (۱۹ و ۲۴). فتویک و همکاران (۱۹) گزارش کردند که میکرونیزه کردن کنجاله منداب به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد در کاهش گلوکوسینولات‌ها مؤثر بود. نتایج مشابهی هانگ و همکاران (۲۴) با نواری کردن کنجاله منداب مرطوب در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند.

مصرف زیاد گلوکوسینولات‌ها سبب کاهش خوش‌خوراکی جیره، کاهش رشد و کاهش تولید شیر می‌شود (۲). مصرف زیاد کنجاله منداب دارای گلوکوسینولات کم در جیره گاو شیرده سبب کاهش

تولید مثل و اختلال غده تیروئید شده است (۲). سازوکار کاهش گلوکوسینولات‌های کنجاله منداب اصلاح شده شد. پس از عمل آوری با میکروویو شامل تجزیه گلوکوسینولات‌ها و حذف محصولات حاصل از تجزیه بویژه ایزوتیوسیانات‌ها و اکسازولیدین تیون است (۱۹، ۲۴ و ۳۶).

اثرات میکروویو بر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری و قابلیت هضم پروتئین خام

اثرات عمل آوری با میکروویو بر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده در جدول ۲ گزارش شده است. پروتئین خام کنجاله عمل آوری نشده منحنی تجزیه‌پذیری با بخش سریع تجزیه ۲۵۴ گرم در کیلوگرم، بخش کند تجزیه ۶۹۷ گرم در کیلوگرم و نرخ ثابت تجزیه بخش کند تجزیه ۰/۰۸۳ درصد در ساعت داشت. مقادیر تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام بدست آمده در این پژوهش با مقادیر بدست آمده توسط سایر محققین هماهنگی دارد (۳۲ و ۴۳)؛ ولی مقادیر بخش سریع تجزیه، بخش کند تجزیه و تجزیه پذیری بالقوه پروتئین خام گزارش شده در این آزمایش بیشتر از مقادیر گزارش شده توسط قنبری و همکاران (۲۲) بود که این تفاوت را می‌توان به متفاوت بودن روش اندازه‌گیری تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای، نوع وارسته و ترکیب شیمیایی کنجاله منداب مورد آزمایش نسبت داد. عمل آوری کنجاله منداب اصلاح شده با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه سبب کاهش بخش سریع تجزیه ماده خشک و پروتئین خام به صورت خطی و درجه دو شد ($P < 0.01$). عمل آوری با میکروویو تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک در سرعت عبور ۵ و ۸ درصد نسبت به کنجاله عمل آوری نشده با روند خطی کاهش داد ($P < 0.01$). عمل آوری با میکروویو بیش از ۲ دقیقه تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام را به صورت روند خطی و درجه دو کاهش داد (۰/۰۱). $P < 0.01$ تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری شده با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه به ترتیب در حد ۴، ۱۴ و ۲۳ درصد نسبت به کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری نشده کاهش یافت. نرخ ثابت تجزیه پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده پس از عمل آوری با میکروویو به مدت ۴ و ۶ دقیقه به ترتیب ۳۸ و ۴۰ درصد نسبت به کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری نشده کاهش یافت. نتایج این مطالعه با نتایج آزمایش‌های محققین دیگر هماهنگی دارد (۴۳، ۴۴، ۴۶ و ۴۷). شورنگ و همکاران (۴۶) گزارش کردند که عمل آوری کنجاله سویا با پرتو میکروویو به مدت ۴ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات بخش سریع تجزیه، نرخ ثابت تجزیه و تجزیه پذیری مؤثر شکمبه‌ای پروتئین خام را به ترتیب به میزان ۸، ۶۷ و ۵ درصد نسبت به کنجاله عمل آوری نشده کاهش و بخش کند تجزیه پروتئین خام کنجاله عمل آوری شده را به

میزان ۶۳ درصد نسبت به کنجاله عمل آوری نشده افزایش داد. سریع تجزیه پروتئین خام دانه ماشک نسبت به دانه عمل آوری نشده شیخعلی پور و همکاران (۴۷) گزارش کردند که پرتوتابی دانه ماشک با میکروویو به مدت ۳ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات سبب کاهش بخش

جدول ۲- اثرات پرتو میکروویو بر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین خام و قابلیت هضم برون تنی پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده
Table 2-Effects of microwave irradiation on rumen degradation parameters of dry matter and crude protein and in vitro crude protein digestibility of CM

	کنجاله کانولا عمل آوری نشده Untreated CM	کنجاله کانولا پرتوتابی شده Microwave irradiated CM			اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی P داری value	Untreated vs Irradiated	Orthogonal contrasts	
		2 min	4 min	6 min				Linear	Quadratic
ماده خشک Dry matter									
بخش سریع تجزیه (گرم/کیلوگرم) $a(g/kg)^1$	298 ^a	272 ^{ab}	244 ^{bc}	167 ^d	10.76	0.01	0.01	0.01	0.01
بخش کند تجزیه (گرم/کیلوگرم) $b(g/kg)^2$	552 ^c	561 ^{bc}	603 ^{bc}	677 ^a	17.74	0.01	0.01	0.01	0.06
پتانسیل تجزیه پذیری (گرم/کیلوگرم) $a+b(g/kg)$	849	833	847	844	14.07	0.99	0.99	0.99	0.97
سرعت تجزیه پذیری c/h^3	0.082 ^a	0.074 ^a	0.045 ^b	0.045 ^b	0.0043	0.01	0.01	0.01	0.83
تجزیه پذیری موثر (گرم/کیلوگرم) Effective rumen degradation (g/kg) ⁴									
0.02/h	740 ^a	713 ^a	660 ^b	632 ^c	8.23	0.01	0.01	0.01	0.21
0.05/h	640 ^a	606 ^b	527 ^c	484 ^d	8.49	0.01	0.01	0.01	0.06
0.08/h	577 ^a	541 ^b	450 ^c	408 ^d	8.71	0.01	0.01	0.01	0.03
پروتئین خام Crude protein									
بخش سریع تجزیه (گرم/کیلوگرم) $a(g/kg)^1$	254 ^a	223 ^{ab}	214 ^b	153 ^c	10.24	0.01	0.01	0.01	0.01
بخش کند تجزیه (گرم/کیلوگرم) $b(g/kg)^2$	697 ^d	736 ^{bcd}	752 ^{abc}	780 ^{ab}	10.48	0.02	0.01	0.01	0.60
پتانسیل تجزیه پذیری (گرم/کیلوگرم) $a+b(g/kg)$	952	959	966	933	9.06	0.66	0.92	0.43	0.35
سرعت تجزیه پذیری c/h^3	0.083 ^a	0.099 ^a	0.051 ^b	0.060 ^b	0.0040	0.01	0.01	0.01	0.79
تجزیه پذیری موثر (گرم/کیلوگرم) Effective rumen degradation (g/kg)									
0.02/h	817 ^a	804 ^a	755 ^b	701 ^c	6.99	0.01	0.01	0.01	0.01
0.05/h	691 ^a	665 ^a	597 ^b	534 ^c	7.20	0.01	0.01	0.01	0.01
0.08/h	612 ^a	581 ^a	512 ^b	445 ^c	7.52	0.01	0.01	0.01	0.01
قابلیت هضم برون تنی پروتئین خام (گرم/کیلوگرم)	664 ^d	710 ^{bc}	734 ^b	699 ^c	5.97	0.01	0.01	0.01	0.01
In vitro crude protein digestibility (g/kg)									

^{a, b, c, d} میانگین‌های هر ردیف با حروف مختلف از لحاظ آماری اختلاف معنی دار دارند.

۱- بخش سریع تجزیه، ۲- بخش کند تجزیه شونده، ۳- سرعت تجزیه پذیری، ۴- تجزیه پذیری موثر در سرعت عبور ۲، ۵ و ۸ درصد با استفاده از فرمول $ED=a+bc/(c+k)$ محاسبه شد. CM: کنجاله کانولا، SEM: اشتباه معیار میانگین

^{a, b, c, d} Means in the same row with different letters are different

1-a, the washout fraction; 2-b, the potentially degradable fraction; 3-c, the rate of degradation.

4-Effective rumen degradation was calculated according to the equation $ED=a+bc/(c+k)$, using rumen outflow rate (k) of 0.02, 0.05 and 0.08 h⁻¹

CM, Canola meal; SEM, standard error of mean

اسیدهای آمینه و در نهایت افزایش آب گریزی سطحی پروتئین‌ها می‌شود. با توجه به اینکه گروه‌های جانبی اسیدهای آمینه آب‌گریز گروه‌های فعال شیمیایی آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین هستند، سبب افزایش قابلیت هضم پروتئین شد (۲۴ و ۵۵).

اثرات عمل‌آوری با میکروویو بر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی

اثرات عمل‌آوری با میکروویو بر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی کنجاله منداب اصلاح شده در جدول ۳ گزارش شده است. عمل‌آوری کنجاله منداب اصلاح شده با میکروویو با روند خطی سبب کاهش بخش سریع تجزیه و افزایش بخش کند تجزیه پروتئین حقیقی شد ($P < 0.01$). نتایج مشابهی توسط شورنگ و همکاران (۴۶) گزارش شد. شورنگ و همکاران (۴۶) افزایش بخش B2 و کاهش بخش B1 پروتئین کنجاله سویا عمل‌آوری شده با میکروویو بدون افزایش در بخش C پروتئین گزارش کردند. بخش B1، B2 و C به ترتیب پروتئین قابل حل در بافر، پروتئین غیر قابل حل در شوینده خنثی و پروتئین غیر قابل حل در شوینده اسیدی بر اساس تقسیم بندی پروتئین در سیستم کربوهیدرات و پروتئین کرنل هستند. عمل‌آوری با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه به ترتیب سبب کاهش بخش سریع تجزیه پروتئین حقیقی به میزان ۱۷، ۲۹ و ۵۲ درصد نسبت به کنجاله عمل‌آوری نشده شد. عمل‌آوری با میکروویو تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین حقیقی در سرعت عبور ۵ و ۸ درصد نسبت به کنجاله عمل‌آوری نشده کاهش داد ($P < 0.01$). عمل‌آوری با میکروویو بیش از ۲ دقیقه سبب کاهش نرخ ثابت تجزیه پروتئین حقیقی شد ($P < 0.01$)؛ ولی تفاوت معنی‌داری بین عمل‌آوری با میکروویو به مدت ۴ و ۶ دقیقه مشاهده نشد. نرخ ثابت تجزیه پروتئین حقیقی کنجاله منداب پس از عمل‌آوری با میکروویو به مدت ۴ و ۶ دقیقه به ترتیب ۳۳ و ۳۷ درصد نسبت به کنجاله عمل‌آوری نشده کاهش یافت. همچنین یان و همکاران (۶۰) گزارش کردند که عمل‌آوری دانه جو با پرتو میکروویو نرخ ثابت تجزیه بخش کند تجزیه پروتئین خام را از ۸/۱۶ درصد به ۳/۵۳ درصد کاهش داد. بخش اعظم پروتئین کنجاله منداب آلومین و کروسیفرین است که حساسیت بالایی نسبت به حرارت دارد. حرارت سبب دناتوره شدن ساختار پروتئین و افزایش آب‌گریزی پروتئین به دلیل جدا شدن پیوندهای هیدروژنی و سایر پیوندهای ضعیف کووالانسی شده و با تغییر ساختار مولکولی پروتئین آب‌گریزی پروتئین، قابلیت دسترسی میکروارگانیزم‌های شکمبه‌ای را کاهش یافته و سبب کاهش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین حقیقی شده است (۲۱ و ۴۰).

یان و همکاران (۶۰) گزارش کردند که پرتوتابی دانه جو با میکروویو به مدت ۵ دقیقه، بخش سریع تجزیه پروتئین خام دانه جو را از ۴۵/۲۲ درصد به ۶/۳۶ درصد و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام را از ۵۵/۷۰ درصد به ۳۴/۰۸ درصد کاهش داد و میزان پروتئین عبوری به روده کوچک را از ۴۳/۳۱ درصد به ۶۵/۹۲ درصد افزایش داد.

کاهش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین به حرارت میکروویو نسبت داده می‌شود که سبب ژله‌ای شدن پروتئین می‌شود؛ ولی بنیک و همکاران (۶) پیشنهاد کردند که اثرات غیر حرارتی میکروویو سبب تغییرات در ساختمان پروتئین‌ها می‌شود. سازوکارهای محافظت پروتئین در برابر تجزیه شکمبه در کنجاله عمل‌آوری شده با حرارت پیچیده است (۸)؛ ولی احتمالاً واکنش‌های شیمیایی ایجاد شده در طی عمل‌آوری حرارتی شامل تشکیل مجموعه‌های بهم چسبیده پروتئینی (ژل) و ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئین‌ها سبب کاهش دسترسی آنزیم‌های پروتئولیتیک میکروبی و در نهایت کاهش سرعت و میزان تجزیه میکروبی پروتئین‌ها در شکمبه می‌شود (۵۲ و ۵۵).

عمل‌آوری با میکروویو سبب افزایش قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام کنجاله منداب به صورت روند خطی شد ($P < 0.01$) که با نتایج آزمایش‌های سایر محققین همخوانی دارد (۲۲، ۴۳، ۴۴ و ۴۶). قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ به ترتیب در حد ۷، ۹ و ۵ درصد نسبت به کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری نشده افزایش یافت. شورنگ و همکاران (۴۶) نیز گزارش کردند که عمل‌آوری کنجاله سویا با پرتوهای میکروویو، مادون قرمز، گاما و الکترون سبب افزایش قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین خام شد. همچنین، پایا و همکاران (۳۹) گزارش کردند که عمل‌آوری دانه گلرنگ با میکروویو به مدت ۳ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات سبب کاهش تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام و افزایش ناپدید شدن روده‌ای پروتئین خام دانه گلرنگ شد. نتایج مشابهی توسط جلیلیان و همکاران (۲۶) گزارش شد. جلیلیان و همکاران (۲۶) گزارش کردند که پرتوتابی کنجاله آفتاب‌گردان با میکروویو به مدت ۴ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات سبب افزایش قابلیت هضم روده‌ای پروتئین آن شد. بنابر گزارش واگنر و همکاران (۵۶) واسرشتی در طی عمل‌آوری با حرارت گروه‌های فعال شیمیایی را افزایش داده و سبب افزایش قابلیت هضم پروتئین می‌شود. عمل‌آوری با میکروویو به مدت ۶ دقیقه سبب کاهش قابلیت هضم پروتئین شد. نتایج مشابهی توسط صادقی و شورنگ (۴۴) با عمل‌آوری کنجاله پنبه دانه با میکروویو به مدت ۶ دقیقه با قدرت ۸۰۰ وات گزارش کردند. حرارت زیاد سبب تشکیل محصولات میلاردی مقاوم به هضم آنزیمی می‌شود (۵۴). همچنین، پرتوتابی سبب ایجاد پیوندهای عرضی، شکستن پیوندهای هیدروژنی و سایر پیوندهای ضعیف غیر کووالانسی، تغییر موقعیت

جدول ۳- اثر عمل‌آوری با میکروویو بر میانگین فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده

Table 3- Effects of microwave irradiation on rumen degradation parameters of true protein of CM

کنجاله کانولا عمل‌آوری نشده Untreated CM	کنجاله کانولا پرتوتایی شده Microwave irradiated CM			اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی داری P value	Untreated vs Irradiated	Orthogonal contrasts	
	2 min	4 min	6 min				Linear	Quadratic
پروتئین خام Crude protein								
بخش سریع تجزیه (گرم/کیلوگرم) $a(g/kg)^1$	249 ^a	207 ^{bc}	176 ^c	120 ^d	10.24	0.01	0.32	0.65
بخش کند تجزیه (گرم/کیلوگرم) $b(g/kg)^2$	723 ^d	766 ^{cd}	796 ^c	840 ^{ab}	10.48	0.01	0.02	0.98
پتانسیل تجزیه پذیری (گرم/کیلوگرم) $a+b(g/kg)$	971	973	972	960	9.06	0.83	0.18	0.55
سرعت تجزیه پذیری c/h^3	0.076 ^a	0.068 ^c	0.051 ^b	0.048 ^b	0.0040	0.01	0.03	0.56
تجزیه پذیری موثر (گرم/کیلوگرم) Effective rumen degradation (g/kg)								
0.02/h	820 ^a	797 ^a	746 ^b	711 ^b	6.99	0.01	0.42	0.49
0.05/h	685 ^a	648 ^b	578 ^c	530 ^d	7.20	0.01	0.08	0.64
0.08/h	603 ^a	560 ^b	487 ^c	435 ^d	7.52	0.01	0.04	0.67

^{a, b, c, d} میانگین‌های هر ردیف با حروف مختلف از لحاظ آماری اختلاف معنی دار دارند.

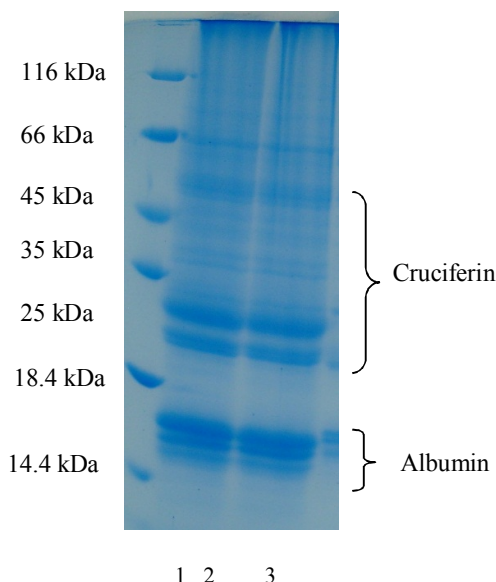
۱- بخش سریع تجزیه، ۲- بخش کند تجزیه شونده، ۳- سرعت تجزیه پذیری، ۴- تجزیه پذیری موثر در سرعت عبور ۲، ۵ و ۸ درصد با استفاده از فرمول $ED=a+bc/(c+k)$ محاسبه شد.

CM: کنجاله کانولا، SEM: اشتباه معیار میانگین

^{a, b, c, d} Means in the same row with different letters are different

1-*a*, the washout fraction; 2-*b*, the potentially degradable fraction; 3-*c*, the rate of degradation.

4-Effective rumen degradation was calculated according to the equation $ED=a+bc/(c+k)$, using rumen outflow rate (*k*) of 0.02, 0.05 and 0.08 h⁻¹ CM, Canola meal; SEM, standard error of mean



شکل ۱- الگو مارکر پروتئینی (۱) و زیرواحدهای پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده (۲ و ۳)

Figure 1- Molecular weights of standard protein (line 1) and canola meal protein subunits (lines 2 and 3)

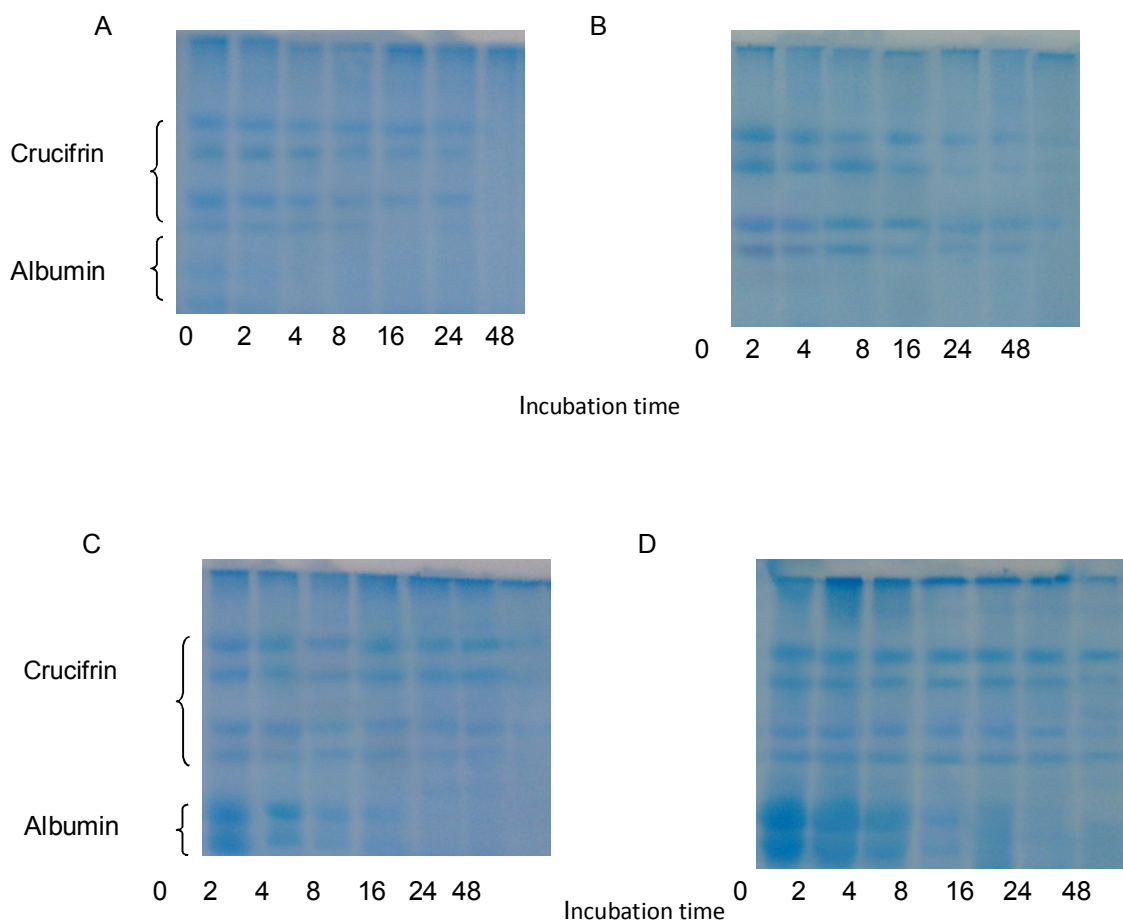
۸/۰ کیلو دالتون گزارش کردند.

اثرات میکروویو بر زیرواحدهای پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده

الگوی زیرواحدهای کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری نشده، عمل آوری با میکروویو به مدت ۲، ۴ و ۶ دقیقه در زمانهای مختلف آنکوباسیون در شکمبه (صفر، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت) در شکل ۲ آمده است.

الگوی زیرواحدهای پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده

الگوی زیرواحدهای پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده و مارکر پروتئینی در شکل ۱ نشان داده شده است. الکتروفورز پروتئین نشان داد که عمده پروتئین در کنجاله کانولا شامل آلبومین ۲S (ناپین) با دو زیرواحد به وزن مولکولی ۱۵/۹ و ۱۳/۴ کیلودالتون و کروسیفیرین (گلوبولین ۱۲S) با چهار زیرواحد به وزن مولکولی ۳۹/۲، ۳۰/۵، ۲۳/۴ و ۲۱/۲ کیلودالتون بود که نتایج به دست آمده توسط باتی و همکاران (۷) همخوانی دارد. این محققین برای زیرواحدهای کروسیفیرین وزن مولکولی ۳۲/۰، ۲۸/۲، ۲۱/۰ و ۱۸/۲ کیلودالتون و برای ناپین ۱۰/۳ و



شکل ۲- الکتروفورز ژل پلی آکریلامید کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری نشده (A)، کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری شده با میکروویو به مدت ۲ دقیقه (B)، کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری شده با میکروویو به مدت ۴ دقیقه (C) و کنجاله منداب اصلاح شده عمل آوری شده با میکروویو به مدت ۶ دقیقه

Figure 2- Electrophoretic patterns of untreated (A), 2 min microwave irradiated canola meal (B), 4 min microwave irradiated canola meal (C) and 6 min microwave irradiated canola meal (D).

پروتئین‌های منداب مطالعه کردند. این محققان گزارش کردند که فرایند حرارتی سبب تغییراتی در پروتئین ناپین و کروسیفیرین می‌شود که آب‌گریزی پروتئین ناپین و کروسیفیرین را به دنبال دارد. افزایش آب‌گریزی پروتئین به دلیل جدا شدن پیوندهای هیدروژنی و سایر پیوندهای ضعیف غیر کووالانسی است. در نتیجه، با تغییر در ساختمان پروتئین و موقعیت آمینواسیدها تجزیه‌پذیری پروتئین کروسیفیرین و ناپین کاهش یافت (۲۱).

نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پرتو میکروویو نه تنها تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده را به طور مؤثر کاهش داد؛ بلکه سبب افزایش قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین و کاهش مقدار ترکیبات ضدتغذیه‌ای آن شد. همچنین با افزایش مدت زمان عمل‌آوری با میکروویو بخش سریع تجزیه پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده کاهش و بخش کند تجزیه پروتئین آن افزایش یافت. عمل‌آوری با میکروویو تا ۴ دقیقه سبب افزایش قابلیت هضم برون‌تنی پروتئین کنجاله شد. بنابراین بر پایه یافته‌های این تحقیق، عمل‌آوری کنجاله منداب اصلاح شده با میکروویو به مدت ۴ دقیقه برای برای بهبود ارزش غذایی آن مفید بود. به هر حال لازم است تاثیر مصرف کنجاله عمل‌آوری شده با پرتو میکروویو بر عملکرد حیوان در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گیرد.

تجزیه الکتروفورز پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با میکروویو به مدت ۲ دقیقه در شکمبه (شکل ۲B) نشان داد که یک زیرواحد از کروسیفیرین پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شکمبه ناپدید شد؛ ولی زیرواحدهای دیگر کروسیفیرین تا ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه مقاوم بودند. زیرواحدهای ناپین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با میکروویو به مدت ۲ دقیقه در زمان صفر ناپدید شدند. تجزیه الکتروفورز پروتئین کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با میکروویو به مدت ۴ دقیقه در شکمبه (شکل ۲C) و کنجاله منداب اصلاح شده عمل‌آوری شده با میکروویو به مدت ۶ دقیقه در شکمبه (شکل ۲D) نشان دادند که زیرواحدهای کروسیفیرین تا ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه مقاوم به تجزیه بودند. همچنین، زیرواحدهای ناپین به ترتیب پس از ۴ و ۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه تجزیه شدند. عمل‌آوری کنجاله کانولا با میکروویو تجزیه‌پذیری آن را در شکمبه کاهش داد. تجزیه الکتروفورز پروتئین کنجاله عمل‌آوری شده با میکروویو در شکمبه نشان داد که عمل‌آوری با میکروویو سبب کاهش تجزیه‌پذیری کروسیفیرین و ناپین شد. صادقی و شورنگ (۴۳) گزارش کردند که کنجاله کانولا عمل‌آوری شده با میکروویو با قدرت ۸۰۰ وات به مدت ۴ و ۶ دقیقه مانع از تجزیه ناپین در زمان صفر انکوباسیون شد و به ترتیب پس از ۴ و ۶ ساعت انکوباسیون در شکمبه تجزیه شدند. فلاویو و آپنتن (۲۱) با استفاده از شدت انتشار آلینیونافالان ۸ اسید سولفونیک به عنوان کاوشگر فلورسنس آب‌گریز، اثر فرایند حرارتی بر ساختمان

منابع

- 1-Ahmadi, K., H. R., Ebadzadah, H., Abshah, A. Kazemian, and M. Rafie. 2018. Statistics of Agriculture Agricultural year, 2016-2018. Ministry of Agriculture, Deputy of Planning and Economics, Information and Communication Technology Center. (In Persian).
- 2-Ahlin, K. A., M., Emmanuelson, and H. Wiktorsson. 1994. Rapeseed products from double cultivars as feed for dairy cow: effects of long term feeding on thyroid function, fertility and animal health. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 35: 37-53.
- 3-Alajaji, S. A., and T. A. El-Adawy. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 806-812.
- 4-Al-Kaiesy, M. T., H. A. Abdul-Kader, M. H. Mohammad, and A. H. Saeed. 2003. Effect of gamma irradiation on antinutritional factors in broad bean. *Radiation. Physics and Chemistry*, 67: 493-496.
- 5-AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.
- 6-Banik S., S., Bandyopadhyay, and S. Ganguly. 2003. Bio-effects of microwave. *Bioresource Technology*. 87: 155 - 159.
- 7-Bhatty R. S., S. L., McKenzie and A.J. Finlayson. 1999. The proteins of rapeseed soluble in salt solutions. *Canadian Journal of Biochemistry*. 46: 1191-1197.
- 8-Bjarnason, J., and K. J. Carpenter. 1969. Mechanisms of heat damage in protein. I. Model with acetylated lysine units. *British Journal of Nutrition*. 23:858-868.
- 9-Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-255.
- 10-Calsamiglia, S., and M. D. Stern. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal of Animal Science*. 73: 1459-1465.

- 11-Chen, Q. C., and W. L. Betty. 2003. Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications. *Journal of Chromatography A*, 1018: 41-52.
- 12-Clifford, A., and D. V. Smith. 1987. Rapid method for determining total glucosinolates in rapeseed by enzymatically released glucose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38: 141-150.
- 13-Deacon, M.A., G., de Boer, and J. J. Kennelly, 1988. Influence of jet-sploding and extrusion on ruminal and intestinal disappearance of canola and soybeans. *Journal of Dairy Science*, 71: 745-753.
- 14-De Boland, A. R., G. B. Garner, and B. L. O Dell. 1975. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 23: 1186- 1189.
- 15-Ebrahimi Mahmoudabad, S. R., A., Nikkhah, and A. A. Sadeghi. 2016. Aninutritional factors and ruminal degradation of dry matter and crude protein of microwave and gamma irradiated native rapeseed. *Iranian Journal of Animal Science Research*. 8 (1): 72-85. (In Persian).
- 16-Ebrahimi, S. R., A., Nikkhah, and A. A.Sadeghi. 2010. Changes in nutritive value and digestion kinetics of canola seed due to microwave irradiation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 27: 347-354.
- 17-Fakhouri, M. O., and H. S. Ramaswamy. 1993. Temperature uniformity of microwave heated food as influenced byproduct type and composition. *Food Research International*, 26: 89-95.
- 18-Fathi Nasri, M. H., J., France, M. Danesh Mesgaran, and E. Kebreab. 2008. Effect of heat processing on ruminal degradability and intestinal disappearance of nitrogen and amino acids in Iranian whole soybean. *Livestock Science*, 113: 43 –51.
- 19-Fenwick G. R., E. A., Spinks A. P., Wilkinson, R. K., Heaney, and M. A. Legoy. 1986. Effect of processing on the antinutrient content of rapeseed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37: 735–741.
- 20-Finley, J. W. 1989. Effects of processing on proteins: an overview. In: *Protein Quality and the Effects of Processing* (Ed. R.D. Phillips and J.W. Finley) Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 1-7.
- 21-Folawiyo, Y. L., and R. K. O. Apenten. 1997. The effect of heat and acid treatment on the structure of rapeseed albumin (napin). *Food Chemistry*, 58: 237-243.
- 22-Ghanbari, F., T., Ghorchi, P., Shawrang, H., Mansouri, and N. Torbatinejad. 2014. Effect of irradiation on runinal disappearance of dry matter and crude protein and in vitro digestibility of canola meal. *Journal of Animal Science (pajouhesh an sazandegi)*, 26: 55-66. (In Persian).
- 23-Gharaghani, H., M., Zaghri, G., Shahhosseini, and H. Moravej. 2008. Effect of gamma irradiation on anti-nutritional factors and nutrition value of canola meal for broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 21: 1479-1485.
- 24-Huang, S., M., Liang, G., Lardy, H. E., Huff, M. S., Kerley, and F. Hsieh. 1995. Extrusion process of rapeseed meal for reducing glucosinolates. *Animal Feed Science and Technology*, 56: 1-9.
- 25-Khorasani, G. R., P. H., Robinson, and J. J. Kennelly. 1989. Effects of chemical treatment on *in vitro* and *in situ* degradation of canola meal crude protein. *Journal of Dairy Science*, 72, 2074-2080.
- 26-Jalilian, S., F., Fattahnia, P., Shawrang, and H. Mohammadzadah. 2015. Effect of different irradiation on runinal degradability and intestinal crude protein digestibility of sunflower meal. *Journal of Animal Science Research*, 25 (2). 69-80. (In Persian).
- 27-Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- 28-Maheshwari, P. N., D. W., Stanley, and F. R. Van der Van. 1980. Microwave treatment of dehulled rapeseed meal to inactivate myrosinase and its effect on oil meal quality. *Journal of American Oil Chemistry and Society*. 57: 194–199.
- 29-Mandiki, S. N. M., G., Derycke, J. L., Bister, N., Mabon, J. P., Wathelet, M., Marlier, and R. Paquay, 2002. Chemical changes and influence of rapeseed antinutritional factor on gestating and lactating ewes. Part 1. Animal performances and plasma hormones and glucose. *Animal Feed Science and Technology*, 98: 25–35.
- 30-McNeill, L., K., Bernard, and M. G. MacLeod. 2004. Food intake, growth rate, food conversion and food choice in broilers fed on diets high in rapeseed meal and pea meal with observations of the resulting poultry meat. *British Poultry Science*, 45: 519–523.
- 31-Michalet-Doreau, B., and M.Y. Ould-Bah. 1992. *In vitro* and *in sacco* methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 40: 57-86.
- 32-Moshtaghi Nia, S.A., and J. R. Ingalls. 1995. Influence of moist heat treatment on ruminal and intestinal disappearance of amino acids from canola meal. *Journal of Dairy Sci*. 78: 1552-1560.
- 33-Mubarak, A.E. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chemistry*. 89: 489-495.
- 34-Murray, R.K., D.K., Granner, P.A., Mayes, and V.W. Rodwell. 2003. *Harper's Biochemistry*, 26th Ed. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- 35-National Research Council, 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Ed. National Academy of Sciences, Washington, DC. Ananymous.
- 36-Oerlemans, K., D. M., Barrett, C.B., Suades, R. Verkerk, and M. Dekker. 2006. Thermal degradation of

- glucosinolates in red cabbage. Food Chemistry, 95: 19–29.
- 37-Oliveira, M. E. C., and A. S. Franca. 2002. Microwave heating of foodstuffs. Journal of Food Engineering, 53: 347-359.
- 38-Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation weighed according to rate of passage. Journal of Agriculture Science (Camb.), 92: 499-503.
- 39-Paya, H., A., Taghizadah, M., Janmohammadi, G. A., Moghaddam, and A. HosseinKhani. 2016. Effect of microwave irradiation on ruminal and intestinal disappearance of dry matter and crude protein of safflower seed by I situ and mobile nylon bag techniques. Journal of Animal Science Research, 26 (2): 121-130. (In Persian).
- 40-Peng Q., N.A., Khan, Z., Wanng, and D. Moist. 2014. Dry heating induced changes in protein molecular structure, protein sub fractions and nutrient profiles in camelina seed. Journal of Dairy Science, 97: 446-457.
- 41-PHOTO-CAPT. 1999. V. 99. B.P. 66 TORCY. <http://www.vilber.com>
- 42-Piradl, A., R. Mirmohammadi, and H. Khalilvandi Behroozyar. 2017. Investigation of chemical changes, ruminal degradation and ruminal digestion of starch and crude protein of different variety of microwave irradiated barley grains. Journal of Ruminants Research, 5 (4): 119-144. (In Persian).
- 43-Sadeghi, A.A. and P. Shawrang, 2006. Effects of microwave irradiation on ruminal degradability and *in vitro* digestibility of canola meal. Animal Feed Science and Technology. 127: 45-54.
- 44-Sadeghi, A.A. and P. Shawrang. 2007. Effects of microwave irradiation on ruminal protein degradation and intestinal digestibility of cottonseed meal. Livestock Science. 106: 176–181.
- 45- SAS. 1996. Statistical Analysis System. SAS Intit. Inc., Cary, NC, USA.
- 46-Shawrang, P., S., Jalilian, F., Fattahnia, A. A., Sadeghi, and A.A. Mehrabi. 2017. Effect of irradiation from gamma, electron beam, microwave and infrared sources on ruminal degradability and *in vitro* digestibility of soybean meal. Journal of Animal Science Research, 27 (4). 217-230. (In Persian).
- 47-Sheikhalipoor, A., A., Hosseeinkhani, A., Taghizadah, and H. Mohammadzadah. 2018. Effect of different heat processing methods on nutritive value of common vetch seed in ruminants. Iranian Journal of Animal Science, 49: 427-436. (In Persian)
- 48-Siddhuraju, P., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. The effect of ionising radiation on anti-nutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food. Food Chemistry, 78: 187-205.
- 49-Standford, K., G. L., Wallins, W. G., Smart, and A.A. Mc Allister. 2000. Effect of feeding canola screenings on apparent digestibility, growth performance and carcass characteristics of feedlot lambs. Canadian Journal of Animal Science, 80: 355-365.
- 50-Stefanello, C., S. L., Vieira, G. O., Santiago, L., Kindlein, J. B. O., Sorbara, and A. J. Cowieson. 2015. Starch digestibility, energy utilization, and growth performance of broilers fed corn-soybean basal diets supplemented with enzymes. Poultry Science, 94: 2472-2479.
- 51-Tamminga, S., W. M., Van Straalen, A. P. J., Subnel, R. G. M., Meijer, A., Steg, C.J.G., Wever, and M. C. Blok. 1994. The Dutch protein evaluation system: the DVE/OEB-system. Livestock Production Science, 40: 139–155.
- 52-Utsumi, S., and J. E. Kinsella. 1985. Structure function relationship in food proteins: Subunit interactions in heat induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 33: 297–303.
- 53-Vallejo, F., F. A., Tomas-Barbern, and C. Garcia-Viguera. 2002. Glucosinolate and vitamin C contents in edible parts of broccoli florets after domestic cooking. European Food Research and Technology. 215: 310-316.
- 54-Van Soest, P. 1989. A reanalysis the digestibility of bound N in distillers grains. Proc. Cornell Nutr. Conf. Syracuse, NY. 127-136.
- 55-Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. 2nd Edition. Cornell University Press. NY. USA.
- 56-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.
- 57-Wagner, J. R., D. A., Sorgentini, and M. C. Anon. 2000. Relation between solubility and surface aromatic hydrophobicity as an indicator of modification during preparation processes of commercial and laboratory prepared soy protein isolates. Journal of Agriculture Food Chemistry, 48: 3159–3165.
- 58-Waldern, D. E. 1973. Rapeseed meal versus soybean meal as the only protein supplement for lactating cows fed corn silage roughage. Canadian Journal of Animal Science. 53: 107-112.
- 59-Wright, C.F., M. A. G., Von Keyserlingk, M. L., Swift, L. J., Fisher, J. A., Shelford, and N. E. Dinn. 2005. Heat and Lignosulfonate treated canola meal as a source of ruminal undegradable protein for lactating dairy cows. Journal of Dairy Science. 88: 238-243.
- 60-Yan, X., N. A., Khan, F., Zhang, L., Yang, and P. Yu. 2014. Microwave irradiation induced changes in protein molecular structures of barley grains: relationship to changes in protein chemical profile, protein subfractions, and digestion in dairy cows. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 62 (28): 6546-6555.
- 61-Zeb, A. 1998. Possibilities and limitations of feeding rapeseed meal to broiler chicks. Ph.D thesis., Georg-August University Gottingen, Germany.



Chemical Composition and Ruminal Dry Matter and Protein Degradation Parameters of Canola Meal Treated by Microwave Irradiation

Sayyed Roohollah Ebrahimi-Mahmoudabad^{1*}, Ali Nikkhah², Ali Asghar Sadeghi³

Submitted: 13-12-2018

Accepted: 10-11-2019

Introduction: In growing ruminants or early lactation dairy cows, production may be limited by a dietary metabolizable protein. In these conditions microbial protein synthesis is not sufficient to meet the animal's protein requirement. Canola meal (CM), which is an available and good source of protein in ruminant nutrition, especially in Iran. However the protein of CM is highly degradable by rumen microorganisms and on the other hand, anti-nutritional factors, such as phytic acid and glucosinolate in brassica-originated feed, are of concern relative to animal-originated feeds. Glucosinolates are a large group of sulphur-containing secondary plant metabolites and are known to reduce feed intake, induce iodine deficiency and depress fertility in ruminants. Several heat processing methods have been used to enhance nutritive value of oilseed meals, including extrusion, roasting, toasting and Jet-Sploding. Recently, treatment of oilseed meals with microwave irradiation was successful in reducing ruminal degradable protein, anti-nutritional factors and increasing digestible undegradable protein of them. Microwave irradiation is heating faster, processing in less time and higher energy efficiency compared to conventional methods. This research was carried out to evaluate the effects of microwave irradiation (800 W) for 2, 4 and 6 min on dry matter (DM), crude protein (CP) and true protein (TP) ruminal degradability, *in vitro* CP digestibility, antinutritional factors (glucosinolate and phytic acid), and chemical composition of CM.

Materials and Methods: The DM of CM was determined and then, sufficient water was added to sample to increase the moisture content of CM to 250 g/kg. Three samples (500 g each) were subjected to microwave irradiation at a power of 800 W for 2, 4 and 6 min. The samples were ground to pass a 2 mm screen for the ruminal *in situ* study. Degradation kinetics of DM, CP and TP were determined according to *in situ* procedure. Six grams of untreated or irradiated feed samples were incubated in the rumen of three ruminally fistulated Taleshi bulls for periods of 0, 2, 4, 8, 16, 24 and 48 h. The bulls were fed with a total mixed ration containing 700 g/kg of DM forage (700 g/kg alfalfa hay and 300 g/kg wheat straw on DM basis) and 300 g/kg of DM concentrate. The concentrate consisted of ground barley grain, canola meal, ground canola seed, cotton-seed meal, wheat bran, dicalcium phosphate and a vitamin+mineral premix (530, 130, 160, 40, 120, 10 and 10 g/kg DM, respectively). TP of samples were determined by Bradford's procedure. Digestibility of rumen undegraded CP was estimated using the three-step *in vitro* procedure. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to monitor protein subfractions and the fate of true proteins of untreated and irradiated feed samples in the rumen.

Results and Discussion: Microwave irradiation had no effect on improving chemical composition of CM but decreased the total glucosinolate and phytic acid of CM linearly and quadratically. Microwave irradiation for 2, 4 and 6 min decreased the phytic acid content of CM by 13, 30 and 51% respectively, compared to untreated CM. The total glucosinolate contents of CM microwave irradiated for 2, 4 and 6 min decreased by 38.4, 56.0 and 67.1% respectively, compared to untreated samples. Microwave irradiation decreased the washout fraction, degradation rate and effective degradability (ED) of DM, CP and TP and increased potentially degradable fraction of DM, CP and TP of CM. The washout fraction of CP decreased by 15.7 and 39.8% in samples irradiated for 2, 4 and 6 min, respectively. Irradiation for 2, 4 and 6 min decreased ED of CP at a ruminal outflow rate of 0.05 h⁻¹ by 13.6 and 22.7%, respectively. *In vitro* CP

1- Associate prof, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 And 3-Professor and associate Prof, respectively, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(*- Corresponding Author Email: ebrahimiyazd@yahoo.com)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.77304

digestibility of CM increased by treating with microwave irradiation up to 4 min. CP digestibility of 2 and 4 min irradiated CM was increased by 6.9 and 10.5%, respectively. Electrophoresis results also indicated that major proteins of CM was Cruciferin (globulin 12S) and Napin (Albumin 2S). Electrophoresis results indicated that in untreated CM, four subunits of Cruciferin and in microwave irradiated CM, four subunits of cruciferin and two subunits of Napin consisted of by-pass proteins.

Conclusion: In this study, microwave irradiation, reduced ruminal degradability of CP and TP, increased *in vitro* CP digestibility and reduced anti-nutritional factors of CM. Subsequently, *in vivo* studies are required to investigate effect of feeding irradiated feedstuff on lactation performance of dairy cows.

Keywords: Anti-nutritional factors, Canola Meal, Degradability, Irradiation.



مقاله علمی - پژوهشی

اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی بر عملکرد، رشد اسکلتی، فعالیت تغذیه، فراسنجه- های خونی و ایمنی در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

مهدی جمالی^۱ - فرزاد میرزایی آقچه قشلاق^{۲*} - جمال سیف دواتی^۳ - بهمن نویدشاد^۴ - رضا سید شریفی^۳ - رقیه ولی‌زاده

یونجالی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵

چکیده

به منظور تعیین اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی عملکرد، رشد اسکلتی، فعالیت تغذیه، فراسنجه‌های خونی و ایمنی گوساله‌های شیرخوار، آزمایشی با استفاده از ۳۶ راس گوساله شیرخوار با میانگین وزنی 36 ± 2 کیلوگرم در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۴ تکرار، به مدت ۷۵ روز انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه بدون افزودنی (شاهد)، ۲- جیره پایه به اضافه ۲ گرم پروبیوتیک در روز برای هر راس، ۳- جیره پایه به اضافه ۳ گرم پروبیوتیک در روز برای هر راس، ۴- جیره پایه به اضافه ۳ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس، ۵- جیره پایه به اضافه ۴/۵ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس، ۶- جیره پایه به اضافه ۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس، ۷- جیره پایه به اضافه ۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس، ۸- جیره پایه به اضافه ۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس و ۹- جیره پایه به اضافه ۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسیدآلی در روز برای هر راس بودند. نتایج نشان داد که جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر میانگین افزایش وزن روزانه و وزن نهایی، و پارامترهای سلامتی داشته و باعث بهبود وضعیت سیستم ایمنی و وضعیت سلامتی گوساله‌ها شدند. همچنین این مطالعه نشان داد که اضافه کردن پروبیوتیک، اسیدآلی و ترکیب این مواد افزودنی به شیر تأثیری بر رشد اسکلتی و رفتار تغذیه گوساله‌های هلشتاین نداشت.

واژه‌های کلیدی: اسید آلی، پروبیوتیک، تغذیه، گوساله، هلشتاین.

مقدمه

استفاده قرار گرفته‌اند، اما با افزایش نگرانی عمومی از ایجاد مقاومت و حضور در محصولات، استفاده از این ترکیبات به عنوان محرک رشد به وسیله اتحادیه اروپا ممنوع شد (۶۳). در سال‌های اخیر محققین توجه خود را به یافتن مکمل‌هایی متمرکز نموده‌اند که علاوه بر حفظ ویژگی‌های مطلوب فاقد تبعات سوء بهداشتی و زیست محیطی باشند. از آن جمله می‌توان از پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی با خصوصیات و تأثیرات ویژه‌ای نام برد، که با توجه به سوابق تاریخی و با الهام از شرایط طبیعی میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش و تعادل موجود در طبیعت تهیه شده‌اند (۲)، این مواد به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده‌ای در تغذیه دام و طیور مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۸).

اسیدهای آلی ترکیباتی آلی هستند که دارای خاصیت اسیدی می‌باشد. مصرف اسیدهای آلی در جیره‌های غذایی نیز در کنترل باکتری‌ها (باکتری‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا) و در پیشگیری از تغییرات pH شکمبه مؤثر است (۶۷). اسیدهای آلی، مانند بوتیریک و اسید پروپیونیک، محرک اصلی رشد شکمبه در نظر گرفته می‌شوند (۲۰). اسیدهای آلی و نمک‌های آن‌ها به عنوان افزودنی‌هایی عموماً

با توجه به این که پرورش گوساله از مهم‌ترین و حساس‌ترین برنامه‌های مدیریتی در مزارع پرورش گاو بوده و گوساله‌ها در سال‌های آینده عامل اصلی سوددهی مزارع می‌باشند، لذا به کار بردن راهکارهای تغذیه‌ای صحیح برای رشد و سلامت بهتر آن‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است (۶۶). به همین دلیل آنتی‌بیوتیک‌ها از مدت‌ها قبل در بسیاری از کشورها به دلیل داشتن اثر مهارکنندگی بر باکتری‌های مضر دستگاه گوارش به عنوان افزایش دهنده رشد دام‌ها مورد

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران.

۴- فارغ التحصیل دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران.

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: Email: f_mirzaei@uma.ac.ir
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.79924

بی‌خطر در تغذیه دام شناخته شده و اثرات محرک رشد آن‌ها به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها پذیرفته شده است (۴۹). پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که باعث ایجاد تعادل در جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می‌شوند (۲۵). پروبیوتیک‌ها از طریق ایجاد تعادل میکروبی باعث ایجاد تأثیرات مثبتی مانند کاهش عفونت‌های روده‌ای، بهبود عملکرد و افزایش میزان جذب مواد مغذی از جمله ایمونوگلوبولین‌ها می‌شوند (۲۸). همچنین پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش غلظت گلوبولین‌ها، تعداد و فعالیت کشتندگی نوتروفیل‌ها از یک سو و از سوی دیگر با کاهش میکروفلور مضر دستگاه گوارش از قبیل کلی‌فرم‌ها باعث تقویت سیستم دفاعی بدن و جلوگیری از ابتلای گوساله‌ها به بیماری‌های مختلف متابولیکی و عفونی می‌گردد (۱۶). از این طریق می‌توانند جایگزین مناسب و مؤثری برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند (۶۰). علیرغم اثرات شناخته شده پروبیوتیک و اسیدآلی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در گوساله‌ها تا به امروز تحقیقات محدودی در ارتباط با بررسی اثرات متقابل ناشی از مصرف توام این ترکیبات افزودنی در گوساله‌های شیرخوار انجام گرفته است لذا، این تحقیق با هدف بررسی اثر تغذیه انفرادی یا توام پروبیوتیک و مخلوط اسیدهای آلی بر عملکرد، رشد اسکلتی، فعالیت تغذیه، متابولیت‌های خونی، پاسخ ایمنی، وضعیت سلامتی و قوام مدفوع به عنوان یک آنتی‌بیوتیک محرک رشد در گوساله‌های سنین پایین انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان واقع در شهرستان پارس‌آباد، استان اردبیل انجام شد. انجام این آزمایش از اوایل اسفند ماه ۱۳۹۵ تا اواسط اردیبهشت ماه ۱۳۹۶ به طول انجامید. این آزمایش با استفاده از ۳۶ رأس گوساله شیرخوار ماده نژاد هلشتاین با میانگین وزنی 36 ± 2 kg در قالب ۹ تیمار در ۴ تکرار به مدت ۷۵ روز انجام شد. گوساله‌ها در طول زمان شیرخوارگی روزانه با دو وعده شیر به میزان $2/5$ kg تغذیه شدند، این عمل در ساعات ۸ صبح و ۴ بعد از ظهر انجام شد. بلافاصله بعد از شیر دادن، آب آشامیدنی و کنسانتره به مقدار آزاد در اختیار گوساله‌ها قرار می‌گرفت. هر کدام از گوساله‌های آزمایشی موجود در گروه‌های ۹ گانه، در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و هر جایگاه مجهز به سطل خوراک و آب‌خور مجزا بود. برای اطمینان از دریافت تمامی مقدار در نظر گرفته شده توسط گوساله‌ها، افزودنی پروبیوتیک و اسیدآلی به شیر (وعده صبح) گوساله‌ها اضافه شد. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار ۱- جیره شاهد بدون افزودنی (جیره پایه)، تیمار ۲- جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (2 g) در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار ۳- جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (3 g) در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار

۴- جیره پایه حاوی اسیدآلی (3 g) در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار ۵- جیره پایه حاوی اسیدآلی ($4/5$ g) در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار ۶- جیره پایه حاوی (2 g) پروبیوتیک و 3 g اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار ۷- جیره پایه حاوی (2 g) پروبیوتیک و $4/5$ g اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله، تیمار ۸- جیره پایه حاوی (3 g) پروبیوتیک و 3 g اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله و تیمار ۹- جیره پایه حاوی (3 g) پروبیوتیک و $4/5$ g اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله. در این پژوهش از پروبیوتیک با نام تجاری پروبیوآنزیم (Enzyme Probio) تولید کشور آلمان استفاده شد. همچنین مکمل اسید آلی مورد استفاده در این آزمایش با نام تجاری اسیدیفایر تولید شده توسط شرکت Framelco و دارای ترکیبات منو، دی و تری‌گلیسریدهای اسید بوتیریک و اسید پروپیونیک، گلیسرین و افزودنی‌های مجاز E551b است. مواد خوراکی و اجزاء تشکیل دهنده جیره‌های آزمایشی و ترکیب شیمیایی آن‌ها در جدول ۱ گزارش شده است.

با توجه به تغذیه گوساله‌ها بصورت انفرادی در طول دوره آزمایشی، میزان خوراک مصرفی به صورت روزانه محاسبه شد. بدین منظور مقدار خوراک ریخته شده در سطل هر گوساله بطور روزانه ثبت شده و باقیمانده خوراک هر روز، صبح روز بعد جمع‌آوری و توزین می‌شد و سپس خوراک تازه در سطل غذا ریخته می‌شد. وزن بدن با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 200 گرم و رشد اسکلتی گوساله‌ها (طول بدن، ارتفاع بدن از جدوگاه و کپل، محیط شکم و دور قفسه سینه) با استفاده از متر استاندارد در گوساله‌های آزمایشی هر ۱۵ روز یکبار در بدو تولد و روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ اندازه‌گیری گردید. ضریب تبدیل غذایی با تقسیم خوراک مصرفی هر گوساله در هر دوره بر میزان افزایش وزن بدن بدست آمد (فرمول ۱). برای اندازه‌گیری میزان فعالیت تغذیه در گوساله‌ها در انتهای دوره‌ی آزمایش گوساله‌ها به مدت ۲۴ ساعت زیر نظر گرفته شد و کلیه‌ی فعالیت‌های نشخوارکردن به صورت خوابیده و نشسته و همچنین استراحت و مصرف خوراک هر ده دقیقه یکبار ثبت گردید.

فرمول (۱) افزایش وزن / خوراک مصرفی (kg) = ضریب تبدیل غذایی

نمونه‌گیری از خون و تعیین فراسنجه‌های خونی: در روزهای ۴۵ و ۷۵ آزمایش ۴ ساعت بعد از تغذیه وعده صبح، از تمام گوساله‌ها از رگ گردن خون‌گیری شد. در آزمایشگاه نمونه‌های خون سانتریفیوژ شد (3000 دور، به مدت ۱۵ دقیقه) و سرم حاصل از آن‌ها جدا گردید و جهت آنالیزهای بعدی در فریزر و دمای -20 - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری غلظت‌های گلوکز، کلسترول، تری-گلیسرید، آلبومین و پروتئین کل با استفاده از کیت تجاری (پارس آزمون، ایران) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CS-400) انجام گرفت.

های با تکرار در فواصل زمانی آنالیز به صورت Repeated measurement رویه MIXED و داده‌های بدون تکرار با رویه GLM آنالیز گردید. برای آنالیز داده‌های سلامت گوساله‌ها، با توجه به اینکه داده‌های حاصل به صورت داده‌های دسته‌بندی شده بودند با استفاده از رویه Logistic در نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. همچنین با توجه به معنی‌داری وزن اولیه گوساله‌ها برای صفت وزن نهایی کوواریت شدند اما سن ورود به طرح گوساله‌ها معنی‌دار نبود لذا از مدل حذف شد.

مدل آماری به صورت $Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + T_i \times P_j + e_{ijk}$ بود، که در آن Y_{ijk} مقادیر مشاهده تیمار i ام در تکرار j ام، μ میانگین، T_i اثر تیمار i ام، P_j اثر دوره زمانی، $T_i \times P_j$ اثر متقابل تیمار و دوره و e_{ijk} اثر خطای آزمایش بود.

بررسی پاسخ ایمنی: نمونه‌ی خونی طی دو مرحله در روزهای ۴۵ و ۷۵ از رگ گردن و به وسیله‌ی سرنگ گرفته و درون لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقادی EDTA ریخته شد و نمونه‌ها بلافاصله جهت تعیین شمارش سلولی (لنفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت) به آزمایشگاه هماتولوژی (آزمایشگاه آرین- استان اردبیل) انتقال داده شد.

بررسی سلامت گوساله‌ها: وضعیت قرار گرفتن گوش‌ها، ترشحات چشم، ترشحات بینی و قوام مدفوع روزانه و بر اساس روش ارائه شده چهار نمره‌ای دانشگاه ویسکانسین بررسی گردید. به طوری که به بهترین وضعیت سلامت امتیاز صفر و به بدترین وضعیت سلامت امتیاز ۳ داده شد.

تجربه و تحلیل آماری: نتایج آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ آنالیز شدند. برای داده

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی کنسانتره مصرفی در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین
Table 1- Ingredient and Chemical composition of concentrate of neonatal Holstein calves

افلام خوراکی ingredients	%	ترکیب شیمیایی Chemical composition	%
ذرت Corn	42.5	ماده خشک Dry matter	89.7
جو Barely	12	پروتئین CP	18.7
سپوس گندم Wheat bran	5	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی NDF	7.31
کنجاله سویا Soybean meal	37.6	الیاف نامحلول در شوینده خنثی ADF	16.25
نمک salt	0.4	عصاره اتری EE	2.26
پودر صدف Limestone	1	کلسیم Ca	0.62
مکمل مواد معدنی ^۱ Mineral sup. ^۱	0.5	فسفر P	0.5
مکمل ویتامینه ^۱ Vitamin sup. ^۱	0.5	-	-
جوش شیرین Sodium bicarbonate	0.5	-	-

ترکیب مکمل ویتامینی و معدنی: ۵۰۰۰۰ واحد بین المللی در kg ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی در kg ویتامین D3، ۱۰۰ واحد بین المللی در kg ویتامین E، ۴۰۰ میلی گرم در kg آنتی‌اکسیدانت، ۱۹۵۰۰۰ mg/kg کلسیم؛ ۹۰۰۰۰ mg/kg فسفر، ۵۵۰۰۰ mg/kg سدیم، ۹۰۰۰۰ mg/kg منیزیم، ۳۰۰ mg/kg آهن، ۳۰۰۰ mg/kg روی، ۲۰۰۰ mg/kg منگنز، ۲۸۰ mg/kg مس، ۱۰۰ mg/kg کبالت و ۱ mg/kg سلنیوم.

The combination of vitamin and mineral supplements: 500000 IU per kg of vitamin A, 100000 IU per kg of vitamin D3, 100 IU per kg of vitamin E, 400 mg per kg of antioxidants, 195000 mg per kg of Calcium, 90000 mg per kg of phosphorus, 55000 mg per kg of sodium, 90000 mg per kg of magnesium, 300 mg per kg iron, 3000 mg per kg zinc, 2000 mg per kg of manganese, 280 mg per kg copper, 100 mg per kg cobalt and 1 mg per kg selenium.

نتایج و بحث

گرم پروبیوتیک + ۳ گرم اسیدآلی (تیمار ۶) باعث افزایش معنی‌دار میانگین مصرف جیره گردید. (جدول ۲). همچنین در کل دوره آزمایشی، گوساله‌های مصرف کننده ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) و ۲ گرم پروبیوتیک + ۳ گرم اسیدآلی (تیمار ۶) بیشترین خوراک مصرفی را داشتند. موافق با نتایج این پژوهش، نجات و همکاران (۴۵) گزارش کردند افزودن پروبیوتیک به جیره گوساله تأثیری بر مصرف خوراک

عملکرد گوساله: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اضافه کردن سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی تأثیر معنی‌داری بر میانگین مصرف خوراک روزانه در ماه اول نداشت، تفاوت‌ها در ماه دوم معنی‌دار بود ولی آنالیز تیمارها و دوره‌ها این معنی‌داری را نشان نداد. تغذیه گوساله‌ها از جیره مکمل شده با ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) و ۲

پیدا کرده است (۸). نتایج این پژوهش نشان داد که اضافه کردن سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی تاثیر معنی داری بر وزن نهایی گوساله‌ها داشت ($p < 0.05$). تفاوت چشمگیری در وزن نهایی گوساله‌های گروه ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) نسبت به گروه شاهد دیده شد. با این وجود، گزارش شده اثر مصرف پروبیوتیک‌ها در افزایش وزن دائمی نبوده و با سازش گوساله‌ها به عوامل تنش‌زا از جمله انتقال، شرایط جدید، تغییر جیره و آلودگی‌ها، اثر آن‌ها کاهش می‌یابد (۶۵).

نتایج مربوط به ضریب تبدیل غذایی در جدول ۲ گزارش شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی ضریب تبدیل غذایی را تحت تاثیر قرار نداد. حسین آبادی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک به جیره‌های آزمایشی گوساله‌های شیرخوار تاثیری بر ضریب تبدیل غذایی خوراک نداشت. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده از پروبیوتیک باکتریایی در خوراک آغازین گوساله‌ها تاثیر معنی داری بر ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه شاهد نداشت (۵۲). اما محمدی و همکاران (۴۰) بهبود در ضریب تبدیل غذایی با اضافه کردن پروبیوتیک به جیره آزمایشی گوساله‌ها را گزارش کردند. اختلاف نتایج پژوهش‌های انجام شده ممکن است مربوط به ظرفیت بافری متفاوت جیره‌های آزمایشی و یا ترکیب و نوع و سطح پروبیوتیک و اسیدهای آلی به کار رفته در آزمایش‌ها نیز باشد. با توجه به اینکه بیشتر مواد افزودنی که به عنوان محرک رشد و جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها معرفی و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، تأثیر خود را بر عملکرد و ضریب تبدیل به واسطه فعالیت ضد میکروبی و تأثیر بر فلور میکروبی دستگاه گوارش اعمال می‌کنند، از این رو، شرایط پرورش و میزان آلودگی و درگیری حیوانات با باکتری‌های بیماری‌زا در محیط آزمایش، می‌تواند در نتیجه آزمایشات با این مواد افزودنی مؤثر باشد. به علت اینکه هر یک از این مواد افزودنی دارای ترکیبات و سطح مؤثر گوناگون می‌باشند، میزان دز مصرفی و ترکیبات مورد استفاده در آزمایش نیز می‌تواند در نتایج مختلف به دست آمده در استفاده از این مواد محرک رشد، مؤثر باشد (۳۴). تاثیر اسید آلی در مورد ضریب تبدیل خوراک با گزارش‌های محققین عشایری‌زاده و همکاران (۵) که گزارش کردند استفاده از سطوح مختلف فورمایسین (ترکیب حاوی اسید پروبیوتیک) اثر معنی داری بر ضریب تبدیل خوراک مورد مقایسه با گروه شاهد ندارد، مطابقت می‌کند. برخلاف نتایج این پژوهش، رضاییان (۵۴) بهبود ضریب تبدیل خوراک را با مصرف مخمرهای پروبیوتیکی گزارش کرد. ولی در برخی از پژوهش‌ها هیچ گونه سود و مزیتی با افزودن پروبیوتیک گزارش نشد (۴۱ و ۵۵).

در ماه اول نداشته ولی در ۶۰ روزگی و کل دوره تاثیر معنی داری بر مصرف خوراک داشته است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر نیز این گونه استنباط می‌شود که پروبیوتیک‌ها در دوره‌های ابتدایی پرورش اثر چندان زیادی بر مقدار مصرف خوراک ندارند، اما با افزایش سن، ممکن است ترکیبات پروبیوتیکی از طریق اثراتی که بر جمعیت‌های میکروبی و فرایندهای هضمی می‌گذارند، مصرف خوراک را افزایش دهند. از سوی دیگر، ممکن است ترکیبات پروبیوتیک با بهبود هضم و جذب مواد مغذی موجب تأمین نیازهای غذایی شوند. به طور کلی پروبیوتیک‌ها از طریق اثراتی که بر روندهای هضم و جذب مواد مغذی دارند، موجب افزایش مصرف خوراک می‌شوند (۱۰). افزایش میزان خوراک مصرفی در اثر تیمار ۶ که حاوی پروبیوتیک و اسیدآلی است می‌تواند علاوه بر نقش پروبیوتیک به علت وجود اسید پروبیوتیک در ترکیب اسید آلی مورد استفاده باشد، چرا که در مطالعات قبلی نشان داده شده است که اسید پروبیوتیک بر میزان اشتها و خوشخوراکی جیره تاثیر مثبت دارد. پترسون و همکاران (۵۰) گزارش کردند که اسیدیفایرها روی مصرف خوراک تاثیر مثبت دارند. اسیدهای آلی با شیوه‌های متفاوتی چون تغییر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش (۷)، تغییر بافت سلولی روده، کاهش pH روده (۱۷) و در نتیجه افزایش هضم و جذب مواد مغذی (۵۳)، می‌توانند بر عملکرد مؤثر باشند.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشاهده شد که میانگین افزایش وزن روزانه در ماه اول، دوم و کل دوره تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت اما اثر کلی تیمارها در دوره‌های زمانی معنی دار نبود. بیشترین میانگین افزایش وزن روزانه در هر سه دوره مربوط به تیمار ۲ است. به طور کلی افزایش وزن روزانه تابعی از میزان مصرف خوراک و قابلیت هضم مواد مغذی می‌باشد (۱). به دلیل اینکه میزان مصرف خوراک در تیمار ۲ بیشترین مقدار را نسبت به گروه شاهد دارا بود در نتیجه سطح ۲ گرم پروبیوتیک باعث افزایش میانگین وزن روزانه بیشتری نسبت به تیمارهای دیگر شد. مطابق با نتایج این آزمایش گزارش کرده‌اند گوساله‌های دریافت کننده مکمل پروبیوتیک (ساکارومایسیه) افزایش وزن روزانه بیشتری نسبت به گوساله‌های گروه شاهد نشان داد (۴۸ و ۶۴). پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش با محدود کردن رشد باکتری‌های مضر، امکان هضم و جذب ترکیبات مغذی خوراک مصرفی را فراهم می‌کنند. همچنین با کاهش وقوع اسهال، زمینه خروج غذا به صورت هضم نشده را پایین می‌آورند (۳۲). لذا استفاده از پروبیوتیک در تغذیه گوساله‌ها می‌تواند منجر به افزایش وزن بیشتر آن‌ها شود. افزایش وزن روزانه بیشتر در استفاده همزمان از پروبیوتیک و اسیدآلی هم می‌تواند ناشی از اثر هم‌افزایی این دو ماده آزمایشی باشد که مکمل اسیدهای آلی با بهبود وضعیت دستگاه گوارش از نظر ترکیب جمعیت میکروبی و تغییر بافت روده، موجب افزایش هضم و جذب شده و در نتیجه کارایی مصرف خوراک افزایش

جدول ۲- اثر جیره‌های آزمایشی بر عملکرد گوساله‌های هلشتاین
Table 2- The effect of dietary treatments on performance of neonatal Holstein calves

Table 2 The effect of dietary treatments on performance of neonatal Holstein calves													
	اثر جیره‌های آزمایشی dietary treatments									SEM	P value		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9		T	P	T×P
	میانگین مصرف خوراک در روز گرم Average daily feed intake (gr)												
ماه اول First month	369.2	449.7	378.5	418.6	417.6	427.9	448.4	410.02	332.8				
ماه دوم Second month	1459.5	1739.7	1475.1	1445.2	1578.1	16770.2	1385.1	1517.4	1464.1	113.8	0.37	0.0001	0.2
کل دوره Whole period	939.4	1161.7	1026.6	931.8	1091.4	1106.5	993.4	1013.8	991.9				
میانگین وزن (کیلوگرم) Average weight (kg)													
وزن اولیه Primay weight	35.25 ^e	35 ^f	35.5 ^d	36 ^b	35.75 ^c	36 ^b	35.5 ^d	35.25 ^e	36.25 ^a	0	–		
وزن نهایی Final weight	89.62 ^c	95.75 ^a	89.50 ^c	93 ^b	91.5 ^{ab}	94.25 ^b	91 ^{abc}	92.25 ^{ab}	93.25 ^{ab}	1.29	0.0001		
میانگین افزایش وزن روزانه (کیلوگرم) Average daily weight gain (kg)													
ماه اول First month	0.59 ^c	0.77 ^a	0.68 ^b	0.72 ^{ab}	0.68 ^b	0.76 ^a	0.70 ^b	0.74 ^{ab}	0.75 ^a				
ماه دوم Second month	1.02 ^b	1.16 ^a	1.10 ^{ab}	1.12 ^{ab}	1.11 ^{ab}	1.15 ^a	1.12 ^{ab}	1.13 ^{ab}	1.12 ^{ab}	0.04	0.12	<.0001	0.83
کل دوره Whole period	0.51	0.66	0.59	0.64	0.62	0.67	0.61	0.64	0.65				
میانگین ضریب تبدیل غذایی (کیلوگرم) Feed conversion ratio (kg)													
ماه اول First month	0.99	0.82	0.92	0.96	0.91	0.87	0.93	0.89	0.93				
ماه دوم Second month	1.43	1.31	1.43	1.38	1.39	1.34	1.41	1.33	1.41	0.67	0.44	0.61	0.87
کل دوره Whole period	1.34	1.21	1.33	1.29	1.23	1.25	1.32	1.31	1.38				

abc حروف نامشابه نشان دهنده تاثیر معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی می‌باشد. T: اثر تیمار، P: اثر دوره، T×P: اثر متقابل تیمار در دوره.

T₁: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T₂: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₃: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₄: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₅: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₆: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₇: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₈: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T₉: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

abc Different superscripts show the significant effect among experimental treatments.

T₁. basal diet without additive (control), T₂. basal diet containing 2 g probiotic additive, T₃. basal diet containing 3 g probiotic, T₄. basal diet containing 3 g organic acid, T₅. basal diet containing 4.5 g organic acid, T₆. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T₇. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T₈. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T₉. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

همانطور که در (جدول ۳) مشاهده می‌شود، جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر زمان استراحت، مصرف خوراک و نشخوار کردن

ظرفیت آن دارد. در آزمایش ناکانیشی و همکاران (۴۴) با افزودن باکتری‌های اسید لاکتیک به خوراک آغازین گوساله‌ها عملکرد شکمبه تحت تأثیر قرار گرفت به طوری که این گوساله‌ها در مقایسه با شاهد تمایل بیشتری برای نشخوار داشتند. این موضوع نشان می‌دهد که باکتری‌های اسید لاکتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) ممکن است توسعه شکمبه را افزایش داده باشد، زمانی که شکمبه توسعه بیشتری یافته باشد این بدان مفهوم است که تعداد پاپیلاها و سطح جذب افزایش یافته که این باعث افزایش بازده غذایی می‌شود. تفاوت در نتایج می‌تواند به طریقه مصرف (مخلوط در کنسانتره یا شیر)، ترکیب جیره، درصد دز مصرفی افزودنی، شرایط محیطی، سطح مدیریت و شرایط آزمایش در مزرعه باشد (۵۸).

گوساله‌های شیرخوار نداشت. ولی به طور غیر معنی‌دار گوساله‌های مصرف کننده جیره حاوی ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) و ۲ گرم پروبیوتیک + ۳ گرم اسیدآلی (تیمار ۶) کمترین زمان استراحت را نسبت به بقیه تیمارها داشتند. همچنین بیشترین زمان مصرف خوراک و نشخوار کردن مربوط به تیمار ۲ است. طی مطالعه‌ای بر روی گوساله‌های شیری، حسین آبادی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که مدت زمان نشخوار در تیمار پروبیوتیک باکتریایی در خوراک آغازین به طور غیر معنی‌دار بیشتر از تیمار پروبیوتیک باکتریایی در شیر و شاهد بود (۲۴). همچنین دکارت و همکاران (۱۲) گزارش نمودند که مدت زمان نشخوار کردن در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. سازگاری سریع گوساله‌ها به خوراک جامد بستگی به توسعه اپیتلیوم شکمبه‌ای و

جدول ۳- اثر جیره‌های آزمایشی بر رفتار تغذیه‌ای گوساله‌های هلشتاین (ساعت در شبانه روز)

Table 3- The effect of dietary treatments on feeding behavior of neonatal Holstein calves (h/a day)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	P value	SEM
زمان استراحت Rest time	12.63	11.47	12	12.07	12.13	11.56	12.26	12.02	12.17	0.877	0.457
مصرف خوراک Feed intake	5	5.59	5.44	5.50	5.50	5.56	5.43	5.47	5.40	0.881	0.322
نشخوار کردن Rumination	6.37	6.58	6.56	6.43	6.37	6.43	6.31	6.51	6.43	0.999	0.447

T1: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T2: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T3: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T4: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T5: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T6: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T7: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T8: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T9: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

T1. basal diet without additive (control), T2. basal diet containing 2 g probiotic additive, T3. basal diet containing 3 g probiotic, T4. basal diet containing 3 g organic acid, T5. basal diet containing 4.5 g organic acid, T6. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T7. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T8. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T9. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

جیره پایه حاوی ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) بود. بررسی متوسط افزایش در تغییرات دور شکم و قفسه سینه، در تیمارها می‌تواند نشان دهنده افزایش ظرفیت بدن و در نتیجه تفاوت در میزان خوراک مصرفی و افزایش وزن روزانه در بین گوساله‌ها باشد به طوری که در (جدول ۲) نشان داده شده است که بیشترین میانگین مصرف خوراک و میانگین افزایش وزن روزانه مربوط به تیمار ۲ می‌باشد. افزایش زیست فراهمی عناصر معدنی از جمله کلسیم، منیزیم و فسفر در نتیجه مصرف پروبیوتیک بر افزایش میزان رشد اسکلتی گوساله‌ها در مطالعه خانثیا و چادهاری (۴۹) نشان داده شده است. میر و میر (۳۹) نیز گزارش کردند استفاده از کشت مخمر به عنوان پروبیوتیک در جیره گوساله‌ها منجر به افزایش عددی وزن لاشه و کاهش تولید گوشت شد و این موضوع نشان دهنده اثر مخمر بر رشد استخوانی گوساله‌ها است. مک لئود و همکاران (۳۶) تفاوتی را در اندازه قطر شکم، عرض و

اثر تیمارهای آزمایشی بر رشد اسکلتی گوساله‌ها در (جدول ۴) نشان داده شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر پارامترهای رشد اسکلتی نداشت. همان طور که مشاهده می‌شود طول بدن بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. با این وجود از لحاظ عددی گوساله‌های مصرف کننده جیره پایه حاوی ۲ گرم پروبیوتیک (تیمار ۲) نسبت به شاهد و بقیه تیمارها طول بدن و قد بلندتری (قد از جدوگاه و کپل) را داشتند. موافق با نتایج این تحقیق، مهرداد و همکاران (۳۷) و لسمیستر و همکاران (۳۵) گزارش کردند مصرف پروبیوتیک تأثیر معنی‌داری بر تغییرات رشد اسکلتی (دور سینه، طول و ارتفاع بدن از جدوگاه) گوساله‌ها نداشت. به علاوه افزودن پروبیوتیک و اسید آلی تأثیر معنی‌داری بر محیط شکم و قفسه سینه در تمامی تیمارهای آزمایشی نداشته ولی از لحاظ عددی بیشترین اندازه در هر دو متغیر مربوط به گوساله‌های مصرف کننده

ارتفاع لگن گوساله‌هایی که در خوراک آغازین و یا جایگزین شیر آن‌ها پروبیوتیک اضافه شد، نسبت به گروه شاهد، مشاهده نکردند. همچنین صارمی و همکاران (۵۹) نشان دادند که تجویز پروبیوتیک (ساکارومایسیه) روی شاخص‌های رشد اسکلتی اثر معنی‌داری نداشت.

جدول ۴- اثر جیره‌های آزمایشی بر رشد اسکلتی گوساله‌های هلشتاین (سانتی‌متر)
Table 4- The effect of dietary treatments on skeletal growth of neonatal Holstein calves (cm)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	P value	SEM
طول بدن (سانتی‌متر) Body length (cm)	85	89.13	87.38	86.12	86.06	88.38	88.25	88.44	85.75	0.246	1.3
قد از جدوگاه (سانتی‌متر) height from front(cm)	89.94	94.69	91.25	91.81	91.25	91.44	93.50	94.19	91.25	0.246	1.36
قد از کپل (سانتی‌متر) height from behind(cm)	97.75	102.81	99.25	99.75	99.68	101.75	100.56	101.68	99.68	0.442	1.52
محیط شکم (سانتی‌متر) Abdomen size(cm)	104.06	110.19	106.44	108.13	109.25	104.44	105.88	109.38	106.69	0.733	3.59
محیط قفسه سینه (سانتی- متر) Chest size(cm)	96.56	104.18	98.81	101.88	101.56	100.13	98.13	102.13	98.88	0.571	3.22

T₁: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T₂: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₃: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₄: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₅: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₆: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₇: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₈: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T₉: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

T₁. basal diet without additive (control), T₂. basal diet containing 2 g probiotic additive, T₃. basal diet containing 3 g probiotic, T₄. basal diet containing 3 g organic acid, T₅. basal diet containing 4.5 g organic acid, T₆. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T₇. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T₈. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T₉. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

به سبب خوراندن اسیدهای آلی نسبت داده شود، این موضوع احتمالاً به هضم و جذب بیشتر مواد مغذی کمک کرده و در نتیجه میزان گلوکز خون را افزایش داده است (۲۱). در حقیقت غلظت گلوکز خون در روز ۴۵ بیشتر از روز ۷۵ بود و با افزایش سن، کاهش یافت. به نظر می‌رسد در نشخوارکنندگان با رشد شکمبه و دستگاه گوارش فارغ از جیره غذایی غلظت گلوکز کاهش می‌باید که این امر در گوساله‌های شیرخوار نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۵۱). غلظت گلوکز خون بستگی به سن گوساله، نوع و مقدار خوراک مصرفی دارد و با توسعه شکمبه مقدار آن کاهش یافته و علت آن کاهش هایپرگلاسمی غذایی با قطع مصرف شیر و تغییر در قابلیت دسترسی حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها در شکمبه گزارش شده است (۱۴).

نتایج مربوط به تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی گوساله‌های شیرخوار در جدول ۵ ارائه شده است. غلظت گلوکز خون تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. نتایج بررسی کلسترول خون نیز نشان داد جیره‌های حاوی ۴/۵ اسیدآلی (تیمار ۵) و ۲ پروبیوتیک + ۴/۵ اسیدآلی (تیمار ۷) در مقایسه با گروه شاهد منجر به کاهش کلسترول خون شدند. ولی جیره‌های آزمایشی تأثیری بر کلسترول خون در زمان ۷۵ روزگی نداشتند. از نظر غلظت‌های تری-گلیسرید، آلبومین و پروتئین کل خون نیز بین جیره‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

غلظت گلوکز خون در گوساله‌های دریافت کننده تیمار ۵ افزایش یافته بود، که این امر می‌تواند به ایجاد محیط مناسب در مجرای روده

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای خونی گوساله‌های شیرخوار هلشتاین
 Table 5- Effect of experimental treatments on blood parameters of neonatal Holstein calves

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	SEM	P values		
				گلوکز Glucose							T	P	T×P
روز ۴۵ Day 45	59.74	66.9	60.25	79.48	83.36	76.12	81.47	71.64	75.60				
روز ۷۵ Day 75	53.79	66.89	51.21	65.60	75.48	73.67	69.66	56.38	64.57	7.75	0.17	0.05	0.95
				کلسترول Cholesterol									
روز ۴۵ Day 45	33.18	39.55	29.24	31.61	24.62	35.34	29.62	29.62	36.80				
روز ۷۵ Day 75	32.29	30.59	42.61	41.57	41.4	36.72	48.19	42.21	50.27	4.12	0.2	0.003	0.002
				تری‌گلیسرید Triglyceride									
روز ۴۵ Day 45	21.25	14.29	12.32	15.89	15.53	10.89	15.71	13.05	15.71				
روز ۷۵ Day 75	17.53	13.30	15.36	12.56	12.93	14.22	21.8	13.04	19.16	3.72	0.9	0.51	0.2
				آلبومین Albumin									
روز ۴۵ Day 45	2.89	2.91	2.93	2.96	2.63	3.11	3.02	3.06	2.92				
روز ۷۵ Day 75	3.18	3.25	3.22	3.13	3.05	3.12	3.14	3.02	3.16	0.12	0.51	0.001	0.54
				پروتئین کل Total protein									
روز ۴۵ Day 45	6.04	5.87	6.25	5.93	5.97	6.03	5.97	6.09	5.89				
روز ۷۵ Day 75	6.84	6.68	6.95	6.84	7.22	6.91	7.14	6.76	7.56	0.26	0.54	0.0001	0.8
				ازت اوردهای Urea nitrogen									
روز ۴۵ Day 45	6.04	5.87	6.25	5.92	5.97	6.03	6.73	6.09	5.89				
روز ۷۵ Day 75	4.32	2.40	2.73	1.94	2.64	2.42	3.34	3.82	2.91	1.09	0.06	0.0001	0.4

abc میانگین‌های با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند ($P < 0.05$).

T: اثر تیمار، P: اثر دوره، T×P: اثر متقابل تیمار در دوره.

T₁: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T₂: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₃: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₄: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₅: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₆: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₇: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₈: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T₉: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

abc Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

T₁. basal diet without additive (control), T₂. basal diet containing 2 g probiotic additive, T₃. basal diet containing 3 g probiotic, T₄. basal diet containing 3 g organic acid, T₅. basal diet containing 4.5 g organic acid, T₆. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T₇. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T₈. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T₉. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

(۲۶) گزارش کردند که به طور کلی بهبود سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک‌ها از سه طریق افزایش آنتی‌بادی‌های عمومی، افزایش فعالیت‌های ماکروفاژی و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های موضعی در سطح مخاطی بافت‌هایی مثل دیواره روده انجام می‌شود. تأثیر اسیدهای آلی بر سیستم ایمنی هنوز به میزان زیادی ناشناخته باقی مانده است، اما به طور کلی می‌توان گفت که اسیدهای آلی با بهبود هضم و جذب مواد غذایی و همچنین با کاهش باکتری‌های مضر که موجب کاهش عفونت‌های تحت بالینی در حیوانات می‌شوند، می‌توانند در راستای کمک به سیستم ایمنی عمل کنند (۶۱). همچنین محصولات تخمیری پروبیوتیک‌ها به وسیله میکرو فلور روده از طریق تعدیل فعالیت ایمنی، بهبود راندمان انرژی و قابلیت هضم، باعث کاهش pH روده می‌شود که همین امر سبب سرکوب باکتری‌های بیماری‌زا می‌گردد (۵۶). در میان گلبول‌های سفید، نوتروفیل‌ها به آسیب‌های بافتی ناشی از باکتری‌ها زودتر پاسخ می‌دهند (۶۴). پروبیوتیک‌ها عملکرد سیستم ایمنی را در روده و سطح عمومی بدن افزایش می‌دهند. باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک به عنوان یک پروبیوتیک می‌توانند از طریق افزایش نفوسیت‌های B باعث افزایش پاسخ ایمنی بدن گردند (۱۳). از طرفی، گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش فعالیت فاگوسیتوزی گلبول‌های سفید، افزایش تعداد نوتروفیل‌ها و نفوسیت‌ها در سلول‌های دیواره روده، افزایش ترشح گاما انترفرون و در نتیجه افزایش تولید پادتن‌ها می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک نمایند (۲۰). درصد نفوسیت‌ها شاخص مهمی در ارزیابی سطح ایمنی بدن می‌باشد و هر چقدر این درصد بیشتر باشد، به همین مقدار نیز سطح ایمنی بدن بالا بوده و احتمال مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا بهبود می‌یابد (۶۴). همان گونه که در این آزمایش مشخص شد پروبیوتیک‌ها و اسیدآلی باعث افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید می‌شوند که این خود بیانگر تحریک سیستم ایمنی بدن می‌باشد. کریمی و رحیمی (۲۷) گزارش کردند که افزودن سطوح مختلف پروبیوتیک باعث افزایش در تعداد کل گلبول‌های سفید خون نسبت به گروه شاهد شد. کونن و همکاران (۳۱) گزارش کردند که پاسخ ایمنی با استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره افزایش می‌یابد که با نتایج به دست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. آلدانا و همکاران (۴) نشان دادند که افزودن پروبیوتیک به شیر جایگزین و خوراک آغازین گوساله‌های شیرخوار سبب بهبود وضعیت سلامت و تقویت سیستم ایمنی می‌شود. به طور کلی، کورکیونوسچی و همکاران (۱۰) بیان کردند که پروبیوتیک‌ها با حفظ حضور میکروارگانیسم‌های مفید در روده سبب حذف باکتری‌های بیماری‌زا شده و بدین ترتیب سبب تأثیر بر سیستم ایمنی دام نیز می‌شوند (۱۰). همچنین، کاهش pH روده از طریق تخمیر اسیدی، افزایش مصرف مواد مغذی، تولید باکتریوسین و تحریک سیستم ایمنی را نیز به دنبال دارند (۵۷). اثر دوره بر تمامی پارامترها به جز منوسیت‌ها معنی‌دار بود.

به نظر می‌رسد کاهش قابل توجه کلسترول سرم خون در گوساله‌های مصرف کننده مخلوطی از پروبیوتیک و اسیدآلی در تیمار ۷ (در روز ۴۵)، به دلیل اثر متقابل ایجاد شده بین آن‌ها باشد (۱۱). مکانیسم کاهش کلسترول به درستی شناخته نشده است. موهان و همکاران (۴۲) گزارش کردند که کاهش کلسترول بوسیله مکمل اسیدآلی می‌تواند ناشی از کاهش جذب و سنتز کلسترول در دستگاه گوارش باشد که کلسترول خون را بوسیله دکونژوگه کردن نمک‌های صفراوی در روده کاهش می‌دهد، بنابراین از فعالیت آن به عنوان یک پیش ماده در سنتز کلسترول جلوگیری می‌کند. همچنین نعمت‌پور و همکاران (۴۶) گزارش کردند که تغذیه گوساله‌های پروراری با دانه جو فرآوری شده با اسیدهای لاکتیک و سیتریک تأثیر معنی‌داری بر غلظت تری‌گلیسرید، پروتئین و آلبومین نداشت. نتایج بدست آمده از پژوهش حسین و همکاران (۲۳) و چانداری و همکاران (۹) با یافته‌های این تحقیق مطابقت داشت که عدم تأثیرگذاری پروبیوتیک بر آلبومین خون را گزارش کردند. سطح پروتئین پلاسما نشان دهنده وضعیت آنابولیسم و کاتابولیسم پروتئین در بدن است و تابع تعادل هورمونی، وضعیت تغذیه‌ای، تعادل آب و سایر عوامل مؤثر بر وضعیت سلامت حیوان است (۵۴). مسلمی‌پور و همکاران (۴۳) گزارش کردند که غلظت پروتئین کل گوساله‌ها تحت تأثیر افزودن پروبیوتیک به آغوز و شیر قرار نگرفت. مطابق نتایج این آزمایش ریدل و همکاران (۵۲) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک بر غلظت پروتئین تأثیر معنی‌داری نداشت.

مطابق نتایج گزارش شده در جدول ۶، جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر درصد گلبول‌های سفید در هر دو زمان نمونه‌گیری (۴۵ و ۷۵ روزگی) داشتند ($p < 0.05$). افزودن سطوح ۳ اسید آلی (تیمار ۴)، ۲ پروبیوتیک + ۳ اسیدآلی (تیمار ۶)، ۲ پروبیوتیک + ۴/۵ اسیدآلی (تیمار ۷) و ۳ پروبیوتیک + ۳ اسیدآلی (تیمار ۸) باعث افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خون نسبت به گروه شاهد در روز ۴۵ آزمایش شد ($p < 0.05$)، و بیشترین و کمترین درصد گلبول سفید خون نیز به ترتیب متعلق به تیمار ۶ و ۱ بود. افزایش در تعداد گلبول‌های سفید را می‌توان نوعی ایمنی‌زایی ناشی از مصرف پروبیوتیک دانست (۶۲). پناهی‌دهقان و همکاران (۴۷) اثر پروبیوتیک حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک زنده را بررسی کردند و مشاهده نمودند که تعداد کل گلبول‌های سفید و نفوسیت‌ها افزایش یافت، با توجه به این که در حیوانات، نفوسیت‌ها بالاترین میزان گلبول‌های سفید خون را تشکیل می‌دهند و برای ایجاد پاسخ ایمنی، تأثیر متقابل نفوسیت‌های نوع T و B و نیز ماکروفاژها لازم و ضروری است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تعداد نفوسیت‌ها در خون به دنبال افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون، می‌تواند در تحریک سیستم ایمنی بدن حیوانات نقش مهمی را ایفا نماید. کبیر و همکاران

جدول ۶- اثر جیره‌های آزمایشی بر گلبول‌های سفید و پاسخ ایمنی گوساله‌های هلشتاین

Table 6- Effect of experimental diets on white blood cells and immune response of Holstein calves

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	SEM	P values		
	گلبول سفید (%)										T	P	T×P
	White blood cell (%)												
روز ۴۵ Day 45	5.60	6.73	6.63	7.30	6.90	8.40	8.15	7.50	6.83	0.47	0.005	0.0001	0.09
روز ۷۵ Day 75	7.20	9.85	9.05	8.76	9.35	9.28	9.55	9.35	8.85				
	نوتروفیل (%)												
	Neutrophil (%)												
روز ۴۵ Day 45	28.75	29.50	28.25	35	37.25	43.25	33	27.25	31.50	2.99	0.2	0.0003	0.01
روز ۷۵ Day 75	37.50	44.25	41.50	41.25	35.50	42	39.50	40.50	36.25				
	لنفوسیت (%)												
	Lymphocyte (%)												
روز ۴۵ Day 45	66.75	70.50	65.50	61.25	57.50	52.50	63.25	70.25	64.50	2.81	0.07	0.0001	0.02
روز ۷۵ Day 75	58	52.25	55	54.25	59	52	56	56	59.75				
	مونوسیت (%)												
	Monocyte (%)												
روز ۴۵ Day 45	4.75	5.50	6.25	3.50	5.25	4.25	3.75	2.50	4	0.69	0.1	0.32	0.45
روز ۷۵ Day 7	4.50	3.50	3.50	4.50	5.50	6	4.50	3.50	4.15				

abc میانگین‌های با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند ($P < 0.05$).

T: اثر تیمار، P: اثر دوره، T×P: اثر متقابل تیمار در دوره.

T₁: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T₂: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₃: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₄: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₅: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₆: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₇: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₈: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T₉: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

abc Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

T₁. basal diet without additive (control), T₂. basal diet containing 2 g probiotic additive, T₃. basal diet containing 3 g probiotic, T₄. basal diet containing 3 g organic acid, T₅. basal diet containing 4.5 g organic acid, T₆. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T₇. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T₈. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T₉. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

دریافت کننده پروبیوتیک گزارش نمودند. به طور کلی، پروبیوتیک‌ها برای بهبود وضعیت سلامت و کاهش امتیاز قوام مدفوع چندین مکانیسم دارند که شامل: ۱- کاهش pH روده و به سبب آن ممانعت از رشد برخی از میکروب‌های بیماری‌زا (۱۵)، ۲- تولید پراکسید هیدروژن توسط لاکتوباسیل‌ها که دارای فعالیت باکتریوسیدی است (۱۹)، ۳- تقویت سیستم ایمنی و ۴- چسبیدن به اپیتلیوم روده و تکثیر در دستگاه گوارش و رقابت برای حذف میکروب‌های بیماری‌زا می‌باشد (۲۲). کاستیلو و مارتین (۶) بیان کردند که قدرت بافری ایجاد شده ناشی از تغذیه اسیدهای آلی در خوراک و دستگاه گوارش، سبب افزایش بازده انرژی و قابلیت هضم پروتئین خام، کلسیم و فسفر می-

امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامتی بین تیمارها در جدول ۷ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر قوام مدفوع، اسکور گوش، چشم و بینی داشت ($P < 0.05$). تیمارهای حاوی جیره‌های آزمایشی دارای امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت بهتری نسبت به گروه شاهد بودند. مطابق نتایج این آزمایش آلدانا و همکاران (۴) نشان دادند که پروبیوتیک‌ها سبب کاهش امتیاز قوام مدفوع و بهبود وضعیت سلامت گوساله‌ها شد. بروز اسهال به عنوان یکی از مشکلات اساسی در گوساله‌های شیرخوار در نظر گرفته می‌شود و جلوگیری از اسهال جهت بهبود رشد گوساله بسیار مهم است (۳۰). آقازی و همکاران (۳) کمترین میزان بروز اسهال را در گوساله‌های

شود، که این امر در نتیجه کاهش باکتری‌های مضر چسبیده به دیواره روده حاصل می‌گردد و منجر به بهبود وضعیت مدفوع و سلامت گوساله‌ها می‌شود. مکانیسم‌های عنوان شده بالا دلیلی بر تاثیر مثبت

جدول ۷- اثر جیره‌های آزمایشی بر امتیاز قوام مدفوع و وضعیت سلامت گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

Table 7- Effect of experimental diets on the fecal consistency score and neonatal Holstein calves condition

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	P value	SEM
قوام مدفوع											
Feces consistency	0.29 ^a	0.11 ^{bc}	0.18 ^{abc}	0.14 ^{bc}	0.3 ^a	0.1 ^c	0.33 ^a	0.26 ^b	0.3 ^a	0.007	0.037
اسکور گوش											
Ear score	0.33 ^a	0.11 ^b	0.19 ^{ab}	0.16 ^{ab}	0.18 ^{ab}	0.15 ^b	0.21 ^a	0.11 ^b	0.23 ^a	0.019	0.409
اسکور چشم											
Eye score	0.33 ^a	0.11 ^{bc}	0.19 ^{ab}	0.16 ^{ab}	0.18 ^{ab}	0.05 ^c	0.21 ^{ab}	0.11 ^{bc}	0.23 ^b	0.018	0.456
اسکور بینی											
Nose score	0.15 ^b	0.04 ^c	0.11 ^{bc}	0.09 ^{bc}	0.15 ^{ab}	0.05 ^c	0.16 ^{ab}	0.08 ^{bc}	0.19 ^a	0.044	0.528

abc میانگین‌های با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری به لحاظ آماری دارند ($P < 0.05$).

T₁: جیره شاهد (جیره پایه)، تیمار، T₂: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۲ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₃: جیره پایه حاوی افزودنی پروبیوتیک (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₄: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۳ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₅: جیره پایه حاوی اسیدآلی (۴/۵ گرم در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₆: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₇: جیره پایه حاوی (۲ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله)، تیمار، T₈: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۳ گرم اسیدآلی در روز به ازاء هر رأس گوساله) و T₉: جیره پایه حاوی (۳ گرم پروبیوتیک و ۴/۵ گرم اسید آلی در روز به ازاء هر رأس گوساله).

abc Means within the same line with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

T₁. basal diet without additive (control), T₂. basal diet containing 2 g probiotic additive, T₃. basal diet containing 3 g probiotic, T₄. basal diet containing 3 g organic acid, T₅. basal diet containing 4.5 g organic acid, T₆. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, T₇. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, T₈. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and T₉. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid

گوساله‌های شیرخوار توصیه می‌شود.

نتیجه گیری کلی

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک و اسیدآلی باعث افزایش خوراک مصرفی و وزن روزانه و نهایی گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه شاهد شد. مقایسه گروه-های تیماری نشان داد گوساله‌هایی که ۲ گرم در روز پروبیوتیک مصرف می‌کردند (تیمار ۲) از افزایش وزن بیشتر و رشد اسکلتی بالاتری داشتند بر این اساس، به نظر می‌رسد استفاده از پروبیوتیک در مقایسه با اسید آلی اثرات سودمندتری بر رشد گوساله‌های شیرخوار داشته و در مقایسه با اسید آلی به عنوان مکمل مناسب در تغذیه

سپاسگزاری

نگارندگان از کمک‌های دانشگاه محقق اردبیلی بدلیل تأمین بخشی از هزینه‌های این طرح قدردانی می‌کنند. همچنین از مدیر عامل و کارکنان زحمتکش شرکت کشت و صنعت دامپروری مغان جهت حمایت از اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Ababakr1, R., R. Riasi, M. H. Fathi, H. Naeemipoor, And S. Khorsandi. 2012. The effect of *spearment sativum* essence added to starter diet on ruminal fermentation, weaning age and performance of Holstein calves. Journal of Animal Science Research, 22(4): 141-154. (In Persian).
2. Afshar Mazandaran, N. and A. Rajab. 2001. Probiotics and their application in livestock nutrition. Tehran, Iran, Nourbakhsh Publication.
3. Agazzi, A., E. Tirloni, S. Stella, S. Marocco, B. Ripamonti, C. Bersani, J. M. Caputo, V. Dell'Orto, N. Rota, and G. Savoini. 2014. Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life. Animal Science, 14:101-115.

4. Aldana, C., F. Cabra, A. Carlos, F. Cavajal, and F. Rodriguez. 2009. Effect of probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young Holstein calves. *Journal of Animal Science*, 3:489-492.
5. Ashayerizade, A., B. Dastar, M. Shams, and M. Khamiri. 2008. Investigation of gut microflora and performance response of young broiler chicks to diets supplemented with Roxarson, avilamycine and Formaycine Gold. *Journal of Science and Technologies of Agriculture and Natural Science*, 43: 545-554.
6. Castillo, M. and S. M. Martin-Orue. 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84:2725-2734.
7. Cengiz, O., B.H. Koksall, O. Tatli, O. Sevim, H. Avci , T. Epikmen, D. Beyaz , S. uyukyoruk, M. Boyacioglu, A. Uner, and A.G. Onol. 2012. Influence of dietary organic acid blend supplementation and interaction with delayed feed access after hatch on broiler growth performance and intestinal health. *Veterinari Medicina*. 57(10): 515-528.
8. Chaudhary, L. C. A., N. Sahoo, D. N. Agrawal, M. Kamra , and N. N. Pathak. 2008. Effect of direct fed microbial on nutrient utilization, rumen fermentation, immune and growth response in crossbred cattle calves, *Indian Journal of Animal Science*, 78:515-521.
9. Corcionivoschi, N., D. Drincianu, I. Pop, M. Stack, D. Stef, and L. Julean. 2010. The effect of probiotics on animal health. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 43: 35-41.
10. Dastar, B., A. Khaksefidi, and Y. Mostafalo. 2008. The effect of *Tepax* probiotic and protein level on broilers performance. *Journal of Science and Technology of Agricultural and Natural Resources*, 12: 449-459. (In Persian).
11. Denli, M., F. Okan, and K. M. Celik. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2: 89-91.
12. Deckardt, K., A. Khol-Parisiniand, and Q. Zebli. 2013. Peculiarities of Enhancing Resistant Starch in Ruminants Using Chemical Methods: Opportunities and Challenges. *Nutrients*, 5: 1970-1988.
13. De Simone, C., R. Vesely, B. Bianchi Salvadori, and E. Jirillo, 1993. The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. *International Journal of Immunology*, 9: 8-23.
14. Fahey, J. R. G. C, and L. L. Berger. 1988. Carbohydrate Nutrition of Ruminants. In: D. C. Church (Ed.) *The ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
15. Fuller, R. 1977. The importance of lactobacilli in maintaining normal microbialbalance in the crop. *British Poultry Science*, 18:85-94.
16. Galvao, K. N., J. E. P. Santos, A. Coscioni, M. Villaseñor, W. M. Sischo, and A. C. Berge. 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development*, 45: 427- 440.
17. Ghahri, H., M. Shivazad., P. Farhumand, J. Egbal, and M. Najafzadeh. 2007. An investigation on the use of dietary organic acids on broiler performance. *Pajouhesh & Sazandegi*, 77: 26-33. (In Persian).
18. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and Maxwell, C. 1985 .Assimilation of cholesterol by lactic acid. *Applied Environmental Microbialigy*, 49: 337-381.
19. Gilliland, S. and M. Speck. 1977. Antagonistic action of lactobacillus acidophilus toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. *Journal of Food Protection*, 40: 820-823
20. Gorka, P., Z.M. Kowalski, P. Pietrzak, A. Kotunia, R. Kiljanczyk, J. Flaga, J. J. Holst, P. Guilloteau, and R. Zabielski. 2009. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *Journal of Physical Pharmacology*, 60:47-53.
21. Harmon, D. L. and K. R. McLeod. 2001. Glucose uptake and regulation by intestinal tissues: Implications and whole-body energetics. *Journal of Animal Science*, 79: 59-72.
22. Holzapfel, W. H., P. Haberer, , J. Snel, U. Schillinger, and J. H. J. Huisin.1998 Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
23. Hossain, S. A., S. N. Parnerkar, R. S.Haque, and D. Gupta. 2012. Influence of dietary supplementation of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on nutrient utilization ruminal and biochemical profiles of ankrejcalves, *Journal of Applied Animal Research*, 1(1): 30-38.
24. Hosseinabadi, m., M. Dehghan-Banadaky, and A. Zali. 2013. The Effect of Feeding of Bacterial Probiotic in Milk or Starter on Growth Performance, Health, Blood and Rumen Parameters of Suckling Calves. *Research on Animal Production*, 4(8): 57-69. (In Persian).
25. Isolauri, E., S. Salminen, and A. C. Ouwehand. 2004. Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. Animal Journal of clinical nutrition*, 18: 299- 313.
26. Kabir, S. L., M. M. Rahman, M. B. Rahman, M. M. Rahman, and S. U. Ahmed. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 3(5): 361-364.
27. Karimi, K. and S. H. Rahimi. 2004. The effects different levels of probiotic on fats and red cells of broilers. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 62: 40-45. (In Persian).
28. Kaur, I. P., K. Chopra, and A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of*

- Pharmacology Science, 15:1-9.
29. Khuntia, A. and I. C. Chaudhary. 2002. Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian Australian Journal of Animal Science*, 15: 188-194.
30. Kobashi, Y., A. Hasebe, and M. Nishio. 2005. Antibiotic-resistant bacteria from feces of livestock, farmyard manure, and farmland in Japan: case report. *Microbes Environment*, 20: 53-60.
31. Koenen, M. E., J. Kramer, R. Van Der Hulst, L. Heres, S. H. M. Jeurissen, W. J. A. Boersma, 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer-and meat-type chickens. *British Journal of Poultry Science*, 45(3): 355-366.
32. Kong, X. F., G. Y. Wu, and Y. L. Yin. 2011. Roles of phytochemicals in amino acid nutrition. *Fronteries in Bioscience*, 3: 372-384.
33. Laki, A., M. Dehghanbonadaky., A. Zali., M. Ganjkanlou, and K. Rezayazdi. 2016. Evaluation of barely grain processing with lactic acid and sitric acid on performance and feed intake behavior of Holstein Cows. *Animal production*, 18(2): 249-260. (In Persian).
34. Lee, K. W., H. Everts, and A. C. Beynen. 2004. Essential oils in broiler nutrition. *International Journal Poultry Science*, 3: 738-752.
35. Lesmeister, K. E., A. J. Heinrichs, and M. T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 87: 1832-1839
36. McLeod, K. R., D. L. Harmon, and J. B. Riddell. 2010. Addition of a bacillus-based probiotic to the diet of pre ruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters. *International Journal of Applied Research Veterinarni Medicina*, 8: 78-85.
37. Mehrdad, N., Y. Chashnidel, A. Teimori Yansari, and M. Khorvash. 2017. Effects of two kinds of probiotics on performance, blood and ruminal parameters in Holstein male calves. *Journal of Ruminant Research*, 5(1):23-44. (In Persian).
38. Mellor, S. 2000. Nutraceuticals-alternatives to antibiotics. *World's Poultry Science Journal*, 16: 30-33.
39. Mir, Z. and P. S. Mir. 1994. Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and in situ degradability. *Journal Animal Science*, 72:537-545.
40. Mohamadi, Gh., M. Mehri. and A. Ahmadi. 2008. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* CNCME-1079 probiotic on blood parameters, growth and health of Holstein newborn calves. *Iranian animal Science journal*, 2(1):19-32. (In Persian)
41. Mohamadi Roodposhti, P, and N. Dabiri. 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, ecal shedding of *Escherichia Coli* and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australasia. Journal Animal Sciences*. 9: 1255-1261.
42. Mohan, B., R. Kadirvel, M. Bhaskaran, and A. Natarajan.1995. Effect of Organic Acid supplementation on serum/yolk cholesterol and on egg shell thickness in layers. *British journal of Poultry Science*, 36: 799-803.
43. Moslemipur, F., F. Moslemipur, and Y. Mostafaloo. 2013. Effects of using probiotic and synbiotic in colostrum and milk on passive immunoglobulin transfer rate, growth and health parameters of calf. *Journal of Ruminant Research*, 1(4):19-30. (In Persian).
44. Nakanishi, Y., C. W. Arave, and P. H. Stewart. 1993. Effect of feeding *Lactobacillus acidophilus* yogurt on performance and behavior of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 76 (Suppl.1): 244.
45. Nejat, A., S. N. Tabatabaei, and A. D. Forouzandeh Shahraki. 2016. The effect of using three kinds of probiotics on performance, skeletal growth, and nutrient digestibility of dairy Holstein calves. *Journal of Zoology*, 5(2): 25-32.
46. Nematpoor, M., K. Rezayazdi, and M. Dehghan-Banadaki. 2014. Effects of dietary barley grain processed by organic acid on performance and digestibility in feedlot cattle. *Journal of Ruminant Research*, 2(3): 21-33. (In Persian).
47. Panahi dehghan, M. R., Nejad Fereidouni, R. S., Zende rouh Kermani, R., Modir Sanei, M., S. M. Mirslimi and F. Niknefsa. 1995. *Birds physiology*. (First edition), Kowsar Economic Organization Publications, Tehran. Iran.
48. Panda, A. K., R. Singh, and N. N. Pathak.1995. Effect of dietary inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance of crossbred calves. *Journal of Applied Animal Research*, 7: 195-200.
49. Patten, J. D. and P. W. Waldroup. 1988. Use of organic acids in broiler diets. *Poultry Science*, 67: 1178-1182.
50. Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003. Application of prebiotic and probiotics poultry production. *Poultry Science*, 82: 627-631.
51. Quigley, J. D. 1996. Influence of weaning method on growth, intake, and selected blood metabolites in Jersey

- calves. *Journal of Dairy Science*, 79: 2255-2260.
52. Riddell, J. B., A. J. Gallegos, D. L., Harmon, and K. R. Mcleod. 2010. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of preruminant calves: influence on growth, health, and blood parameters. *International Journal of Applied Research Veterinarni Medicina*, 8: 78-85.
53. Rezaei, M., A. Karimi Torshizi, and Y. Rouzbehan. 2011. Effect of dietary fiber on intestinal morphology and performance of broiler chickens. *Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 90: 52-60. (In Persian).
54. Rezaeian, M. 2004. Effect of yeast culture supplementation on the performance of finishing Shal lambs. *Proceedings of the British Society of Animal Science*, 128: 111-121.
55. Riddell, J. B., A. J. Gallegos, D. L. Harmon, and K. R. Mcleod. 2010. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of preruminant calves: influence on growth, health, and blood parameters. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 8: 78-85.
56. Roodposhti, P. M. and N. Dabiri. 2012. Effects of probiotic and prebiotic on average daily gain, fecal shedding of *Escherichia Coli*, and immune system status in newborn female calves. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 25: 1255-1261.
57. Salim, H. M., H. K. Kang, N. Akter, D. W. Kim, J. H. Kim, M. J. Kim, J. C. Na, H. B. Jong, H. C. Choi, O. S. Suh, and W. K. Kim. 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 92: 2084-2090.
58. Santin, E., A. Maiorka, M. Macari, M. Grecco, J. C. Sanchezi, T. M. Okada, and A. M. Myasaka. 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Applied Poultry Research*, 10: 236-244.
59. Saremi, B., A. A. Naserian, M. Bannayan, and F. Shahriary. 2004. Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on rumen bacterial population and performance of Holstein female calves. *Agricultural Sciences and Technology*, 18: 91-103.
60. Schiffrin, E. J., and S. Blum. 2002. Interactions between the microbial and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (S3): S60-S64.
61. Skrivanova, E. and M. Marounek. 2007. Influence of pH on antimicrobial activity of Organic acids against rabbit enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol (Praha)*, 52: 70-72.
62. Shoeib, H. K., A. N. Sayed, S. A. Sotohy, and S. K. Abdel Gaffar. 1997. Responses of broiler chicks to probiotic (*Pronifer*) supplementation. *Assian Veterinary Medicine Journal*, 36: 103-116.
63. Steiner, T. 2009. Effects of Phytogenic in animal natural concepts to optimize gut health and Tran. *Journal of clinical nutrition*. 17: 290- 310.
64. Ströhlein, H. 2003. The return to nature. Live yeast for the feeding of dairy cattle. I. DMZ, *Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 124: 36-38.
65. Timmerman, H. M., L. Mudler, H. Evrets, and D. C. Vanespan., 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacer with or without Probiotics. *Journal of Dairy Science*, 75: 894-899.
66. Warner, R. 1991. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant. a historical perspective. *Journal of Animal and Feed Science*, 68: 501-503.
67. Wolfenden, A. D., J. L. Icente, J. P. Higgins, F. R. L. Andreatti, S. E. Higgins, B. M. Hargis, and G. Tellez. 2007. Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 6: 403-405.



Effect of Different Levels of Probiotics and Organic Acid Supplements on Performance, Skeletal Growth, Nutrition Activity, Blood and Immune Metabolites in Holstein Calves

M. Jamali¹- F. Mirzaei Aghjeh gheslagh^{2*}- J. Seifdavati³- B. Navidshad³- R. Seyedsharifi³- R. Valizadeh Yonjalli⁴

Submitted: 06-04-2019

Accepted: 16-11-2019

Introduction: Calf breeding has been one of the most important and sensitive management programs in cattle farms. Therefore, using the right nutrition strategies for their improved growth and health is very important. For this reason, antibiotics have long been used in many countries to increase the growth of livestock due to their inhibitory effect on harmful bacteria in the gastrointestinal tract. In the last decades antibiotics were used for stimulating growth and increasing viability in calves, because of improving antibiotic resistance finding new techniques for improving growth and viability and reducing weaning weight is necessary. Adding supplemental levels of probiotic and organic acids can increase the immune system and improve health of calf. **OBJECTIVES:** In this study, the effects of different levels of probiotic and organic acids additive were investigated on blood metabolites, immune response and health of Holstein calves.

Material and Methods: In order to determine the effects of different levels of probiotic and organic acids on the performance, skeletal growth and feeding activity of infant calves, the experiment was conducted using 36 Holstein calves with a mean weight of $36 \text{ kg} \pm 2$ in a completely randomized design with nine treatments and four replicates. The experiment lasted for 75 days in Moghan Agro-Industrial Company located in Parsabad city, Ardebil province. Treatments included: 1. basal diet without additive (control), 2. basal diet containing 2 g probiotic additive, 3. basal diet containing 3 g probiotic, 4. basal diet containing 3 g organic acid, 5. basal diet containing 4.5 g organic acid, 6. basal diet containing 2 g of probiotic and 3 g of organic acid, 7. basal diet containing 2 g of probiotic and 4.5 g of organic acid, 8. basal diet containing 3 g probiotics and 3 g of organic acid and 9. basal diet containing 3 g probiotic and 4.5 g organic acid. The study evaluated feed intake, body weight gain, feed conversion ratio, skeletal growth, nutrition behavior, blood parameters, immune response and the calves health state. The test results were analyzed in a completely randomized design with SAS statistical software version 9.1.

Results and discussion: The results showed that experimental diets had a significant effect on feed intake and daily gain, blood glucose and cholesterol and improved the immune system and health status of calves ($p < 0.05$). In contrast, the experimental diets do not have a significant effect on the final weight and feed conversion ratio. This study also showed that the addition of probiotic, organic acid and the combination of these additives did not affect skeletal growth and feed intake activity of Holstein calves. Experimental treatments at 60 days and the whole period had a significant effect on feed intake. In general, probiotics increase food intake through their effects on the processes of digestion and absorption of nutrients. The average daily weight gain in the first, second and whole months of the period was affected

1- MSc Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil- Iran

2- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil - Iran (Corresponding Author*)

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil - Iran

4- PhD Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil- Iran

(*- Corresponding Author Email: f_mirzaei@uma.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.79924

by experimental diets but the overall effect of treatments in time periods was not significant. Blood glucose concentrations were increased in calves receiving treatment 5, which could be attributed to the created suitable environment in the intestinal tract due to the consumption of organic acids, which may have contributed to the digestion and absorption of more nutrients and As a result, it increases the blood glucose levels. Experimental diets had a significant effect on the white blood cell percentage in both sampling times (45 and 75 days). In general, the improvement of the immune system by probiotics is done through three ways of increasing general antibodies, increasing macrophage activity and increasing the production of local antibodies on the mucosal surface of tissues such as the intestinal wall. The effect of organic acids on the immune system is still largely unknown, but in general it can be said that organic acids improve digestion and absorption of nutrients as well as reducing harmful bacteria and help the immune system improvement.

Conclusion: based on the obtained results dietary treatments do not have any adverse effect on calves' performance. Moreover, it can be concluded that feeding probiotic and organic acid to the calves could have positive effects on animal performance and health state, so supplementing the diets by these substances is a good mean to improve the calves' growth.

Key Words: Calf, Holstein, Nutrition, Organic acid, Probiotic.



مقاله علمی - پژوهشی

بررسی تأثیر نانوذرات سلنیوم بر عملکرد، وضعیت آنتی اکسیدانی، فراسنجه‌های خونی و پایداری اکسیداتیو تخم مرغ در مرغان تخم‌گذار

امیرحسین شفیعی^۱ - مختار فتحی^{۲*} - تیمور تنها^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۳

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر نانوذرات سلنیوم بر فراسنجه‌های خونی و متابولیت‌های زرده در مرغ‌های تخمگذار انجام شد. این آزمایش با ۱۶۰ قطعه مرغ تخمگذار هایلاین W36 در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ پرنده در هر واحد آزمایشی صورت پذیرفت. جیره‌های آزمایشی شامل: جیره شاهد و سطوح ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم بود. فراسنجه‌های درصد تولید تخم مرغ، وزن تخم مرغ، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک نیز برای کل دوره آزمایشی محاسبه شد. متابولیت‌های سرم خون مورد آزمایش شامل: تعیین میزان مالون دی آلدئید، کلسترول تام، تری گلیسرید تام، آسپاراتات آمینوترنسفرز، آلانین ترنسفرز و آنتی اکسیدان تام بود. متابولیت‌های زرده تخم مرغ مورد آزمایش شامل: تعیین میزان غلظت سلنیوم زرده و سطح مالون دی آلدئید چربی‌های زرده بود. نتایج نشان داد اضافه نمودن نانوسلنیوم سبب افزایش درصد تولید تخم مرغ و بهبود ضریب تبدیل خوراک شد. سطوح مختلف نانوسلنیوم تأثیر معنی داری بر میزان مالون دی آلدئید، کلسترول، تری گلیسرید، فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترنسفرز و آلانین آمینوترنسفرز سرمی نداشتند. سطح ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم سبب بیشترین میزان سلنیوم در زرده نشان داد. ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم به طور منحنی با افزایش سطح نانوسلنیوم تا ۰/۳ میلی گرم افزایش ولی در سطح ۰/۵ میلی کاهش یافت. میزان پروکسیداسیون چربی‌های زرده تحت تأثیر مدت نگهداری و تیمارهای آزمایشی قرار گرفت به طوری که سطح ۰/۲ و ۰/۳ میلی گرم نانوسلنیوم سبب کاهش معنی دار مالون دی آلدئید تخم مرغ در روز اول و ۱۵ روز بعد از تخمگذاری شد.

واژه‌های کلیدی: پایداری اکسیداتیو تخم مرغ، عملکرد، فراسنجه خونی، مرغ تخمگذار، نانوسلنیوم، وضعیت آنتی اکسیدانی.

مقدمه

است. اما حساسیت بسیار زیاد این اسیدهای چرب غیراشباع به فساد اکسیداتیو سبب شده لزوم استفاده از منابع آنتی اکسیدانی بیش از پیش نمایان شود. با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی سلنیوم، غنی سازی تخم-مرغ با سلنیوم مورد توجه بسیاری از محققین واقع شده است. علاوه بر این، مکمل سازی جیره مرغ تخم‌گذار با منابع مختلف سلنیوم موجب افزایش مدت زمان ماندگاری تخم در شرایط انباری شده، خطر تشکیل پراکسیدها را کاهش می‌دهد و موجب بهبود کیفیت تخم مرغ می‌شود. به علاوه غنی سازی تخم مرغ با سلنیوم در بعضی نقاط جهان مانند چین که کمبود سلنیوم اثرات بیماری‌زایی مشهود است، می‌تواند احتیاجات این عنصر را در تغذیه انسان برآورده سازد (۱۵).

مکمل سلنیوم به دو شکل معدنی و آلی وجود دارد. سلنیت سدیم متداولترین شکل سلنیوم معدنی است. به تازگی استفاده از نانوذرات سلنیوم نیز به دلیل قابلیت زیست‌فراهمی بالاتر و سمیت کمتر نسبت به اشکال معدنی و آلی سلنیوم توجه بیشتری را به خود جلب کرده

سلنیوم یک عنصر معدنی کم نیاز و ضروری است که در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بدن به عنوان یک عامل مشترک در گلوکاتیون پراکسیداز تا حذف هیدروپراکسیدها برای محافظت غشای سلولی از آسیب های اکسیداتیو نقش دارد و برای کاهش اثرات منفی استرس اکسیداتیو مؤثر است. تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد از سلنیوم کل بدن در گلوکاتیون پراکسیداز قرار دارد علاوه بر این، امروزه علاقه زیادی برای غنی سازی منابع غذایی انسان با اسیدهای چرب امگا-۳ افزایش یافته

۱- فارغ التحصیل علوم دامی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲- استادیار علوم دامی، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: Email: fathi_mokhtar@yahoo.com
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.79464

روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. خوراک و آب به صورت آزاد در اختیار پرندگان آزمایشی قرار گرفت به طوری که روزانه ۹۳ تا ۱۰۸ گرم خوراک در دانخوری‌ها توزیع گردید.

جیره آزمایشی پایه بر مبنای ذرت و سویا، با انرژی قابل متابولیسم و پروتئین خام یکسان و بر اساس نیازهای تغذیه‌ای توصیه شده در راهنمای مدیریت تجاری مرغ تخم‌گذار های لاین (W36 ۲۰۱۶)، با استفاده از مواد خوراکی رایج تنظیم شد. اجزای غذایی جیره پایه در جدول ۱ نشان داده شده است. نانوسلنیوم مورد استفاده در این تحقیق، از مارک تجاری ایران نانومتریال با درجه خلوص ۹۹/۹۹ درصد بود. اندازه ذرات سلنیوم در دامنه ۴۵-۱۰ نانومتر به فرم مایع قرمز رنگ به غلظت یک گرم در لیتر بود.

خوراک هر تیمار به صورت هفته‌ای تهیه و مکمل معدنی فوق به صورت دستی به جیره پایه اضافه، به طور یکنواخت مخلوط و در اختیار پرندگان آزمایشی قرار گرفت. جیره‌های تغذیه‌ای مورد آزمایش در این مطالعه شامل: ۱- جیره پایه (حاوی ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل معدنی سلنیوم) ۲- جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم ۳- جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم ۴- جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم بود.

صفات مورد مطالعه

در این مطالعه به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری سطوح مختلف نانوسلنیوم بر صفات درصد تولید تخم مرغ، توده تخم مرغ تولیدی، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک برای کل دوره آزمایشی محاسبه گردید.

صفاتی که پس از اتمام دوره آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند شامل: متابولیت‌های سرم خون و متابولیت‌های زرده بود. متابولیت‌های سرم خون مورد آزمایش شامل: تعیین میزان مالونی دی آلدئید، کلسترول تام، تری گلیسرید تام، آسپاراتات آمینوترنسفرز، آلانین ترنسفرز و آنتی اکسیدان تام بود. متابولیت‌های زرده تخم مرغ مورد آزمایش شامل تعیین میزان غلظت سلنیوم زرده و عدد پرواکسید چربی‌های زرده بود.

در پایان دوره آزمایشی، به منظور بررسی اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی، به صورت کاملاً تصادفی از هر واحد آزمایشی تعداد ۲ قطعه پرندۀ انتخاب، خونگیری از ورید گردنی بعد از کشتار صورت گرفت. بلافاصله پس از خونگیری، نمونه‌های خون، به داخل لوله‌های آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد خون (EDTA) انتقال یافت. سپس جداسازی سرم خون با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه انجام و سرم تفکیک شده به داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی انتقال یافت و تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای خونی مورد نظر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

است (۴۰، ۴۴). برخی مطالعات نشان داد که نانو ذرات سلنیوم اثرات قابل توجهی در فعال کردن سلنوتانزیم‌ها در مقایسه با سلنیت، سلنومیتونین و متیل سلنوسیتستین داشته و اثرات سمی بسیار کمتر است. علاوه بر این ذرات نانوسلنیوم توانایی بالاتری نسبت به شکل سلنیت سدیم در انتقال به فرآورده‌های دامی از قبیل شیر و گوشت و تخم مرغ دارند. همچنین نشان داده‌اند که اثرات نانوسلنیوم در افزایش میزان فعالیت گلوکوتایون اس-ترانسفراز و کاهش اثرات سمی در حیوانات آزمایشگاهی موثرتر از منابع آلی سلنومیتونین بود. نانو ذرات سلنیوم محلول که دارای رنگ قرمز روشن است، بسیار پایدار بوده و به دلیل بالا بودن سطح مقطعی، دارای سطح بالایی از فعالیت بوده و کارایی کاتالیتیکی بالایی نیز دارند. این ذرات همچنین کارایی جذب بسیار بالایی دارند (۱۴، ۲۶، ۳۷، ۴۰ و ۴۴).

تحقیقات بسیاری نشان می‌دهد که میزان و منبع سلنیوم مورد استفاده در جیره در میزان انتقال آن به تخم مرغ مؤثر است. پایین و همکاران (۲۸) گزارش نمودند که مقدار سلنیوم تخم مرغ با افزایش سطوح سلنیوم جیره به طور خطی افزایش یافت، اما مقدار سلنیوم تخم مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با مخمر غنی از سلنیوم نسبت به مرغ‌های تغذیه شده با سلنیت سدیم بیشتر بود. تحقیقات دیگری بر روی غلظت سلنیوم کل تخم مرغ هنگام افزودن سلنیوم به جیره انجام گرفته است و بسیاری از محققان گزارش کرده‌اند که با افزایش سطح سلنیوم در جیره مقدار آن در تخم مرغ افزایش یافته است (۶، ۱۱، ۱۲). کانتور و همکاران (۶) نیز گزارش کردند که غلظت سلنیوم کل تخم مرغ، زرده و سفیده همگی در مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با سلنومیتونین در مقایسه با سدیم سلنیت بیشتر است. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که افزودن سلنیوم آلی به جیره مرغ‌های تخم‌گذار تجاری، غلظت سلنیوم را در زرده و سفیده تخم مرغ به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

بنابراین با توجه اثرات سودمند نانوسلنیوم در مقایسه با اشکال معدنی و آلی سلنیوم، هدف اصلی از اجرای این تحقیق بررسی تعیین سطح مناسب نانوذرات سلنیوم بر عملکردی تولید، وضعیت آنتی-اکسیدانی پلاسما و پایداری اکسیداتیو تخم‌مرغ در مدت نگهداری در انبار بود.

مواد و روش‌ها

پرندگان و جیره آزمایشی

این آزمایش با ۱۶۰ قطعه مرغ تخم‌گذار هایلاین W36 از سن ۳۰ هفتگی و به مدت ۸ هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ پرندۀ در هر واحد آزمایشی به مدت ۸ هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت. برنامه نوردی سالن بر اساس راهنمای پرورش نژاد هایلاین W36، برنامه نوری شامل ۱۶ ساعت

جدول ۱- اجزاء جیره پایه مورد استفاده در آزمایش
Table 1- The ingredients of experimental diet

مواد خوراکی (%) Ingredients (%)	ترکیبات شیمیایی جیره Chemical composition of the diet
ذرت Corn	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolism energy (kilocalories per kilogram) 2844
گندم Wheat	پروتئین خام (%) Crude Protein 16
کنجاله سویا (۴۴ درصد) Soybean (48% protein) meal	کلسیم (%) Calcium (%) 3.7
روغن سویا Soybean oil	فسفر قابل دسترس (%) Available phosphorous (%) 0.55
پودر صدف Oyster Powder	لیزین (%) Lysine (%) 0.88
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	متیونین (%) Methionine (%) 0.42
نمک Salt	سیستئین (%) Cystine (%) 0.33
دی‌آل‌متیونین DL methionine	متیونین + سیستئین (%) Methionine + Cystine (%) 0.75
آل‌لیزین Llysine	تریپتوفان (%) Tryptophan (%) 0.20
مکمل ویتامین ۱ Vitamin premix	سلنیوم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Selenium (mg/kg) 0.13
مکمل معدنی ۲ Mineral premix	

۱- مکمل ویتامین (هر کیلوگرم حاوی): ویتامین A، ۸۸۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D₃، ۲۵۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K، ۲۲ گرم؛ ویتامین B₁، ۱/۴۴ گرم؛ ویتامین B₂، ۴ گرم؛ ویتامین B₆، ۲/۴۶ گرم؛ ویتامین B₁₂، ۰/۰۰۱ گرم؛ بیوتین، ۱۵- گرم؛ فولاسین، ۴۸ گرم؛ پانتوتیک اسید، ۷/۸۴ گرم؛
۲- مکمل معدنی (هر کیلوگرم حاوی): منیزیم، ۷۴/۴ گرم؛ آهن، ۷۵ گرم؛ روی، ۶۴/۶۷ گرم؛ مس، ۷۵ گرم؛ یدید کلسیم، ۹۶۷/۵ سلنیوم، ۲۰۰ میلی‌گرم و ۱۰۰ گرم آنتی اکسیدان.
1-Vitamin premix (each kg contained): vitamin A 88000 IU; vitamin D₃, 25000IU; vitamin E, 11000 IU; vitamin K, 22 g; vitamin B₁, 1.44g; vitamin B₂, 4g; vitamin B₆, 2.46g; vitamin B₁₂, 0.001g, Biotin, 0.15mg, Folacin:48g, Pantothenic acid: 7.84 g.
2- Mineral premix (each kg contained): Manganese: 74.4g, Iron: 75g, Zinc, 64.67g, Copper: 75g, Calcium iodine: 867.5g, 200mg Selenium and 100g Antioxidant.

غلظت تری گلیسرید در نمونه‌های سرم خون توسط کیت آزمایشگاهی زیست شیمی پارس آزمون و با روش آنزیماتیک اندازه‌گیری شد. توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز در سرم با دستگاه اتوانالایزر (RA1000) با استفاده از کیت‌های پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل از روش (FRAP) ارائه شده توسط بنزی و استرین (۳) قدرت احیاءکنندگی آنتی اکسیدان‌های موجود در نمونه‌های آزمایشی مورد سنجش قرار گرفت. به طور خلاصه ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم با ۲

جهت بررسی تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان مالونیل دی‌آلدئید سرمی، اندازه‌گیری سطح سرمی مالونیل دی‌آلدئید بر پایه واکنش تیوباربیتوریک اسید بوده و این آزمایش بر مقدار جذب نوری کمپلکس صورتی رنگ حاصل از واکنش یک مولکول مالون دی‌آلدئید و دو مولکول تیوباربیتوریک اسید استوار است. در این آزمایش مالون دی‌آلدئید به عنوان محصول ثانویه پرواکسیداسیون اندازه‌گیری شد (۱۶ و ۱۷).

کلسترول تام در این مطالعه به روش غلظت کلسترول سرم خون در این مطالعه با استفاده از کیت آزمایشگاهی پارس آزمون توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه داده‌های حاصل از متابولیت‌های خونی و متابولیت‌های زرده در قالب طرح کاملاً تصادفی، تحت رویه GLM و با استفاده از نسخه ۹/۱ نرم افزار آماری (SAS, 2003) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد صورت گرفته است.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر عملکرد

تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر عملکرد مرغان تخمگذار در جدول ۲ ارائه شده است. در حالیکه تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر خوراک مصرفی و وزن تخم مرغ، نداشتند ($P > 0.05$)، ضریب تبدیل خوراک و درصد تخمگذاری به طور منحنی‌وار معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم قرار گرفتند ($P < 0.05$) به طوریکه بهترین ضریب تبدیل خوراک و بیشترین درصد تخمگذاری مربوط به تیمار ۰/۳ میلی گرم نانوذرات سلنیوم بود و با افزایش سطح نانوذرات سلنیوم در جیره به ۰/۵ میلی گرم، درصد تخمگذاری و ضریب تبدیل عملکرد کاهشی را نشان دادند.

اثرات سودمند شکل نانو سلنیوم در مقایسه با اشکل دیگر از قبیل سلنیت سدیم و سلنوسیستین، بر عملکرد تولیدی مرغان تخمگذار قبلاً گزارش شده است (۲۵). این محققین گزارش کردند که مکمل سازی سطح ۰/۲۵ میلی گرم نانوذرات سلنیوم در مقایسه با همین سطح از سلنیت سدیم، به طوری معنی‌داری درصد تخمگذاری، توده تخم مرغ و ضریب تبدیل خوراک را بهبود دادند. علاوه بر این این محققین پیشنهاد دادند که سطوح بالای نانوسلنیوم با اثراتی کاملاً برعکس، سبب افت عملکرد در مرغان تخمگذار می شود. حدس بر این است که ذرات نانوذرات سلنیوم به دلیل دارا بودن سطح مقطعی بالا و متعاقباً راندمان جذب بسیار بالاتر در مقایسه با اشکال دیگر سلنیوم، در مقادیر مشابه، می توانند به طور موثری به عنوان فاکتور کمکی آنزیم ۵-دئودیناز عمل نموده و این آنزیم به طور فعال سبب تبدیل هومون T4 به T3 شود. هومون T3 نیز سبب تنظیم متابولیسم انرژی و پروتئین می‌شود. علاوه بر این کارایی بالای جذب ذرات نانوسلنیوم سبب استفاده بهینه این عنصر در آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز شده و به این ترتیب توان آنتی اکسیدانی پرنده را بالا می برد و به این ترتیب سبب افزایش عملکرد تولید در پرنده خواهد شد. از طرفی سطوح بالای نانوذرات سلنیوم بسیار سمی‌تر از سایر اشکال سلنیوم سبب القاء تنش اکسیداتیو شده و عملکرد تولید را کاهش می دهند (۵ و ۲۵).

میلی لیتر از محلول FRAP مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه میزان شدت رنگ حاصل از کمپلکس ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۵۳۹ نانومتر اندازه گیری شد.

به منظور تعیین صفات مربوط به متابولیت‌های زرده شامل: تعیین میزان غلظت سلنیوم زرده و عدد پراکسیداسیون چربی‌های زرده، تعداد ۶ عدد تخم از هر واحد آزمایشی به طور کاملاً تصادفی جمع‌آوری صورت پذیرفت. تخم مرغ‌های جمع‌آوری شده از هر واحد آزمایشی پس از انتقال به آزمایشگاه، شکسته و زرده از سفیده تفکیک گردید. سپس از زرده‌های تفکیک شده به ازای هر واحد آزمایشی ۱ نمونه جهت انجام آزمایشات مربوط به متابولیت‌های زرده نمونه‌گیری انجام شد.

به منظور ارزیابی میزان غلظت سلنیوم زرده، از نمونه‌های زرده حاصل از ۶ عدد تخم استحصال شده از هر واحد آزمایشی که در حین نمونه برداری همگن شده بودند، ۵ گرم نمونه زرده وزن‌کشی و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. سپس ۰/۵ گرم نمونه زرده خشک شده از هر واحد آزمایشی توزین و توسط اسید نیتریک ۷۰ درصد و هیدروژن پرواکسید ۳۰ درصد خیس گردید. سپس در دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار داده شدند و از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکروگرم عبور داده شدند. اندازه‌گیری سلنیوم از طریق جذب اتمی مورد استفاده قرار گرفت (۷).

اندازه‌گیری عدد پروکسید در چربی‌های زرده تخم مرغ یکی از روش‌های رایج به منظور سنجش میزان پرواکسیداسیون اسیدهای چرب زرده است. به منظور انجام این آزمایش، محلول اسید استیک-کلروفرم (مخلوط شده به نسبت ۳ به ۲)، یدید پتاسیم اشباع، تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال و محلول نشاسته ۱ درصد مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۵ گرم نمونه زرده توسط ترازوی دیجیتالی (دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن شده و به یک ارلن ۲۵۰ سی‌سی انتقال یافت. ۳۰ میلی لیتر اسید استیک-کلروفرم به آن افزوده و کمی تکان داده شد تا نمونه زرده توسط اسید استیک-کلروفرم کاملاً محلول گردد. سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول یدید پتاسیم اشباع به آن افزوده و به مدت یک دقیقه تکان داده شد. در ادامه پس از افزودن ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به نمونه‌های آزمایشی، ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۱ درصد نیز افزوده شد که در این مرحله رنگ نمونه آبی شد (در صورت وجود پرواکسید در نمونه رنگ سرمه‌ای یا آبی). سپس بر روی پلیت مگنت دار قرار داده شده و تیتراسیون توسط محلول تیوسولفات سدیم تا زمان رفع رنگ آبی نمونه انجام شد. حجم تیوسولفات سدیم مورد استفاده به عنوان شاخص (A) در نظر گرفته شد. همچنین فرآیند فوق به طور هم‌زمان در قبال نمونه شاهد صورت پذیرفته و حجم تیوسولفات سدیم مورد استفاده به عنوان شاخص (B) در نظر گرفته شد. در پایان عدد پروکسید از رابطه (AOAC, 1995) محاسبه گردید.

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم تغذیه‌ای بر فراسنجه‌های عملکردی پرندگان

Table 2- Effect of Different Levels of Selenium Nanoparticles on the Level of productive performance parameters of birds

فراسنجه Parameter	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				SEM	P- value
	T1	T2	T3	T4		
درصد تولید Egg production (%)	93.50 ^c	94.25 ^b	95.59 ^a	93.02 ^c	1.02	0.001
وزن تخم مرغ (گرم) Egg weight (g)	58.65	59.23	60.29	58.67	0.97	0.26
خوراک مصرفی (گرم در روز) Feed intake (g/d)	184.50	187.40	186.50	188.48	3.5	0.29
ضریب تبدیل (گرم خوراک مصرفی در روز / گرم وزن توده تخم مرغ تولیدی در روز) (g feed/g egg mass) Feed conversion	2.06 ^a	1.98 ^b	1.87 ^c	2.01 ^a	0.021	0.001

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg / kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at (P < 0.05).

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر غلظت مالون دی آلدئید

پلاسما

اثر افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم در جیره پرندگان آزمایشی بر میزان غلظت مالونیل دی آلدئید سرم در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج این آزمایش حاکی از آن است که افزودن سطوح مختلف

نانوسلنیوم در جیره مرغ‌های تخمگذار اثر منحنی وار معنی داری بر میزان غلظت سرمی مالون دی آلدئید داشت به طوری که افزایش سطح نانوسلنیوم تا ۰/۳ میلی گرم، سطح مالوم دی آلدئید سرم کاهش یافت اما افزایش مکمل سازی نانوسلنیوم تا سطح ۰/۵ سبب افزایش سطح مالون دی آلدئید سرم شد ($P < 0.05$).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم تغذیه‌ای بر میزان غلظت مالون دی آلدئید سرم پرندگان

Table 3. Effect of Different Levels of Selenium Nanoparticles on the Level of Malondialdehyde Concentration in Birds Serum

فراسنجه Parameter	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				SEM	P- value
	T1	T2	T3	T4		
سطح مالون دی آلدئید سرم (نانومول در میلی لیتر) Serum malondialdehyde (Nmol / ml)	2.1 ^a	1.8 ^b	1.2 ^c	2.3 ^a	0.15	0.001

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg / kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at (P < 0.05).

مکمل سازی جیره جوجه‌های گوشتی با منبع سلنیت سدیم (۰/۳ پی - پی ام در کیلوگرم) و نانوسلنیوم (۰/۳ پی - پی ام در کیلوگرم) اثر معنی - داری بر میزان مالون دی آلدئید سرم نداشت. نتایج بدست آمده در

پترویک و همکاران (۲۹) گزارش کردند افزودن سطوح و منابع مختلف سلنیوم اثر معنی داری بر میزان مالونیل دی آلدئید سرم مرغ تخمگذار نداشت. همچنین نتایج مطالعه خیا و همکاران (۴۲) نشان داد

طریق بیان ژن گلوکاتین و تثبیت سطح mRNA گلوکاتین پروکسیداز در مرحله رونویسی سیتوزوئیک انجام می‌شود گزارشاتی وجود دارد که سطوح بالای سلنیوم (نانو ذرات سلنیوم) سبب ایجاد مسمومیت شده و با اثرات اکسیدانی خود سبب ایجاد تنش اکسیداتیو خواهد شد (۹،۴۱).

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر غلظت کلسترول تام و تری گلیسیرید تام سرم

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به اثر جیره بر میزان غلظت سرمی کلسترول، تری گلیسیرید تام و در جدول ۴ آورده شده است. تأثیر افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم تغذیه‌ای بر میزان غلظت کلسترول تام سرم تیمارهای آزمایشی در پایان دوره آزمایش معنی‌دار نبود ($P>0.05$). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم بر میزان غلظت تری گلیسیرید سرمی تیمارهای آزمایشی در پایان دوره اعمال جیره معنی‌دار نبود ($P>0.05$).

این مطالعه با نتایج آریا و همکاران (۱) مغایرت داشت. مطابق با نتایج بدست آمده در این مطالعه، جینگ و همکاران (۲۱) با افزودن سطوح و منابع مختلف سلنیوم در جیره کاهش معنی‌داری را در میزان مالونیل دی آلدئید سرم مرغ‌های تخمگذار گزارش کردند. بوستانی و همکاران (۴) با افزودن ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانو سلنیوم در جیره مرغ‌های تخمگذار موجب کاهش معنی‌داری در میزان مالون دی آلدئید سرم در مقایسه با گروه شاهد شد. همچنین کای و همکاران (۵) گزارش کردند بکارگیری نانوسلنیوم در جیره مرغ‌های گوشتی موجب کاهش معنی‌داری در میزان مالون دی آلدئید سرم گردید. غلظت پلاسمایی مالون دی آلدئید به عنوان یک بیومارکر در تعیین سطح پروکسیداسیون چربی شناخته شده است (۲۷) که نتایج حاصل از اکسیداسیون چربی تولید محصولات ثانویه بسیار سمی است (۱۳). تحقیقات نشان می‌دهد یک همبستگی معکوس بین میزان سلنیوم تغذیه‌ای با میزان فعالیت آنزیم گلوکاتین پروکسیداز و میزان غلظت مالون دی آلدئید وجود دارد (۲۱) که همواره افزایش میزان مالون دی آلدئید سرم با کاهش فعالیت آنزیم گلوکاتین پروکسیداز همراه است (۲). به نظر می‌رسد تأثیر سلنیوم بر فعالیت گلوکاتین پروکسیداز از

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر میزان غلظت کلسترول تام و تری گلیسیرید تام سرم پرندگان
Table 4. Effect of different levels of selenium nanoparticles on total cholesterol and total serum triglyceride concentrations

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	triglyceride concentrations	
	متابولیت‌های خونی Blood metabolites	
	تری گلیسیرید Triglyceride (میلی گرم در دسی لیتر) (Mg / dl)	کلسترول Cholesterol (میلی گرم در دسی لیتر) (Mg / dl)
T1	632.7	103.67
T2	953.3	220.23
T3	539.3	125.67
T4	440.7	108.00
P- value	0.3392	0.4661
SEM	168.69	48.97

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c: حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg / kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at ($P < 0.05$).

نگرفت. همچنین تحقیقات زینلی و همکاران (۴۳) نشان داد که اثر مکمل سازی جیره جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش با ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم بر میزان کلسترول و تری گلیسیرید سرم معنی‌دار نبود. رضانی و همکاران (۳۰) عدم تأثیرگذاری سطوح مختلف سلنومیتونین را بر میزان غلظت کلسترول سرمی جوجه‌های

تحقیقات ریو و همکاران (۳۱) نشان داد افزودن سطوح مختلف سلنیوم معدنی در جیره اثر معنی‌داری بر میزان کلسترون سرمی جوجه‌های گوشتی نداشت. نتایج تحقیقات کریستین و همکاران (۸) نشان دادند که سطوح کلسترول و تری گلیسیرید سرمی مرغ‌های تخم‌گذار تحت تأثیر تیمارهای مکمل شده با سلنیوم آلی قرار

گوشتی در شرایط تنش را گزارش کردند. نتایج تحقیقات حیوی و همکاران (۱۸) نشان دادند افزودن نانوسلنیوم در جیره جوجه گوشتی اثر معنی‌داری بر میزان تری گلیسیرید سرم نداشت. به نظر می‌رسد مکانیسم تأثیر سلنیوم بر میزان غلظت لیپیدهای سرم به طول کامل نشاخته شده نیست. اما برخی محققان بر این باورند که مهمترین مکانیسم تأثیر سلنیوم بر غلظت لیپیدهای سرم را اثر سلنیوم بر میزان فعالیت *HMG-COA* ردوکتاز در کبد است که کنترل کننده میزان بیوسنتز کلسترول است (۲۶). تحقیقات دیگری نشان داد افزایش میزان فعالیت آنزیمی *HMG-COA* ردوکتاز در کبد عامل هیپوکلسترولمی در موش‌های دارای کمبود سلنیوم است (۳۵).

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر فعالیت آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آنتی‌اکسیدان تام سرم

تأثیر مکمل سازی جیره مرغ تخمگذار با سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر میزان فعالیت آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین ترانسفراز و

آنتی‌اکسیدان تام سرم در جدول ۵ ارائه شده است. در این مطالعه نتایج نشان داد که اثر افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم در جیره بر میزان فعالیت آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز مرغ‌های تخمگذار در تیمارهای مکمل شده نسبت به شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم پرندگان به طور معنی داری تحت تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم قرار گرفت ($P < 0.05$). به طوری که سطوح ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم نانوسلنیوم سبب افزایش ولی سطح ۰/۵ میلی گرم سبب کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم پرندگان شدند.

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز در تشخیص بیماری‌های کبدی ارزشمند بوده و شاخص آسیب کبدی به شمار می‌آید (۲۳). تحقیقات برخی محققان نشان می‌دهد در صورت دریافت مقادیر بالای سلنیوم معدنی آسیب‌های اکسیداتیو و سمیت کبدی افزایش می‌یابد. همچنین اثر سلنیوم در افزایش بیان ژن ترانسفرین به عنوان ناقل آهن به درون سلول در ایجاد نوعی کم خونی مؤثر است (۲۲ و ۳۶).

جدول ۵- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر میزان غلظت آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آنتی‌اکسیدان تام سرم پرندگان

Table 5. Effect of different levels of selenium nanoparticles on the concentration of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and total serum antioxidant in birds

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	متابولیت‌های خونی Blood metabolites		
	آلانین آمینوترانسفراز alanineaminotransf ease	آسپاراتات آمینوترانسفراز aspartateaminotrans ferase	آنتی اکسیدان تام total antioxidant
	(واحد در لیتر) (Unit / l)	(واحد در لیتر) (Unit / l)	(میلی مول در لیتر) (Nmol / ml)
T1	5.33	171.33	1.08 ^c
T2	7.66	177.00	1.26 ^b
T3	6.00	146.67	1.95 ^a
T4	7.00	173.67	0.93 ^c
P- value	0.4021	0.2996	0.001
SEM	0.8539	9.97	0.1523

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی-گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی-گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی-گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c: حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg/kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at ($P < 0.05$).

افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن در ارتباط باشد (۲۰). عدم تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم مکمل شده در این مطالعه بر فعالیت آلانین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز می‌تواند به دلیل عدم اعمال استرس اکسیداتیو در تیمارهای مکمل شده باشد.

کای و همکاران (۵) گزارش کردند در صورت بکارگیری نانوسلنیوم در جیره فعالیت رادیکال‌های آزاد در کبد نسبت به تیمار شاهد کاهش خواهد یافت. به نظر می‌رسد افزایش آنزیم‌های کبدی می‌تواند با افزایش استرس اکسیداتیو و پروکسیداسیون چربی‌ها و

غلظت های سرمی پرکسیدهای لیپیدی مالون دی آلدئید می شود (۴۴).

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر تعیین میزان سلنیوم زرده تخم مرغ

تأثیر مکمل سازی جیره با سطوح مختلف سلنیوم بر میزان غلظت سلنیوم زرده واحدهای آزمایشی در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر افزودن سطوح مختلف نانوسلنیوم تغذیه ای بر میزان غلظت سلنیوم زرده بین تیمارهای آزمایشی و شاهد معنی دار بود به طوریکه با افزایش سطح نانوسلنیوم جیره، سلنیوم زرده تخم مرغ به صورت خطی افزایش یافت و بیشترین سطح سلنیوم زرده تخم مرغ مربوط به سطح ۰/۵ گرم نانوسلنیوم بود ($P < 0.01$).

ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم شامل مجموعه ای از مکانیسم های آنزیمی و غیر آنزیمی است که شامل برخی ترکیبات هیدروفلیک (گلوکاتینون، بیلی روبین، اسید اوریک و ویتامین C)، ترکیبات هیدروفوبیک (ویتامین E)، آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز است که بطور مستقیم اثر دارند. به نظر می رسد تأثیر سلنیوم بر فعالیت گلوکاتینون پروکسیداز از طریق بیان ژن گلوکاتینون و تثبیت سطح mRNA گلوکاتینون پروکسیداز در مرحله رونویسی سیتوزوئیک انجام می شود همچنین افزودن سلنیوم در جیره میزان ویتامین E مورد نیاز برای حفظ سلامت غشاهای لیپیدی را کاهش و به ابقاء ویتامین E در پلاسما کمک می کند (۹ و ۴۱). افزایش سطوح سلنیوم می تواند اثرات سمی بر توان آنتی اکسیدانی بدن داشته باشد به طوری که گزارش کرده اند، سطوح بالای نانو سلنیوم سبب القاء تنش اکسیداتیو شده و احتمالاً سبب افزایش رادیکالهای آزاد و افزایش

جدول ۶- تأثیر سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم بر میزان سلنیوم زرده تخم مرغ
Table 6- Effect of Different Levels of Selenium Nanoparticles on the Selenium Concentration of Egg

فراسنجه Parameter	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				SEM	P- value
	T1	T2	T3	T4		
سلنیوم زرده (میکروگرم در گرم) Selenium yolk (µg per gram)	0.85 ^d	1.13 ^c	2.14 ^b	2.81 ^a	0.019	0.001

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c: حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg/kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at ($P < 0.05$).

مطالعاتی دیگر، گزارش شده است که مخمر غنی از سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم، موجب افزایش سلنیوم بیشتری در تخم مرغ شده است (۳۸). اما شواهد دیگری نشان می دهد، اثر افزودن سطوح مختلف سلنیوم آلی و معدنی، در افزایش غلظت سلنیوم کل در تخم معنی دار بوده اما اختلاف معنی داری بین منابع آلی و معدنی سلنیوم در افزایش غلظت سلنیوم در زرده وجود نداشته است و بیشترین اثر منابع آلی سلنیوم در افزایش غلظت سلنیوم در سفیده تخم گزارش شده است (۱۰). به طور مشابه، محققان در بررسی دیگری بیان داشته اند که افزودن سلنیوم آلی به جیره مرغ تخم گذار، موجب افزایش میزان سلنیوم در سفیده در مقایسه با سلنیت سدیم شده و اثر معنی داری در غلظت سلنیوم زرده نداشته است (۲۴).

به نظر می رسد دلیل افزایش میزان سلنیوم در زرده مرغ های تخمگذار تغذیه شده با نانو سلنیوم، مشابه فرایند جذب منابع آلی سلنیوم باشد. نادیا و همکاران (۲۵) گزارش کردند که شکل نانوسلنیوم

تحقیقات نشان می دهد که افزایش میزان غلظت سلنیوم در زرده تخم مرغ، به نوع منبع سلنیوم مورد استفاده در جیره طیور بستگی دارد. به طور کلی، سلنومیتونین اساساً در سفیده تخم مرغ ذخیره می شود در صورتی که سلنیوم غیر آلی به طور کثیری در زرده تخم مرغ پخش می شود (۳۳). هنری و آمرمان (۱۹) نشان دادند که سلنومیتونین نسبت به سدیم سلنیت با سرعت کمتری به سلنوسیتستین تبدیل می شود و تبدیل سدیم سلنیت به سلنوسیتستین ممکن است قبل از انتقال به تخم مرغ اتفاق بیافتد زیرا سدیم سلنیت در کبد متابولیزه شده و برای ساختن پروتئین های زرده تخم مرغ مورد استفاده قرار می گیرد. برخی تحقیقات نشان می دهد که استفاده از ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم، ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم مخمر غنی از سلنیوم و سطوح متفاوت دی ال سلنومیتونین (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، میلی گرم در کیلوگرم) در جیره مرغ های تخم گذار، موجب افزایش قابل توجهی در سلنیوم زرده شده است (۲۱). در

بسیار بیشتر از اشکال سلنیت سدیم و سلنوسلنیوم توانایی انتقال به پلاسما و تخم‌مرغ در مرغان تخمگذار را دارند. برخی محققان معتقدند که فرایند جذب سلنیوم آلی مشابه فرایند جذب متیونین در روده بوده و به شکل فعال جذب می‌شوند و به طور موثرتری در ساختمان پروتئین‌ها شرکت کرده و بدون واسطه وارد پروتئین تخم می‌شوند. این در حالی است که منابع معدنی سلنیوم به طور غیر فعال در بدن جذب شده و مقادیر اضافی آنها دفع می‌گردد. در این بین بیشترین کارایی هضم و جذب مربوط به شکل نانوسلنیوم است (۳۶ و ۳۸).

تأثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم بر پروکسیداسیون چربی‌های تخم مرغ

تأثیر مکمل‌سازی جیره با سطوح مختلف نانوسلنیوم بر پروکسیداسیون چربی‌های زرده در جدول ۷ ارائه شده است. نتایج نشان داد که عدد پروکسید چربی‌های زرده در روز ۱ و ۱۵ نمونه-برداری اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای آزمایشی با شاهد را نشان داد به طوری که افزایش سطح نانوسلنیوم تا ۰/۳ میلی گرم، سبب کاهش غلظت مالون دی آلدئید زرده تخم مرغ در روز ۱ و ۱۵

نگهداری شد ($P < 0.05$). برخی محققان نشان می‌دهد از لحاظ آماری اثر افزودن سطوح و منابع مختلف سلنیوم بر میزان پایداری اکسیداتیو لیپیدهای زرده تخم مرغ‌هایی که ۱۴ روز از تولید را می‌گذرانند معنی‌دار نبود (۳۴). همچنین دیگر محققان با نگهداری تخم مرغ‌های تخم‌گذار به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، اختلاف معنی‌داری را در میزان مالون دی آلدئید زرده، بین تیمارهای آزمایشی با شاهد را گزارش کرده‌اند. میزان افزایش مالون دی آلدئید در زرده، رابطه مستقیمی با دمای نگهداری داشته و تأثیر استفاده از سطوح مختلف ویتامین E و سلنیوم موجب کاهش معنی‌داری در میزان مالون دی آلدئید شده است (۲۴). همچنین تحقیقات دیگری نشان می‌دهد سلنیوم موجب افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز و کاهش حساسیت زرده به فساد اکسیداتیو در دوره نگهداری شده است و سلنیوم با آهسته کردن روند دفع دی اکسید کربن از پوسته، موجب کاهش افت وزن و افزایش واحد هاو شده و در نتیجه منجر به کاهش فساد تخم شده است (۳۲). تأثیر مثبت نانوسلنیوم را در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد محیط انبار نگهداری تخم مرغ گزارش کرده اند (۲۴).

جدول ۷- تأثیر افزودن سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم به جیره مرغ‌های تخمگذار بر سطح مالون دی آلدئید تخم مرغ پرندگان
Table 7. Effect of Different Levels of Selenium Nanoparticles malondialdehyde Concentration of Egg

مالون دی آلدئید (نانومول در میلی‌لیتر) malondialdehyde (Nmol / ml)	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				P- value	SEM
	T1	T2	T3	T4		
روز ۱ Day 1	0.4466 ^a	0.3033 ^b	0.2933 ^c	0.4233 ^a	0.001	0.017
روز ۱۵ Day15	0.2533 ^b	0.2367 ^c	0.2000 ^d	0.2733 ^a	0.001	0.105

تیمار ۱: جیره پایه، تیمار ۲: جیره پایه به همراه ۰/۲ میلی-گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۳: جیره پایه به همراه ۰/۳ میلی-گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم، تیمار ۴: جیره پایه به همراه ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم.

a, b, c: حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف بین میانگین تیمارهای آزمایشی مختلف در سطح ۵ درصد است.

T1: basal diet, T2: basal diet with 0.2 mg / kg Selenium Nanoparticles, T3: basal diet with 0.3 mg/kg Selenium Nanoparticles, T4: basal diet with 0.5 mg W / kg of Selenium Nanoparticles.

a, b, c; Means with different superscripts within a column for each effect are significantly different at ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سطوح نانوسلنیوم تا ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم به جیره مرغان تخمگذار، می‌تواند همزمان با افزایش درصد تولید تخم‌مرغ و بهبود ضریب تبدیل خوراک، سبب

افزایش توان آنتی اکسیدانی سرم، کاهش پرکسیداسیون لیپیدهای زرده و افزایش زمان نگهداری تخم مرغ در انبار شود. همچنین این نتایج نشان داد که سطوح بالای نانوسلنیوم با اثرات اکسیدانی خود می‌تواند سبب ایجاد تنش اکسیداتیو شود.

منابع

1. Arai, T., M. Sugawara, T. Sako, S. Motoyoshi, T. Shimura, N. Tsutsui, and T. Konno. 1994. Glutathione

- peroxidase activity in tissues of chickens supplemented with dietary selenium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107: 245-248.
2. Balogh, K., M. Weber, M. Erdelyi, and M. Mezes. 2004. Effect of excess selenium supplementation on the glutathione redox system in broiler chicken. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52:403-411.
3. Benzie, I. F., and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.
4. Boostani, A., A.A. Sadeghi, S. N. Mousavi, M. Chamani, and N. Kashan. 2015. The effects of organic, inorganic, and nano-selenium on blood attributes in broiler chickens exposed to oxidative stress. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43: 1-6.
5. Cai, S., C. Wu, L.M. Gong, Y. Song, H. Wu, and L. Y. Zhang. 2012. Effects of Nano-selenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance and tissue selenium content in broilers. *Poultry Science*, 91(10): 2532-9.
6. Cantor, A. H., M. L. Straw, M. J. Ford, A. J. Pescatore, and M. K. Dunlap. 2000. Effect of feeding organic selenium in diets of laying hens on egg selenium content. Page 473 in *Egg Nutrition and Biotechnology*. J. S. Sim, S. Nakai, and W. Guenter, ed. CABI Publishing, New York, NY.
7. Chamsaz, M., M. H. Arbabzavar, and M. M. Riaz. 2007. Determination of selenium(IV) by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry using Single Drop Extraction in Real Samples. *Asian Journal of chemistry*, 19:3475-82.
8. Christine, A., R. Zuberbuehler, E. Messikommer, M. Myrtha, Arnold, Rhea S. Forrer, and W. Casper. 2006. Effect of selenium depletion and selenium repletion by choice feeding on selenium status of young and old laying hens. *Physiology & Behavior*, 87: 430-40.
9. Christensen, M. J. and Burgener, K.W. 1992. Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *Journal of Nutrition*, 122: 1620-1626.
10. Čobanová, K., V. Petrovič, M. Mellen, H. Arpášová, L. Grešáková, and S. Faix. 2011. Effects of dietary form of selenium on its distribution in eggs. *Biological trace element research*, 144(1-3), 736-746.
11. Davis, R. H. and J. Fear. 1996a. incorporation of selenium into egg proteins from dietary selenite. *Br Poultry Science*, 37(1):197-211.
12. Davis, R. H., J. Fear, and A. C. Winton. 1996b. Interactions between dietary selenium, copper, and sodium nitroprusside, a source of cyanide in growing chicks and laying hens. *British Poultry Science*, 37:87-94.
13. Del Rio, D., A. J. Stewart, and N. Pellegrini. 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Met. Card. Dis.* 15:316-328.
14. Desai, M. P., V. Labhasetwar, E. Walter, R. J. Levy, and G. L. Amidon. 1997. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharmaceutical Research*, 14(11):1568-1573 .
15. Farrel, D.J. 2002. Adding Value to the Hen's Egg. School of Land and Food Science. The University of Queensland, Qld 4072. Australia.
16. Fathi, M., M. Haydari, and T. Tanha. 2015. Effects of Enalapril on Performance growth, Ascites Mortality, Antioxidant Status and Blood Parameters in Broiler Chickens Under Cold-Induced Ascites. *Poultry Science Journal*, 3 (2): 121-127.
17. Fathi, M., M. Haydari, and T. Tanha. 2016. Influence of Dietary Aspirin on Growth Performance, Antioxidant Status, and Mortality due to Ascites in Broiler Chickens. *Poultry Science Journal*. *Poultry Science Journal*, 4 (2): 139-146
18. Habibi, R., H. Delivery, R. Spring, M. Taghizadeh, S. Soleimani, And M. Ali Hasan Maslak. 2014. Comparison of the effects of three forms of selenium (mineral, organic and nano) on the activity of enzyme glutathione peroxidase and serum metabolites in broiler chicks. Sixth Conference of Agricultural Research Findings. The University of Kordestan. P. 33-30. (In Persian)
19. Henry, P. R, and C. B. Ammerman. Selenium bioavailability. 1995. *Bioavailability of Nutrients for Animals: Amino acids, minerals, and vitamins*. . P 301.
20. Jiang, Z.Y., Y. C. Lin, G. L. Zhou, L. H. Luo, S.Q. Jiang, and F. Chen. 2009. Effects of dietary selenomethionine supplementation on growth performance, meat quality and antioxidant property in yellow broilers. *Journal Agriculter Food*, 57: 9769-9772.
21. Jing, C. L, X. F. Dong, Z. M. Wang, S. Liu, and J. M. Tong. 2015. Comparative study of DL-selenomethionine vs sodium selenite and selenoyeast on antioxidant activity and selenium status in laying hens. *Poultry Science*, 94: 965-975.
22. Mikulski, D., J. Jankowski, Z. Zdunczyk, M. Wroblewska, K. Sartowska, and T. Modjeska. 2009. The effect of selenium source on performance, carcass traits, oxidative status of the organism and meat quality of turkeys. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 518-530.

23. Mohamadi, R., F. Farokhi, V. Najati, and R. S. Aires. 2012. Assessment of the amount of hepatohistopathological and enzymatic changes after chronic lead intoxication in utero and throughout life in rat. *Qom University Medicine Science Journal*, 7(1):83-90.
24. Mohiti-Asli, M., F. Shariatmadari, H. Lotfollahian, and M. T. Mazuji. 2008. Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Canadian Journal of Animal Science*, 88(3): 475-483.
25. Nassir, F., C. Moundras, D. Bayle, C. Serougne, E. Gueux, E. Rock, Y. Rayssiguier, and A. Mazur. 1997. Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. *British Journal of Nutrition*, 78:493-500.
26. Nielsen, F., B. B. Mikkelsen, J. B. Nielsen, H. R. Andersen, and P. Grandjean. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*, 43:1209-1214.
27. Payne, R. L. and L. L. Southern. 2005. Changes in glutathione peroxidase and tissue selenium concentrations of broilers after consuming a diet adequate in selenium. *Journal of Poultry Science*, 84: 1268-1276.
28. Petrovic, V., K. Boldizarova, S. Faix, M. Mellen, H. Arpasova and L. Leng. 2006. Antioxidant and selenium status of laying hens fed with diets supplemented with selenite or Se-yeast. *Journal of Animal and Feed Science*, 15: 435-444.
29. Ramezani, S., A. Riazi, N. Afzali, And M. H. Fathi Nasiri. 2013. The effect of selenium and sodium bicarbonate on blood biochemical traits, performance and carcass characteristics of broiler chicks under thermal stress conditions. *Veterinary Journal (Research and Development)*, No. 9 (In Persian).
30. Ryu, Y. C., M. C. Rhee, K. M. Lee, and B. C. Kim. 2005. Effect of different levels of dietary supplemental selenium on performance, lipid oxidation, and color stability of broiler chicks. *Journal of poultry Science*, 84:809-15.
31. Scheideler, S., P. Weber, and D. Monsalve D. 2010. Supplemental vitamin E and selenium effects on egg production, egg quality, and egg deposition of α -tocopherol and selenium. *Journal of Applied Poultry Research*, 19(4): 354-360.
32. Shen, H., C. Yang, J. Liu, and C. Ong. 2000. Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical in Biology and Medicine*, 28: 1115-1124.
33. Skrivan, M., I. Bubancová, M. Marounek, and G. Dlouhá. 2010. Selenium and alpha-tocopherol content in eggs produced by hens that were fed diets supplemented with selenomethionine, sodium selenite and vitamin E. *Czech Journal of Animal Science-UZEL (Czech Republic)*.
34. Strougne, C., C. Felgines, J. Ftrtzu, T. Hajri, C. Bertin, and A. Mazur. 1995. Hypercholesterolemia induced by cholesterol- or cystine-enriched diets is characterized by different plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in rats. *Journal of Nutrition*, 125, 35-41.
35. Surai. P. 2002. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *World's Poultry Science Journal*, 58(3), 333-347.
36. Torres. S.K, V. L. Campos, and C. G. Leon. 2012. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(11):1236 .
37. Utterback, P.L., C. M. Parsons, I. Yoon, and J. Butlert. 2005. Effect of supplementing selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. *Poultry Science*, 84:1900-1901.
38. Lawyer, R. and M. Bahram. 2010. Effect of Different Levels of Selenium on Metabolic Blood Metabolic and Hemorrhagic Safety in Broiler Chickens. *Journal of Veterinary Research*, (4) 65: 336-329. (In Persian).
39. Wang, H., J. Zhang, and H. Yu. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology Medicine*, 42(10):1524-1533 .
40. Weiss, S. L., J. K. Evenson, K. M. Thompson, and R. A. Sunde. 1997. Dietary selenium regulation of glutathione peroxidase mRNA and other selenium-dependent parameters in male rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 8:85.
41. Xia, M., H. Zhang, C. Hu and Z. Xu. 2005. Effect of nanoselenium on growth performance and antioxidant function of broiler chicken. *Nutrimenta Sinica*, 27:307-310.
42. Zainli, A., A. Riazi, and H. Kermanshahi. 2009. Effect of Sodium Selenite and Turmeric Powder on Performance, Carcass Quality and Antioxidant Metabolites of Broiler Chickens under Thermal Stress Conditions. *Journal of Animal Science Research*, (2) 1: 70-85. (In Persian).
43. Zhang, J., X. Wang, and T. Xu. 2008. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. *Toxicology Science*, 101(1):22-31.



Effect of Selenium Nanoparticles on Performance, Antioxidant Status, Blood Parameters and Oxidative Stability of Eggs in Laying Hens

A. H. Shafiei¹- M. Fathi² *- T. Tanha²

Submitted: 28-02-2019

Accepted: 04-12-2019

Introduction: Selenium is an essential trace element that is indispensable for normal functioning of the body and thus plays a critical role in the maintenance of optimal health. It is known to have important role in a number of biological functions, such as antioxidant defense, immune function, reproduction and thyroid hormone metabolism. Eggs and meat are considered to be good sources of Se in human diet. Egg Se content can easily be manipulated to give increased levels, when organic selenium as selenomethionine is included in layer diets. Recently, Nano-Se which is bright red, highly stable, soluble has attracted widespread attention because nanometer particulates exhibit novel characteristics such as a large surface area, high surface activity, high catalytic efficiency, strong adsorbing ability, high bioavailability and low toxicity. It is also, Selenium concentration of whole eggs, yolks and albumins higher in selenomethionin-fed laying hen than in sodium selenite. Also, research has shown that the addition of organic selenium to the diet of commercial laying hens significantly increases the selenium concentration in egg yolk and egg albumins. Since there is little information about the antioxidant effects of selenium nanoparticles on antioxidant status in laying hens, the main goal of this study was to compare the antioxidant effects of nano-selenium in laying hens and the oxidative stability of eggs during storage in the warehouse was.

Materials and Methods: This experiment was carried out in a completely randomized design with 4 treatments, 4 replicates and 10 birds per experimental unit in a total of 160 laying hens of HY-Line W36 from 30 weeks of age. The experimental diets included: 1- control diet 2- control diet plus 0.2 mg/kg nano selenium 3- control diet plus 0.3 mg/kg selenium 4- control diet plus 0.5 mg/Kg, nano selenium was available to experimental birds for 8 weeks. Performance parameters including, egg percentage, egg weight, feed intake and feed conversion coefficients were calculated for the whole trial period. At the end of the experimental period, blood parameters and yolk metabolites from each experimental unit including: blood serum metabolites and yolk metabolites were also calculated. The blood serum metabolites tested included: determination of malondialdehyde, total cholesterol, total triglyceride, aspartate aminotransferase, alanine transferase and total antioxidant. Egg yolk metabolites were tested to determine the concentration of yolk selenium and yolk fat proxide number. Data from blood metabolites and yolk metabolites were analyzed in a completely randomized design, under the GLM procedure, using statistical software version 1/9 (SAS, 2003). Mean comparison was done using Tukey test at 5% level.

Results and Discussion: The results showed that the addition of nano selenium increased egg production and improved feed conversion ratio. Effects of different levels of nano selenium on serum malondialdehyde, cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were not significant. Supplementation of diet with 0.5 mg / kg Nano selenium showed the highest selenium in yolk. Serum antioxidant capacity increased curvature by increasing the level of nano selenium up to 0.3 mg/kg feed, but decreased by 0.5 mg/kg feed. Peroxidation of yolk fat was influenced by storage time and experimental treatments, so that levels of 0.2 and 0.3 mg of nano selenium caused a significant decrease in egg malondialdehyde on day one and 15 days after storage. Other biochemical parameters of serum were not significantly affected by experimental treatments.

Selenium has shown to increase the activity of glutathione peroxidase and decrease the sensitivity of yolk to oxidative damage during storage, and selenium, by slowing down the process of carbon dioxide removal from the crust, reduced

1- Scientific Member of Animal Science, Department of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, I. R. Iran

2- Assistant Professor of Animal Science, Department of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, I. R. Iran.

3- Assistant Professor of Animal Science, Department of Agriculture, Payam Noor University, Tehran, I. R. Iran. (*-Corresponding Author Email: fathi_mokhtar@yahoo.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.79464

the weight loss and increased the unit size, thereby reducing egg corruption. Increasing levels of selenium can have toxic effects on the antioxidant capacity of the body. It has been reported that high nano-selenium levels induce oxidative stress and possibly increase free radicals and increase serum lipids malondialdehyde.

Conclusion: The results of this study indicate that addition of nano selenium up to 0.3 mg / kg can, improved feed conversion ratio and increase egg production egg storage time by increasing the egg yolk selenium level by preventing the peroxidation of the lipids. Nano selenium used in the proposed levels in this study, improved the health of laying hens by increasing the antioxidant capacity of the serum.

Keywords: Antioxidant status, Blood Parameters, Egg Oxidative stability, Laying Hens, Selenium Nanoparticles.



مقاله علمی - پژوهشی

تأثیر سلنیوم به همراه ویتامین E بر عملکرد تولیدی، پاسخ ایمنی و متابولیت‌های خونی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار

حسین احمدیان^۱ - ذبیح اله نعمتی^{۲*} - امیر کریمی^۳ - رشید صفری^۳ - محمدرضا شیخلو^۳ - مقصود بشارتی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۱

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات توأم منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر عملکرد، خصوصیات کیفی، سیستم ایمنی و متابولیت‌های خونی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار انجام شد. تعداد ۱۴۴ قطعه پرنده بلدرچین ماده در قالب طرح کاملاً تصادفی در بین ۳ تیمار با ۴ تکرار و ۱۲ قطعه در هر تکرار توزیع شد. تیمارهای آزمایشی شامل جیره پایه (بدون افزودنی) و دو منبع سلنیوم آلی (سلپلکس) و معدنی (سلنیت سدیم) همراه با ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره بود که هر کدام از منابع به میزان ۰/۴ میلی گرم در کیلوگرم جیره غذایی سلنیوم تامین کرد. نتایج نشان داد میانگین وزن-تخم، درصد تخم‌گذاری و ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با گروه کنترل تحت تأثیر منابع آلی و معدنی سلنیوم قرار نگرفت. پرنده‌گان دریافت‌کننده جیره-غذایی حاوی سلنیوم آلی به همراه ویتامین E در مقایسه با سایر تیمارها مصرف خوراک پایین‌تر داشتند و ضریب تبدیل غذایی آن‌ها از نظر عددی کاهش و تمایل به معنی داری داشت. سلنیوم آلی به همراه ویتامین E در جیره غذایی سبب بهبود ارتفاع سفیده، واحد هاو، pH زرده و شاخص زرده در مقایسه با گروه شاهد شد. صفات کیفی تخم شامل شاخص زرده و سطح پوسته در گروه سلنیوم معدنی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد. غلظت سلنیوم زرده در گروه های سلنیوم آلی و معدنی به همراه ویتامین E نسبت به گروه شاهد افزایش نشان شد که از لحاظ تغذیه‌ای بهتر است. میزان کلسترول کل و تری گلیسیرید خون تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. میزان مالونیل دی آلدید در زرده تخم‌های ذخیره شده در گروه شاهد بیش‌ترین و در گروه حاوی سلنیوم آلی کمترین مقدار بود. می‌توان نتیجه گرفت افزودن سلنیوم آلی در مقایسه با سلنیوم معدنی در افزایش سلنیوم زرده و حفظ کیفیت تخم بلدرچین در طول دوره ذخیره سازی موثرتر است.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، کیفیت تخم، سلپلکس، سلنیت سدیم، متابولیت خون.

مقدمه

پراکسید چربی‌ها محافظت می‌کند (۴۰ و ۴۵). مکمل‌های سلنیوم به دو شکل معدنی (مانند سلنیت سدیم) و آلی (مانند سلپلکس، سلنومیتوئین) در خوراک طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۰). تحقیقات نشان می‌دهد که منابع آلی سلنیوم در مقایسه با منابع معدنی به مراتب کارایی بیشتری بر عملکرد دارند (۱۲) و موجب ذخیره مقادیر بیشتری از سلنیوم در تخم مرغ و بهبود صفات کیفی تخم می‌شوند (۲۰ و ۳۴). همچنین در مطالعات دیگری مکمل سازی جیره مرغ تخم‌گذار با منابع مختلف سلنیوم (۰/۱۶ گرم در کیلوگرم) موجب حفظ واحد هاو در تخم‌های تجاری انباری شد (۲، ۱۶ و ۳۰) و در فرم آلی سلنیوم، بیش‌ترین میزان سلنیوم در تخم گزارش شده است (۸ و ۳۱).

کلسترول یکی از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده غشاء سلولی و لیپوپروتئین‌های خون است که در سنتز ویتامین D در پوست، هورمون‌های تستوسترون و استرادیول نقش داشته و نقش فعالی نیز در فرایندهای پاتولوژیکی به صورت عاملیت در ایجاد آترواسکلروز

افزودن عناصر معدنی کمیاب در جیره غذایی حیوانات برای حفظ سلامتی، عملکرد مناسب بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و تولید محصول غذایی با کیفیت بالا ضروری است. یکی از مواد معدنی کم نیاز برای طیور سلنیوم می‌باشد (۴۵). سلنیوم یک عنصر ضروری در تغذیه طیور و به عنوان بخشی از سلنوپروتئین‌ها و بخش فعال آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز بوده که سلول‌ها را از آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد و

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
(*)- ایمیل نویسنده مسئول: znnemati@yahoo.com,

(znnemati@tabrizu.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.74681

آمریکا (۱۴) و بر اساس ذرتسویا، تنظیم و در اختیار پرندگان آزمایشی قرار گرفت شد (جدول ۱). برنامه نوردی سالن شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. وزن تخم، مصرف خوراک، درصد تولید، ضریب تبدیل غذایی و مجموع توده تخم به عنوان شاخص‌های عملکرد تولیدی، در پایان هر هفته از دوره آزمایش اندازه‌گیری شدند. در پایان هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ این مطالعه از هر واحد آزمایشی ۶ عدد تخم بلدرچین به طور کاملاً تصادفی انتخاب و جهت اندازه‌گیری خصوصیات کیفی تخم که شامل: شاخص شکل، ارتفاع سفیده، واحد هاو، مقیاس رنگ زرده، اندیس زرده، ضخامت پوسته، وزن پوسته، سطح تخم و وزن مخصوص بودند، شکسته شدند. همچنین در پایان هفته هشتم آزمایش تعداد ۱۲ عدد تخم از هر واحد آزمایشی جمع آوری و در دماهای (۵ و ۲۲ درجه سلسیوس) به مدت ۳۰ روز برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌های زرده نگهداری شدند.

واحد هاو با استفاده از دستگاه سه پایه و از طریق رابطه ۱ (۱۹) و شاخص زرده از طریق اندازه‌گیری ارتفاع و عرض زرده توسط کولیس دیجیتالی (مدل Mitutoyo) با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید. همچنین شدت رنگ زرده توسط مقیاس رش تخمین زده شد و جهت اندازه‌گیری شاخص شکل تخم، طول و عرض تخم با استفاده از کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری و از طریق رابطه ۳ محاسبه شد. پوسته‌های تخم بلدرچین آنالیز شده پس از خشک شدن در دمای اتاق، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن‌کشی و وزن مخصوص (۲۲)، درصد، سطح و استحکام پوسته (۳)، از طریق رابطه‌های ۴ الی ۷ محاسبه گردید.

رابطه ۱:

$$\log 100 \times \text{ارتفاع سفیده} - 1/7 (\text{وزن تخم}) + 7/57 \times 10^{-3}$$

رابطه ۲:

$$100 \times (\text{عرض زرده} / \text{ارتفاع زرده}) = \text{شاخص زرده}$$

رابطه ۳:

$$100 \times (\text{طول تخم} / \text{عرض تخم میلی‌متر}) = \text{شاخص شکل تخم}$$

رابطه ۴:

$$(\text{وزن پوسته} \times 100 / 4759 - \text{وزن تخم} \times 968 / 10) / \text{وزن تخم} = \text{وزن مخصوص}$$

رابطه ۵:

$$100 \times (\text{وزن تخم بلدرچین} / \text{وزن پوسته}) = \text{درصد وزن پوسته}$$

رابطه ۶:

$$\text{وزن تخم بلدرچین} \times 3/9782 = \text{سطح پوسته}$$

رابطه ۷:

$$\text{میلی‌متر سطح آن} / \text{میلی‌گرم وزن پوسته} = \text{استحکام پوسته}$$

شربانی و بیماری‌های عروقی قلب، عروق کرونر و عروق محیطی دارد. گزارشات متفاوتی در رابطه با تأثیر آنتی اکسیدان‌ها بر میزان کلسترول و تری گلیسرید خون در طیور منتشر شده است. نتایج برخی تحقیقات نشان داد ویتامین E کاهش میزان کلسترول خون را به همراه داشت (۲۱). در حالی که برخی دیگر از محققان اثرات توأم ویتامین E و سلنیوم را بر افزایش میزان کلسترول و تری گلیسرید خون را معنی‌دار گزارش کردند (۴۹). مهم‌ترین مکانیسم تأثیرگذار سلنیوم بر غلظت لیپیدهای سرم، اثر سلنیوم بر میزان فعالیت *HMG-CoA* ردوکتاز در کبد است که کنترل کننده میزان بیوسنتز کلسترول است بطوریکه افزایش میزان فعالیت آنزیمی *HMG-CoA* ردوکتاز در کبد عامل هیپوکلسترولمی در موش‌های دارای کمبود سلنیوم است (۴۱) ویتامین E یک آنتی اکسیدان بین سلولی و ویتامین محلول در چربی به عنوان اولین خط دفاعی عمل کرده و از آسیب رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه جلوگیری می‌کند. سلنیوم هم به عنوان بخشی از آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز به عنوان دومین خط دفاعی با تخریب پراکسیدهای سلولی از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند (۴۴). محققان دریافته‌اند که گنجاندن ویتامین E در جیره، اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره موجود در زرده تخم (۱۸) و گوشت غاز (۲۸) را محدود می‌کند. مکمل‌سازی سلنیوم در جیره غلظت سلنیوم در تخم را افزایش داده و موجب حفظ بیشتر کیفیت داخلی تخم در دوره‌های مختلف نگهداری می‌شود (۴۰). منابع محدودی در خصوص تأثیر توأم منابع آلی و معدنی سلنیوم به همراه ویتامین E، بر عملکرد بلدرچین وجود دارد. با توجه به روند افزایشی پرورش بلدرچین و تقاضای مصرف‌کنندگان نسبت به محصولات این پرند این آزمایش با هدف بررسی تأثیر منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E، بر عملکرد، کیفیت تخم بلدرچین، سیستم ایمنی و برخی فراسنجه‌های خونی، انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۱۴۴ قطعه بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار در سن ۶ هفته‌گی بر اساس وزن بدن و تولید تقریباً یکسان انتخاب، و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار، ۴ تکرار و ۱۲ پرند در هر تکرار به مدت ۸ هفته مورد بررسی قرار گرفتند. جیره‌های آزمایشی شامل ۱- شاهد (بدون افزودنی)، ۲- سلنیت سدیم به میزان ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم به همراه ۱۲۰ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره غذایی و ۳- سلپلکس به میزان ۰/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم به همراه ۱۲۰ میلی‌گرم ویتامین E در کیلوگرم جیره غذایی بود. جیره آزمایشی بر اساس نیازهای تغذیه‌ای بلدرچین ژاپنی توصیه شده توسط انجمن ملی

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره غذایی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار

Table 1- Ingredients and composition of laying Japanese quail diet

اجزاء	درصد	ترکیبات شیمیایی جیره	
Ingredients	Percent	Diet Chemical composition	
ذرت	58.9	انرژی متابولیسمی (کیلوکالری/کیلوگرم)	2900
Corn		Metabolizable energy (kcal/kg)	
کنجاله سویا	30	پروتئین خام (درصد)	18
Soybean meal		Crude Protein (%)	
روغن سویا	3.2	کلسیم (درصد)	2.5
Soybean oil		Calcium (%)	
دی کلسیم فسفات	1.2	فسفر قابل دسترس (درصد)	0.6
DCP		Available phosphorus (%)	
کربنات کلسیم	5.7	سدیم (درصد)	0.15
Calcium carbonate		Sodium (%)	
متیونین	0.2	لیزین (درصد)	1.08
Methionine		Lysine (%)	
نمک	0.2	متیونین (درصد)	0.47
Common salt		Methionine (%)	
بی کربنات سدیم	0.1	متیونین + سیستین (درصد)	0.74
NaHCO ₃		Methionine + Cysteine (%)	
مکمل ویتامینی ^۱	0.25		
Vitamin supplement ¹			
مکمل معدنی ^۲	0.25		
Mineral supplement ²			

^۱ در هر کیلوگرم جیره تامین می‌کند: رتینول ۹۰۰۰ واحد بین المللی، کوله‌کلسیفرول ۲۰۰۰ واحد بین المللی، آلفاتوکوفرول ۱۸ واحد بین المللی، منادیون ۲ میلی‌گرم، تیامین ۱/۸ میلی‌گرم، ریبوفلاوین ۶/۱۵ میلی‌گرم، نیکوتینیک اسید ۳۰ میلی‌گرم، پانتوتینیک اسید ۱۰ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۳ میلی‌گرم، بیوتین ۱/۱ میلی‌گرم، اسید فولیک ۱ میلی‌گرم و کوبالامین ۰/۰۱۵ میلی‌گرم.

^۱ Provided in kg of diet: Retinol 9000 IU, Cholecalciferol 2000 IU, Alpha tocopherol 18 IU, Menadione 2 Mg, Thiamine 1.8 Mg, Riboflavin 6.15 Mg, Niacin 30 Mg, Pantothenic acid 10 Mg, Pyridoxine 3 Mg, Biotin 0.1 Mg, Folic acid 1 Mg, Cobalamin 0.015 Mg.

^۲ در هر کیلوگرم جیره تامین می‌کند: یدید پتاسیم: ۰/۷۶ میلی‌گرم، مس (سولفات مس): ۶/۳۶ میلی‌گرم، آهن (سولفات آهن): ۲۵/۱۲ میلی‌گرم، سلنیوم (سلنیت سدیم): ۰/۱ میلی‌گرم، منگنز (سولفات منگنز): ۲۵/۵۰ میلی‌گرم.

^۲ Provided in kg of diet: Iodine (KI), 0.76 mg; Copper (Copper sulfate), 6.36 mg; Iron (Iron sulfate), 25.12 mg; Selenium (Sodium selenite), 0.1 mg; Manganese (Manganese sulfate) 32.50 mg.

مختلف میزان پراکسیداسیون چربی‌های زرده اندازه‌گیری شد. برای این منظور از روش ارائه شده توسط فاستمن و همکاران (۱۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. آزمایش تیوباربیتوریک اسید بر اساس مقدار جذب نوری کمپلکس صورتی رنگ حاصل از واکنش یک مولکول مالونیل دی آلدئید (محصول اصلی تجزیه هیدروکسیدهای چربی) با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید استوار است، به بدین منظور ۲ گرم نمونه زرده همگن شده با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد و ۴ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۳۰ ثانیه به وسیله دستگاه هموژنایزر مدل (IKA T-25) هموژنیزه گردید، سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل (UNIVERSAL HITECH-320R) به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. از محلول حاصل، ۲ میلی لیتر برداشته شد و با ۲ میلی لیتر ۲-

به منظور بررسی تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان تحریک سیستم ایمنی سلولی در هفته آخر دوره پرورش، تعداد ۲ پرنده از هر واحد آزمایشی انتخاب و محلول فیتوهمگلوتنین به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر توسط سرنگ انسولین به پرده پای چپ بلدرچین‌ها تزریق شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سالین به عنوان شاهد به پرده پای راست پرندگان آزمایشی تزریق گردید. در زمان‌های ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق، پاسخ حساسیت پوست توسط یک کویس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی اثر افزودن منابع مختلف سلنیوم و ویتامین E بر میزان تکثیر لنفوسیت‌های T در سیستم ایمنی سلولی، اختلاف ضخامت پای چپ، قبل و بعد از تزریق به عنوان معیار سنجش در نظر گرفته شد. میانگین اختلاف ایجاد شده، به عنوان شاخص تحریک در نظر گرفته شد (۲۷). همچنین در پایان دوره نگهداری تخم بلدرچین به مدت ۳۰ روزه در شرایط دمایی

تیوباریتوریک اسید ۰/۰۲ مولار ترکیب گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حمام آبی قرار گرفته و پس از خروج از حمام آبی و سرد شدن محلول، توسط دستگاه اسپکتوفتومتری مدل (JENWAY-6405) در طول موج ۵۳۲ نانومتر، میزان مالونیل دی آلدید قرائت گردید.

در این مطالعه برای تجزیه و تحلیل داده ها از طرح کاملاً تصادفی و رویه GLM نسخه ۹ نرم افزار SAS (۳۹) استفاده شد. میانگین تیمارهای آزمایشی به روش آزمون دانکن در سطح آماری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. مدل آماری طرح به صورت رابطه ۸ است.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad \text{رابطه ۸}$$

که در آن μ = میانگین کل صفت، T_i = اثر تیمار آزمایشی i و e_{ij} = اثر تصادفی اشتباه آزمایشی می باشد

نتایج و بحث

تأثیر افزودن منابع آلی و معدنی سلنیوم به همراه ویتامین E در جیره غذایی بر عملکرد بلدرچین های ژاپنی تخمگذار در کل دوره آزمایشی در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان داد میانگین وزن تخم، درصد تولید تخم و ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با گروه کنترل تحت تأثیر منابع سلنیوم آلی و معدنی قرار نگرفت ($p > 0.05$). عدم تأثیرگذاری منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر صفات

عملکرد وزن تخم، درصد تولید تخم و ضریب تبدیل غذایی با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد (۱، ۳۳ و ۴۰). مقادیر مشابهی از ویتامین E و سلنیوم در جیره مرغ های تخمگذار مادر اثر قابل توجهی بر میزان تخمگذاری در طی ۲۵ هفته اعمال جیره نداشت (۴۶). همچنین در مطالعه دیگر نیز با افزودن سطوح مختلف ویتامین E در جیره تأثیر قابل توجهی را بر میزان درصد تخمگذاری گزارش نکردند (۴۲). بر خلاف نتایج بدست آمده در این مطالعه، نتایج تحقیقات برخی محققین نشان می دهد افزودن ۰/۳ میلی گرم سلنیوم آلی در کیلوگرم جیره غذایی سبب افزایش وزن تخم مرغ می شود (۳۱). مکمل سازی جیره غذایی با سلنیوم معدنی به همراه ویتامین E در مقایسه با گروه کنترل و سلنیوم آلی به همراه ویتامین E سبب بهبود وزن توده تخم در کل دوره آزمایش شد ($p < 0.05$) ولی از لحاظ دیگر صفات عملکردی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت که با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد (۷ و ۲۳). پرندگان دریافت کننده جیره غذایی حاوی سلنیوم آلی به همراه ویتامین E در مقایسه با سایر تیمارها سبب کاهش مصرف خوراک شد ($p < 0.05$) و ضریب تبدیل غذایی تنها از نظر عددی کاهش و تمایل به معنی داری داشت ($p < 0.05$). به طور مشابه در مطالعه ای با افزایش سلنیوم در جیره غذایی جوجه گوشتی مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی کاهش داشت (۱۳).

جدول ۲- اثر مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر خصوصیات عملکردی بلدرچین ژاپنی تخمگذار (۸-۱۶ هفته)

Table 2- Effect of diet supplementation with different sources of selenium plus vitamin E on the performance characteristics of Japanese quail (8-16wk)

صفات عملکرد ^۱ Performance ¹ characteristics	جیره های آزمایشی Experimental diets			SEM	P-value
	Control	SS*	Sel-plex**		
مصرف خوراک (پرنده/روز/گرم) Feed intake (g/b/d)	30.67 ^a	30.67 ^a	27.35 ^b	0.8482	0.03
میانگین وزن تخم (گرم) Egg Weight (g)	12.54	13.23	12.92	0.2049	0.10
درصد تخمگذاری Egg production (%)	81.25 ^{ab}	89.86 ^a	79.07 ^b	2.7630	0.04
گرم تخم تولیدی (پرنده/روز/گرم) Egg mass (g/b/d)	10.19 ^b	11.82 ^a	10.21 ^b	0.3910	0.02
ضریب تبدیل غذایی Feed conversion ratio	3.04	2.59	2.67	0.1401	0.10

^۱در هر ردیف، میانگین هایی دارای حروف متفاوت از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

* شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلنات سدیم در کیلوگرم جیره غذایی.

** شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلپلکس در کیلوگرم جیره غذایی.

¹Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

*Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet sodium selenite.

**Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet Sel-plex.

پوسته در گروه سلنیوم معدنی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد ($p < 0.05$). نتایج این آزمایش در رابطه با بهبود ارتفاع سفیده و واحد هاو با نتایج سایر محققان مطابقت داشت (۴ و ۹). سایر صفات کیفی تخم، از جمله شاخص شکل، وزن مخصوص، درصد سفیده، زرده و پوسته، استحکام و ضخامت پوسته تخم بلدرچین در سن ۲۸ هفتگی تحت تأثیر منابع مختلف سلنیوم قرار نگررفت ($p > 0.05$). بر خلاف برخی نتایج این آزمایش برخی محققان گزارش کردند، افزودن سلنیوم توام با ویتامین E به ترتیب به میزان ۰/۳ و ۱۵۰ میلی گرم به جیره غذایی بلدرچین تخم‌گذار تأثیری بر کیفیت تخم نداشت (۱۲ و ۳۷). همچنین تغذیه مرغان مادر گوشتی با سلنیوم آلی به همراه اسید چربی غیر اشباع تأثیری بر استحکام پوسته، pH، سفیده، وزن سفیده و پوسته تخم مرغ نشان نداد (۳۰). ارتفاع سفیده و واحد هاو از جمله شاخص‌های اصلی کیفیت تخم پرندگان می‌باشد. واحد هاو از طریق اندازه‌گیری ارتفاع سفیده اطراف زرده و وزن تخم مرغ محاسبه می‌شود. نتایج این آزمایش حاکی از آن است که منبع آلی سلنیوم (سلپلکس) در جیره غذایی بلدرچین‌های ژاپنی سبب افزایش معنی دار بیشتری در ارتفاع سفیده و واحد هاو در مقایسه با منبع معدنی سلنیوم و گروه شاهد شد ($p < 0.05$).

با توجه به نقش سلنیوم در افزایش متابولیسم هورمون‌های تیرویدی کارکرد آن در رشد و نمو طبیعی بدن حائز اهمیت است (۵). بنابراین فعال سازی هورمون تیرویدی به واسطه افزایش سلنیوم بدن می‌تواند دلیل احتمالی کاهش میزان مصرف خوراک و تمایل به معنی داری ضریب تبدیل غذایی باشد (۱۳). سلنیوم و ویتامین E از عوامل مهم ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن هستند بنابراین احتمالاً نبود استرس در شرایط انجام این آزمایش دلیل عدم تغییر در صفات عملکردی و میزان میانگین وزن تخم و ضریب تبدیل غذایی است بطوریکه در آزمایشی افزودن ویتامین E به میزان ۲۰، ۶۰ و ۱۲۰ واحد بین‌المللی در خوراک مرغ تخم‌گذار تحت تنش گرمای موجب بهبود مصرف خوراک شده است (۲۳). در تحقیق دیگر افزودن ۶۰ میلی گرم ویتامین E در جیره مرغ تخم‌گذار تحت تنش گرمای ۳۴ درجه سانتیگراد سبب حفظ تولید آن‌ها در مقایسه با دمای ۲۱ درجه سانتیگراد شد (۲۳).

اثر منابع آلی و معدنی سلنیوم بر خصوصیات کیفی تخم در کل دوره آزمایش در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. افزودن سلنیوم آلی در جیره سبب بهبود ارتفاع سفیده، واحد هاو، pH زرده و شاخص زرده در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0.05$). از لحاظ صفات کیفی تخم تنها شاخص زرده و سطح

جدول ۳- اثر مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر درصد زرده، سفیده و پوسته، رنگ و شاخص زرده، pH زرده و سفیده تخم بلدرچین ژاپنی
Table 3- Effect of diet supplemented with different sources of selenium plus vitamin E on the percentage of yolk, albumen and shell, yolk index and yolk and albumen pH in Japanese quail eggs

Qualitative characteristics	Experimental diets			SEM	P-value
	control	SS*	Sel-plex**		
شاخص زرده	0.4420 ^b	0.5060 ^a	0.5107 ^a	0.0101	0.0016
Yolk index					
رنگ زرده (رش)	4.87	5.04	5.00	0.0651	0.2245
Yolk color (Rosh)					
pH زرده	6.02 ^b	6.01 ^b	6.06 ^a	0.0116	0.0342
Yolk pH					
pH سفیده	9.07 ^{ab}	8.97 ^b	9.12 ^a	0.0413	0.0765
Albumen pH					
درصد زرده	31.74	31.58	31.79	0.6606	0.9732
Yolk percentage					
درصد سفیده	60.67	60.73	60.44	0.9564	0.7177
Albumen percentage					
درصد پوسته	7.58	7.67	7.75	0.1542	0.7433
Shell percentage					

^aدر هر ردیف، میانگین‌هایی دارای حروف متفاوت از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

* شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سولفات سدیم در کیلوگرم جیره غذایی

** شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلپلکس در کیلوگرم جیره غذایی

¹Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

*Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet sodium selenite.

** Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet Sel-plex

جدول ۴- اثر مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر خصوصیات کیفی سفیده و پوسته و شاخص شکل تخم بلدرچین ژاپنی
Table 4- Effect of diet supplemented with different sources of selenium plus vitamin E on the qualitative characteristics of albumen and shell and shape index in Japanese quail eggs

خصوصیات کیفی Qualitative characteristics	جیره‌های آزمایشی Experimental diets			SEM	P-value
	control	SS*	Sel-plex**		
ارتفاع سفیده (میلی متر) Albumen height (mm)	4.05 ^b	4.32 ^{ab}	4.64 ^a	0.1223	0.0244
واحد هاو Haugh unit	86.06 ^b	87.20 ^{ab}	89.59 ^a	0.7801	0.0299
نسبت زرده به سفیده Yolk / Albumen	0.5230	0.5200	0.5277	0.0171	0.9497
وزن مخصوص (گرم بر سانتی متر مکعب) Egg specific Weight (g/cm ³)	1.0732	1.0732	1.0740	0.0007	0.7382
ضخامت پوسته (میلی متر) Shell thickness (mm)	0.2010	0.2120	0.2100	0.0042	0.2014
استحکام پوسته (گرم در سانتی متر مربع) Shell Strength (g/cm ²)	19.06	19.29	19.49	0.3878	0.7431
سطح پوسته (سانتی متر مربع) Shell surface (cm ²)	50.77 ^b	53.53 ^a	50.14 ^b	0.6634	0.0125
شاخص شکل تخم Egg shape index	77.72	78.97	78.33	0.6980	0.4791

^aدر هر ردیف، میانگین‌هایی دارای حروف متفاوت از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

* شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلنات سدیم در کیلوگرم جیره غذایی

** شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلپلکس در کیلوگرم جیره غذایی

¹Means within same row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

*Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet sodium selenite.
 plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet Sel-plex Control **

سلنیوم آلی (۲/۰۶) در مقایسه با گروه شاهد (۰/۳۶۳) و سلنیوم معدنی (۱/۳۱) مشاهده شد ($p < 0.01$). تحقیقات نشان داد افزودن منابع مختلف سلنیوم (۰/۴ میلی گرم سلنیت سدیم، ۰/۴ میلی گرم در کیلوگرم سلپلکس) به همراه ویتامین E در جیره بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار، موجب افزایش بیشتر میزان سلنیوم در زرده و سفیده تخم شده و جیره حاوی سلپلکس بیشترین ابقاء سلنیوم را در تخم به خود اختصاص داده است (۲۴). همچنین محققان در مطالعه دیگری با افزودن سطوح مختلفی از سلنیت سدیم و سلپلکس به جیره مرغ‌های تخم‌گذار، ابقاء سلنیوم بیشتر در تخم را در همه تیمارهای حاوی سلنیوم در مقایسه با گروه شاهد گزارش کرده‌اند (۱). به نظر می‌رسد دلیل افزایش میزان سلنیوم در زرده تخم بلدرچین‌های تغذیه شده با سلپلکس، فرایند جذب روده‌ای منابع آلی سلنیوم باشد. برخی محققان معتقدند که فرایند جذب سلنیوم آلی مشابه فرایند جذب متیونین در روده بوده و به شکل فعال جذب می‌شوند و به طور موثرتری در ساختمان پروتئین‌ها شرکت کرده و بدون واسطه وارد پروتئین تخم می‌شوند. این در حالی است که منابع معدنی سلنیوم به طور غیر فعال در بدن جذب شده و مقادیر اضافی آن‌ها دفع می‌گردد (۴۴ و ۴۷).

مشابه نتایج آزمایش حاضر افزودن سلنیوم آلی به میزان ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم سبب بهبود کیفیت سفیده و پوسته تخم مرغ شده است (۳۱). سلنیوم احتمالاً با تأثیر بر افزایش غلظت کلسیم در پلاسما و بهبود عملکرد غدد پوسته ساز، موجب بهبود خصوصیات کیفی پوسته می‌شود. در زمان اوج تولید تخم مرغ و پس از آن مقدار اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک در زرده تخم مرغ به طور طبیعی زیاد می‌شود. این اسید چرب دارای چند باند دوگانه است و اکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌ها را به دنبال خواهد داشت که این عمل باعث کاهش واحد هاو می‌شود. ویتامین E با حذف یا تبدیل رادیکال‌های پراکسید اسیدهای چرب به هیدروکسیدهای کم خطرتر، واکنش‌های پراکسیداسیون را کاهش داده و در نتیجه به بهبود واحد هاو کمک می‌کند (۳۰).

تأثیر منابع مختلف سلنیوم و ویتامین E در جیره بر میزان غلظت سلنیوم زرده تخم بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار در جدول ۵ آمده است. تجزیه داده‌ها نشان داد، افزودن منابع آلی و معدنی سلنیوم به جیره موجب افزایش معنی‌دار غلظت سلنیوم در زرده نسبت به گروه شاهد گردید ($p < 0.01$). بیشترین میزان افزایش سلنیوم زرده در گروه

سلنیوم آلی بود ($p < 0.01$). همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان غلظت مالونیل‌دی‌آلدهید زرده بین منابع آلی و معدنی سلنیوم وجود داشت ($p > 0.05$). میزان مالونیل‌دی‌آلدهید زرده نگهداری شده در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد در مقایسه با دمای ۵ درجه تقریباً دو برابر بود و میزان اکسیداسیون چربی زرده تحت تأثیر منفی با دمای نگهداری قرار گرفت.

اثر افزودن منابع سلنیوم آلی و معدنی به جیره بر شاخص اکسیداسیون چربی یا میزان مالونیل‌دی‌آلدهید زرده تخم نگهداری شده در شرایط دمایی مختلف در جدول ۵ نشان داده شده است. مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه سطح بالای ویتامین E (۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم) سبب کاهش غلظت مالونیل‌دی‌آلدهید زرده تخم‌های بلدرچین نگهداری شده به مدت ۳۰ روز در هر دو دمای ۵ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد، نسبت به گروه شاهد شد بطوریکه کمترین میزان غلظت مالونیل‌دی‌آلدهید مربوط به گروه

جدول ۵- اثر مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر مقدار پراکسیداسیون چربی و غلظت سلنیوم زرده تخم بلدرچین ژاپنی در مدت ۳۰ روز انبارداری در شرایط دمایی مختلف

Table 5- Effect of diet supplemented with different sources of selenium plus vitamin E in different storage temperature for 30 days on the amount of fat peroxidation and selenium concentration in egg yolk of Japanese quail.

جیره‌های آزمایشی Experimental diets	غلظت مالونیل دی آلدهید زرده (میلی گرم در گرم) Yolk malondialdehyde concentrations (mg/g)		غلظت سلنیوم زرده (میلی گرم در کیلوگرم) Yolk selenium concentration (mg/kg)
	نگهداری در (۳۰ روز - ۵°C)	نگهداری در (۳۰ روز - ۲۲°C)	
	Stored at (5°C - 30 d)	Stored at (22°C - 30 d)	
شاهد Control	0.1807 ^a	0.2833 ^a	0.3630 ^c
سلنیت سدیم* Sodium selenite*	0.0663 ^b	0.1473 ^b	1.3100 ^b
سلپلکس** Sel-plex*	0.0443 ^c	0.0856 ^c	2.0645 ^a
سطح احتمال P-value	0.0001	0.0001	0.0001
معیار اشتباه آزمایشی SEM	0.0022	0.0084	0.653

^aدر هر ستون، میانگین‌هایی دارای حروف متفاوت از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

* شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلنات سدیم در کیلوگرم جیره غذایی

** شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلپلکس در کیلوگرم جیره غذایی

¹Means within same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

*Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet sodium selenite.

** Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet Sel-plex

چربی‌های زرده تخم مرغ‌های نگهداری شده به مدت ۶ ماه شده است (۱۸).

نتایج افزودن منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر متابولیت‌های خونی در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان داد منبع آلی سلنیوم به همراه ویتامین E سبب افزایش معنی دار شاخص آنتی اکسیدانی خون نسبت به گروه شاهد شد ($p < 0.05$). منبع معدنی سلنیوم به همراه ویتامین E تنها از لحاظ عددی شاخص آنتی اکسیدانی خون را افزایش و تفاوت بین منابع سلنیوم معنی دار نشد. مشابه نتایج آزمایش حاضر، افزودن ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ویتامین E به همراه ۰/۳ میلی گرم سلنیوم آلی در جیره بلدرچین

محققین گزارش کردند که افزودنی سلنیوم و ویتامین E به صورت توأم سبب افزایش ثبات اکسیداتیو چربی‌های زرده تخم مرغ می‌شود که با نتایج گزارش حاضر مطابقت دارد (۱۷ و ۳۲). تعادل بین سلنیوم و ویتامین E موجب افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز شده و ویتامین E به عنوان یک ویتامین محلول در چربی از اکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی جلوگیری کرده و موجب کاهش حساسیت اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره زرده به فساد اکسیداتیو در دوره نگهداری شده است (۲۹، ۴۰ و ۴۳). هر چند بر خلاف نتایج این آزمایش، در تحقیقی افزودن ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم آلفا توکوفرل استات در جیره غذایی سبب افزایش میزان پروکسیداسیون

نداشت ($p > 0.05$) و مقدار آن‌ها را تنها از لحاظ عددی افزایش داد. بر خلاف نتایج آزمایش حاضر افزودن سطوح مختلف ویتامین E و سلنیوم موجب افزایش تری‌گلیسرید خون بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار شده است (۱). برخی محققان بر این عقیده‌اند که کاهش VLDL، کلسترول و تری‌گلیسرید در موش‌های صحرایی به دنبال سطوح تغذیه ای سلنیوم، حاصل افزایش احتمالی فعالیت فسفولیپید هیدروپروکسید گلوکوتائون پرواکسیداز در احیای هیدروپروکسیدهای اسیدهای چرب و کلسترول در غشای LDL می‌باشد (۳۴).

ژاپنی، موجب افزایش آنتی اکسیدان کل خون شده است (۳۸). اما در بررسی دیگری، افزودن ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی یا معدنی، اثر معنی‌داری بر افزایش فعالیت گلوکوتائون پرواکسیداز سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار نداشته است (۱۱). دلیل افزایش آنتی اکسیدان کل به واسطه افزودن سلنیوم در جیره را ابقاء بیشتر ویتامین E در پلاسما و کاهش هیدروپروکسیدازها و افزایش آنزیم گلوکوتائون پرواکسیداز مربوط می‌دانند (۲۵). همچنین سلنیوم بخش جدایی ناپذیر آنزیم گلوکوتائون پرواکسیداز می‌باشد و به همراه ویتامین E سلول‌ها را اکسیداسیون محافظت می‌کند.

تیمارهای آزمایشی تأثیری بر کلسترول و تری گلیسرید خون

جدول ۶ - تأثیر مکمل سازی جیره با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E بر پاسخ سیستم ایمنی سلولی و متابولیت‌های خونی بلدرچین ژاپنی تخم‌گذار
Table 6- Effect of diet supplemented with different sources of selenium plus vitamin E on the cellular immune response and blood metabolites of Japanese quail.

جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets ¹	متابولیت‌های خونی Blood metabolites			پاسخ سیستم ایمنی سلولی (میلی متر) Cellular immune response (mm)		
	کلسترول کل (میلی گرم/دسی لیتر) Total cholesterol (mg/dl)	تری گلیسرید (میلی گرم/دسی لیتر) Total triglyceride (mg/dl)	آنتی اکسیدان (میلی مول) Antioxidants (mmol)	۸ ساعت 8 (h)	۲۴ ساعت 24 (h)	۴۸ ساعت 48 (h)
شاهد Control	163.09	647.4	0.4566 ^b	0.4167	0.3833 ^b	0.3917
سلنیت سدیم [*] Sodium selenite	215.33	1101.0	0.5666 ^b	0.3667	0.5750 ^{ab}	0.2750
سلپلکس ^{**} Sel-plex	181.67	1080.0	1.1167 ^a	0.4250	0.7333 ^a	0.4083
سطح احتمال P-value	0.09	0.14	0.0001	0.8543	0.0680	0.5305
معیار اشتباه آزمایشی SEM	13.885	155.02	0.0336	0.0092	0.0727	0.0748

^۱ در هر ستون، میانگین‌هایی دارای حروف متفاوت از نظر آماری دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$).

^{*} شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلنات سدیم در کیلوگرم جیره غذایی

^{**} شاهد + ۱۲۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۴ میلی گرم سلنیوم از منبع سلپلکس در کیلوگرم جیره غذایی

^۱ Means within same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

^{*} Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet sodium selenite.

^{**} Control plus 120 mg/kg of diet vitamin E and 0.4 mg/kg of diet Sel-plex

آزمایشی مکمل شده با منابع مختلف سلنیوم به همراه ویتامین E با گروه شاهد معنی دار نشد اما پاسخ ایمنی در اثر افزودن سلنیوم تمایل به بهبودی داشت ($p = 0.068$). پاسخ ایمنی در زمان ۴۸ ساعت پس از تزریق معنی دار نشد ($p > 0.05$). به طور مشابه در برخی تحقیقات

تأثیر گنجاندن منابع آلی و معدنی سلنیوم به همراه ویتامین E در جیره بر پاسخ سیستم ایمنی سلولی بلدرچین‌های ژاپنی تخم‌گذار در جدول ۶ آورده شده است. تجزیه داده‌ها نشان داد در زمان ۲۴ ساعت پس از تزریق فیتوهماتوگلوبینین اگر چه اختلاف بین گروه‌های

افزایش واکنش لنفوسیت‌ها به تحریک آنتی ژن می‌گردد. این مکانیسم به شدت با افزایش تعداد گیرنده‌های اینترلوکین ۲ بر روی سطح لنفوسیت‌ها در ارتباط است و برای تکثیر و تمایز سلول‌های سیتوتوکسیک حیاتی است (۶ و ۳۶). همچنین ویتامین E، سیستم ایمنی بدن را با تحریک فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها در نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای جریان خون تقویت و با تحریک فعالیت لنفوسیت‌های T و فعالیت بیگانه‌خواری و تولید آنتی‌بادی‌ها بر علیه عوامل مختلف را افزایش می‌دهد.

به طور کلی نتایج آزمایش حاضر نشان داد افزودن منابع آلی و معدنی سلنیوم به همراه ویتامین E در جیره غذایی پرندگان آزمایشی تأثیری بر صفات عملکرد نداشت اما افزایش انتقال سلنیوم در زرده تخم بلدرچین و بهبود برخی خصوصیات کیفی تخم بلدرچین را به همراه داشت. همچنین تغذیه سلنیوم آلی و معدنی به همراه ویتامین E سبب بهبود اکسیداسیون چربی زرده در طول دوره نگهداری شد.

با افزودن سطوح ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، اثر معنی‌داری را در پاسخ سیستم ایمنی دریافت نشده است (۲۶ و ۳۵). در مطالعه دیگری، که اثرات سطوح مختلف سلنیوم (۰، ۵/۰ و ۱۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر سیستم ایمنی بلدرچین‌های ژاپنی مورد بررسی قرار گرفته، جوجه‌های دریافت‌کننده جیره حاوی ۱۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم سلنیوم، بالاترین تیتراژ آنتی‌بادی علیه SRBC را نشان داده‌اند (۱۰). همچنین افزودن سطوح متفاوت ویتامین E به جیره مرغ مادر، موجب افزایش معنی‌داری در پاسخ سیستم ایمنی سلولی و هومورال شده و جیره حاوی بالاترین سطح ویتامین E پاسخ ایمنی بالاتری را نشان داد (۲۵). در بررسی مشابه دیگری، جیره غذایی حاوی ۳/۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم، اثر معنی‌داری بر افزایش ایمنی هومورال را در مرغ گوشتی به همراه داشته است (۴۸). با توجه به نتایج تحقیقات دیگر محققان و آزمایش حاضر مبنی بر تمایل به بهبودی پاسخ ایمنی در پرندگان تغذیه‌شده با مکمل سلنیوم به نظر می‌رسد که سلنیوم محرک سیستم ایمنی و تکثیر لنفوسیت‌های T بوده (۳۶) و سبب

منابع

1. Abbaszadeh Mobaraki, M., and H. Aghdam Shahryar. 2015. The impact of different levels of vitamin E and selenium on the performance, quality and the hatchability of eggs from breeding Japanese quails. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5: 927-932.
2. Ahmadian, H., Z. Nemati, A. Karimi, and R. Safari. 2019. Effect of different dietary selenium sources and storage temperature on enhancing the shelf life of quail eggs. *Animal Production Research*, 8: 23-33. (In Persian).
3. Ahmadi, F., and F. Rahimi. 2011. Factors affecting quality and quantity of egg production in laying hens: a review. *World Applied Sciences Journal*, 12: 372-384.
4. Arpasova, H., J. Weis, P. Hascik, and M. Kacaniova. 2009. The effects of sodium selenite and selenized yeast supplementation into diet for laying hens on selected qualitative parameters of table eggs. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 42: 408-414.
5. Arthur, J. 1992. Selenium metabolism and function. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. 17: 91-8.
6. Arthur, J. R., R. C. McKenzie, and G. J. Beckett. 2003. Selenium in the immune system. *The Journal of Nutrition*, 133: 1457S-1459S.
7. Attia, Y., A. Abdalah, H. Zeweil, F. Bovera, A. T. El-Din, and M. Araft. 2010. Effect of inorganic or organic selenium supplementation on productive performance, egg quality and some physiological traits of dual-purpose breeding hens. *Czech Journal of Animal Science*, 55: 505-519.
8. Bennett, D. C., and K. Cheng. 2010. Selenium enrichment of table eggs. *Poultry Science*, 89: 2166-2172.
9. Biswas, A., M. Ahmed, V. Bharti, and S. Singh. 2010. Effect of antioxidants on physiobiochemical and hematological parameters in broiler chicken at high altitude. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 24: 246-249.
10. Biswas, A., J. Mohan, and K. Sastry. 2006. Effect of higher levels of dietary selenium on production performance and immune responses in growing Japanese quail. *British Poultry Science*, 47: 511-515.
11. Cantor, A., M. Straw, M. Ford, A. Pescatore, and M. Dunlap. 2000. Effect of feeding organic selenium in diets of laying hens on egg selenium content. *Egg Nutrition and Biotechnology*. JS Sim, S. Nakai, and W. Guenter, ed. CABI Publishing, New York, NY, 473.
12. Chitra, P., S. Edwin, and M. Moorthy. 2013. Dietary inclusion of vitamin E and selenium on egg production, egg quality and economics of Japanese quail layers. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 9: 51-60.
13. Choct, M., A. Naylor, and N. Reinke. 2004. Selenium supplementation affects broiler growth performance, meat yield and feather coverage. *British Poultry Science*, 45: 677-683.

14. Council, N. R. 1994. Nutrient requirements of poultry. Washington, DC, National Academic Press, 42: 57-63.
15. Faustman, C., S. Specht, L. Malkus, and D. Kinsman. 1992. Pigment oxidation in ground veal: Influence of lipid oxidation, iron and zinc. *Meat Science*, 31: 351-362.
16. Gajcevic, Z., G. Kralik, E. Has-Schon, and V. Pavic. 2009. Effects of organic selenium supplemented to layer diet on table egg freshness and selenium content. *Italian Journal of Animal Science*, 8: 189-199.
17. Galobart, J., A. Barroeta, M. Baucells, R. Codony, and W. Ternes. 2001. Effect of dietary supplementation with rosemary extract and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in eggs enriched with ω 3-fatty acids. *Poultry Science*, 80: 460-467.
18. Gebert, S., R. Messikommer, H. Pfirter, G. Bee, and C. Wenk. 1998. Dietary fats and vitamin E in diets for laying hens: Effects on laying performance, storage stability and fatty acid composition of eggs. *Archiv fuer Gefluegelkunde*, 62: 214-222.
19. Haugh, R. 1937. The Haugh unit for measuring egg quality. *United States Egg Poultry Magazine*, 43: 522-555.
20. Heindl, J., Z. Ledvinka, E. Tumova, and L. Zita. 2010. The importance, utilization and sources of selenium for poultry: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41: 55-64.
21. Hidirolou, N., G. S. Gilani, L. Long, X. Zhao, R. Madere, K. Cockell, B. Belonge, W. N. Ratnayake, and R. Peace. 2004. The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 730-740.
22. Idowu, O., T. Laniyan, O. Kuye, V. Oladele Ojo, and D. Erubetina. 2006. Effect of copper salts on performance, cholesterol, residues in liver, eggs and excreta of laying hens. *Archivos de Zootechnia*, 55: 327-338.
23. Kirunda, D., and S. Scheideler. 2001. The efficacy of vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. *Poultry Science*, 80: 1378-1383.
24. Kralik, G., Z. Gajcevic, P. Suchy, E. Strakova, and D. Hanzek. 2009. Effects of dietary selenium source and storage on internal quality of eggs. *Acta Veterinaria Brno*, 78: 219-222.
25. Lin, Y.F., H. L. Tsai, Y.C. Lee, and S. J. Chang. 2005. Maternal vitamin E supplementation affects the antioxidant capability and oxidative status of hatching chicks. *The Journal of Nutrition*, 135: 2457-2461.
26. Marsh, J. A., R. R. Dietert, and G. F. Combs Jr. 1981. Influence of dietary selenium and vitamin E on the humoral immune response of the chick. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 166: 228-236.
27. Martin, L. B., P. Han, J. Lewittes, J. R. Kuhlman, K. C. Klasing, and M. Wikelski. 2006. Phytohemagglutinin induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Functional Ecology*, 20: 290-299.
28. Nemati, Z., K. Alirezalu, M. Besharati, S. Amirdahri, D. Franco, and J.M. Lorenzo. 2020. Improving the quality characteristics and shelf life of meat and growth performance in goose fed diets supplemented with vitamin E. *Foods*, 9 (6): 798.
29. Nemati, Z., H. Ahmadian, M. Besharati, S. Lesson, K. Alirezalu, R. Domínguez, and J.M. Lorenzo. 2020. Assessment of dietary selenium and vitamin E on laying performance and quality parameters of fresh and stored eggs in Japanese quails. *Foods*, 9 (9): 1324.
30. Pappas, A. C., F. Karadas, P.F. Surai, and B.K. Speake. 2005. The selenium intake of the female chicken influences the selenium status of her progeny. *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 142: 465-474.
31. Payne, R., T. Lavergne, and L. Southern. 2005. Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poultry Science*, 84: 232-237.
32. Puthongsiriporn, U., S. Scheideler, J. Sell, and M. Beck. 2001. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poultry Science*, 80: 1190-1200.
33. Qi, G. H., and J. Sim. 1998. Natural tocopherol enrichment and its effect in ω 3-fatty acids modified chicken eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1920-1926.
34. Qu, X., K. Huang, L. Deng, and H. Xu. 2000. Selenium deficiency induced alterations in the vascular system of the rat. *Biological Trace Element Research*, 75: 119-128.
35. Qureshi, M., J. Petite, S. Laster, and R. Dietert. 1993. Avian macrophages: contribution to cellular microenvironment and changes in effector functions following activation. *Poultry Science*, 72: 1280-1284.
36. Rengaraj, D., and Y. Hong. 2015. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *International*

- Journal of Molecular Sciences, 16: 9910-9921.
37. Sahin, N., K. Sahin, and M. Onderci. 2003. Vitamin E and selenium supplementation to alleviate cold stress associated deterioration in egg quality and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails. *Biological Trace Element Research*, 96: 179-189.
38. Sarica, S., H. Aydın, and G. Ciftci. 2017. Effects of Dietary Supplementation of Some Antioxidants on Liver Antioxidant Status and Plasma Biochemistry Parameters of Heat-Stressed Quail. *Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*, 5: 773-779.
39. SAS Institute. 2009. SAS State Software. Changes and Enhancement Through Release, 8.2. SAS Institute, Inc., Cary, N.C.
40. Scheideler, S., P. Weber, and D. Monsalve. 2010. Supplemental vitamin E and selenium effects on egg production, egg quality, and egg deposition of α -tocopherol and selenium. *Journal of Applied Poultry Research*, 19: 354-360.
41. Serougne, C., C. Felgines, J. Férézou, T. Hajri, C. Bertin, and A. Mazur. 1995. Hypercholesterolemia induced by cholesterol or cystine enriched diets is characterized by different plasma lipoprotein and apolipoprotein concentrations in rats. *The Journal of Nutrition*, 125: 35-41.
42. Shahriar, H. A., M. Shivazad, M. Chamani, K. Adl, and Y. Abrahimnejad. 2008. Effects of dietary fat type and different levels of vitamin E on performance and some of eggs characters of broiler breeder. *Poultry Science*, p 91-91.
43. Skrivan, M., M. Marounek, G. Dlouha, and S. Sevcikova. 2008. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. *British Poultry Science*, 49: 482-486.
44. Surai, P. F. 2002a. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *World's Poultry Science Journal*, 58: 333-347.
45. Surai, P. F. 2002b. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press Nottingham.
46. Urso, U., F. Dahlke, A. Maiorka, I. Bueno, A. Schneider, D. Surek, and C. Rocha. 2015. Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: Effect on live performance, hatching process, and chick quality. *Poultry Science*, 94: 976-983.
47. Utterback, P., C. Parsons, I. Yoon, and J. Butler. 2005. Effect of supplementing selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. *Poultry Science*, 84: 1900-1901.
48. Vakili, R., and M. Bahram. 2010. Effects of different dietary levels of selenium on metabolic parameters and humoral immunity in broiler chickens. *Journal of Veterinary Research*, 65: 329-336.
49. Zadeh adamnejad, H., J. Ghiasi, and Y. Ebrahimnejad. 2015. Effect of different levels of selenium and vitamin E on blood biochemical parameters in the Japanese quail. *Veterinary Clinical Pathology*, 9: 243-252 (In Persian).



Effect of Selenium with Vitamin E on Production Performance, Immune Response and Blood Metabolites of Laying Japanese Quail

H. Ahmadian¹- Z. Nemati ^{2*}- A. Karimi³-R. Safari ³- M.R. Sheeikhlou³- M. Besharati³

Submitted: 09-08-2018

Accepted: 31-05-2020

Introduction: Selenium is an essential trace element, which plays a key role in the development of reproductive performance and animal safety. This mineral is an important part of at least 25 effective proteins in a variety of physiological functions, including increased resistance to oxidative stress, DNA repair, and improvement to reproductive performance and immune function. Despite the fact that selenium requirement of birds can be met by corn-soybean meal diet, dietary sodium selenite up to a maximum level of 0.5 mg kg⁻¹ is highly recommended to improve avian health and productive performance. However, interaction with other minerals, poor retention and lower deposition efficiency questioning the incorporation of sodium selenite into the diet. Vitamin E is the main antioxidant in egg yolk lipid terminating the lipid peroxidation chain by reacting with lipid peroxides and making them be stable. Diet supplementation with vitamin E could improve performance and egg quality and provided health benefits to laying hens. The positive effects of Se and vitamin E on egg production, egg quality traits has been extensively studied in laying hens, but information regarding the potential benefits of these antioxidants on the productive performance of Japanese quails is limited in literature. Thus, this study was conducted to investigate the combined effects of various sources of selenium (0.4 mg kg⁻¹) plus vitamin E (120 mg kg⁻¹) on performance, qualitative characteristics, immune system and blood metabolites of Japanese quails.

Materials and Methods: A total of 144 12-week-old female Japanese quails were randomly divided into three treatment groups with four replicates and twelve birds in each in a completely randomized design. The experimental treatments consisted of basal diet (with no supplementation) and two organic (sel-plex) and inorganic (sodium selenite) sources of selenium which provided 0.4 mg/kg, plus 120 mg of vitamin E per kilogram of diet. Feed intake, feed conversion ratio (FCR), egg production and quality parameters in fresh and stored eggs, cell immunity, blood cholesterol, triglyceride and total antioxidant contents were evaluated. At the end of experiment, egg yolk selenium and malondialdehyde concentrations were measured. The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay with small modification was used to measure lipid oxidation. Briefly, 2 grams of homogenous yolk was mixed with 5 mL of 20 % trichloroacetic acid (TCA) and 4 mL distilled water, and homogenized for 30 s at high speed. The homogenate was then centrifuged (1000 g for 20 min) and the resulting supernatant was filtered with Whatman Filter Paper (grade no. 1). Two mL of filtrate was mixed with 2 mL of thiobarbituric acid (TBA, 0.02 M) in a test tube and heated in boiling water for 20 min. After cooling, the absorbance of the resulting solution was read with a spectrophotometer at 532 nm.

Results and discussion: The results showed that egg weight, egg laying percentage and feed conversion rate were not affected by selenium organic and inorganic sources compared to control group ($P > 0.05$). Birds receiving organic selenium along with vitamin E in their diets had low feed intake compared to other treatments and their feed conversion ratio numerically decreased and intended to significant ($p < 0.1$). The organic selenium plus vitamin E improved the height of white, HU units, yolk pH, and yolk index compared to control group. Egg quality parameters including yolk

1- MSc graduate student, department of animal science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, I.R. Iran

2-Associate Prof., Department of Animal science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, I.R. Iran.

3- Assistant Prof., Department of Animal science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, I.R. Iran.

(*- Corresponding Author Email: znnemati@yahoo.com, znemati@tabrizu.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.74681

index and shell surf index in inorganic selenium group were significantly higher than control group ($p < 0.05$). Egg yolk selenium was increased in organic and organic selenium (2.06, 1.31 mg/kg) compared to control (0.36), which is a better value from the nutritional viewpoint. Blood cholesterol and triglyceride levels were not affected by experimental diets. Concentration of yolk MDA was highest in control and lowest in organic selenium group during storage ($P < 0.05$). The result of this study showed that egg production, feed conversion ratio and total egg mass were not affected by experimental treatments. This was also observed by other researchers who evaluated the dietary inclusion of vitamin E. In another one egg quality parameters, however, egg weight was significantly raised after being fed with a diet contained 120 mg kg⁻¹ of vitamin E and 0.4 mg kg⁻¹ of organic selenium.

Conclusion: In conclusion, our study data revealed dietary organic selenium and vitamin E, could improve the egg quality during storage and increased egg yolk selenium of Japanese quails.

Key words: Blood metabolites, egg quality, Japanese quail, sel-plex, sodium selenite.



مقاله علمی - پژوهشی

طراحی ساختار پروتئینی آنزیم رانپیرناز به عنوان ایمونوتوکسین براساس ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با استفاده از مطالعات دینامیک و استاتیک مولکولی

حمید آریان نژاد^۱ - محمدرضا نصیری^{۲*} - علی جوادمنش^۳ - شاهرخ قوتی^۴ - حسام دهقانی^۵ - احمد آسوده^۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۴

چکیده

ریبونوکلئازها خانواده تخریب کننده RNA هستند که در حال حاضر به شکل وسیعی به خدمت سلامت انسان آمده اند. ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی به عنوان قویترین و رانپیرناز به عنوان نفوذپذیر ترین ریبونوکلئاز به سلول پستانداران شناخته می شوند. پروتئین ویژه ممانعت کننده فعالیت ریبونوکلئازی^۷ (RI) و عدم توانایی نفوذ آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، مانع بزرگ استفاده از این ریبونوکلئاز، به منظور ساخت ایمونوتوکسین هاست. از اینرو در این مطالعه، با بررسی ویژگیهای پروتئینی ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، مسیر ویژه‌ای به منظور مهندسی آنزیم رانپیرناز با ویژگیهای همچون فرار از RI، افزایش نفوذپذیری و افزایش سمیت سلولی و پایداری آنزیم با توجه به ساختار ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی طراحی گردید. بدین منظور، ساختار سوم مربوط به پروتئین‌های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، رانپیرناز و ممانعت کننده فعالیت ریبونوکلئازی از سرور PDB استخراج و سپس با استفاده از سرور آنلاین ClusPro داکینگ صورت گرفت. پیوندهای N-O کمتر از ۳/۵ انگستروم بین آنزیم ها و RI با استفاده از نرم افزار PyMOL استخراج و در نهایت آمینواسیدهای کاندید شناسایی شدند. پس از طراحی آنزیم جهش یافته، بررسی اتصال آنزیم با RI توسط دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد رانپیرناز با ۴ جهش لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژینین و سرین ۷۲ به آلانین دارای سمیت سلولی بالاتر نسبت به آنزیم طبیعی بوده و همچنین با توجه به عدم اتصال در محیط دینامیک مولکولی قابلیت فرار از RI را دارد. این پروتئین براساس آنالیزهای RMSD، RMSF و شعاع ژراسیون به شکل کاملاً پایدار بوده و می تواند در تحقیقات تولید ایمونوتوکسین ها بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: رانپیرناز، ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی، محاسبات دینامیک مولکولی، مهارکننده ریبونوکلئازی

مقدمه

پانکراتیک گاوی به عنوان یکی از پروتئین‌های پایه در بیشتر تحقیقات حوزه بیوتکنولوژی به کار گرفته شده است (۶). ریبونوکلئازها (RNase) یکی از مهمترین توکسین های بیولوژیک هستند که وظیفه تخریب RNA در سطح رونویسی به عهده دارند (۱۶ و ۲۷). مولکول های RNA واسطه اصلی برای تبدیل کدون ها به آمینواسید و تنظیم کننده اصلی سلول ها هستند. امروزه، ما می دانیم که RNase ها در سلول های یوکاریوت / پروکاریوت و مایعات بیولوژیک حضور دارند و نقش بسیار مهمی در عملکردهای حیاتی بدن ایفا می کنند (۱۲). اثر سمیت سلولی RNase در سیتوزل ۱۰۰۰ برابر نسبت به سطح سلول بیشتر است (۶ و ۲۹). از اینرو، محققان با دو رویکرد اعضای این خانواده را به عنوان توکسین های هوشمند در مهندسی ایمونوتوکسین بکار می گیرند. RNase می تواند اثر سمیت برای سلول های سالم و سرطانی داشته باشند، بنابراین ایمونوتوکسین ها به هدف گیری صحیح سلول سرطانی کمک می کند (۱). هنگامیکه آنتی بادی به گیرنده ویژه متصل می شود، نفوذ سلولی RNase از

امروزه اهمیت تولیدات دامی تنها محدود به فرآورده های خوراکی برای انسان نمی شود (۶). در حدود ۶۰ سال پیش باب رابین و تونی ماتیس در کالج لندن مکانیسم آنزیمی ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی را به جهان گزارش کرده اند (۱۱). از آن سال به بعد ریبونوکلئاز

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۵- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
۶- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
(Email: nassiry@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.81620

مواد و روش ها

جمع‌آوری اطلاعات

تمامی ساختارهای مورد نیاز برای انجام این مطالعه از سرور Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) استخراج گردیده است. فایل PDB آنزیم رانپیرناز غورباقه (ران) پپینیس (با شماره دسترسی (PDB1YV6/PDB) 10.2210/ مهارکننده ریبونوکلئازی گاوی با شماره دسترسی (PDB2BNH/PDB) 10.2210/ و فایل PDB مهارکننده ریبونوکلئازی متصل به آنزیم RNaseA گاوی با شماره دسترسی (PDB1DFJ/PDB) 10.2210/ انتخاب گردیدند.

بررسی استاتیکی اتصال ریبونوکلئاز ها با RI

از آنجا که فایل کریستالوگرافی اتصال آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با RI وجود داشته، با استفاده از نرم افزار PyMOL ver 1.8x ver 1.8x اتصالات اصلی کمتر از ۳/۵ آنگستروم بین آنزیم ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی و RI استخراج گردید (۱۳). به منظور برآورد اتصال رانپیرناز با RI از نرم‌افزارهای PyMOL و سرور آنلاین Cluspro (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) دانشگاه بوستون استفاده شد. با توجه به شباهت ساختاری رانپیرناز با RNase A، در نرم‌افزار PyMOL (۷) آنزیم رانپیرناز جایگزین آنزیم RNaseA حاضر در فایل PDB مهارکننده ریبونوکلئازی متصل به آنزیم RNaseA (PDB2BNH/PDB) 10.2210/ به روش دستی گردید. همچنین به منظور بررسی جهت یابی آنزیم رانپیرناز با RI، با معرفی لیگاند و رستپور به نرم‌افزار Cluspro پیش‌بینی داکینگ صورت پذیرفت. مقایسه روش دستی و نتایج بدست آمده از داکینگ با استفاده از نرم افزار PyMOL صورت پذیرفت. بررسی سپس نتایج به‌دست آمده ذخیره گردید تا در مطالعات MDS^۱ مورد بررسی قرار گیرند.

ایجاد جهش در آنزیم های ریبونوکلئازی

با بررسی پژوهش‌های صورت‌گرفته در حوزه مهندسی ریبونوکلئازها، ویژگی‌هایی از قبیل: نفوذ سلولی، سمیت سلولی و توانایی فرار از RI به‌عنوان کاندیدای اصلی برای تغییرات آمینواسیدها مدنظر قرار گرفتند (۲۱، ۲۵ و ۲۶). تورکوت و همکاران (۲۶) و ساندلس و همکاران (۲۵) گزارش کردند که آمینواسیدهای لیزین آنزیم رانپیرناز بهترین کاندید جهت تغییر به آمینواسیدهای آرژنین و آلانین به منظور افزایش بار سطحی آنزیم و سیتوتوکسیسیته آنزیم می باشند. از این‌رو، در این مطالعه ۳ جایگاه آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹

طریق مسیر اندوزومی افزایش می یابد. در میان اعضای خانواده ریبونوکلئازها، ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی (RNase A) و رانپیرناز مهمترین آنزیم های هستند، که دانشمندان بر روی بررسی ویژگی های آن تمرکز کرده اند (۸، ۲۵ و ۲۶).

RNase A قویترین عضو خانواده RNase می باشد که از ۱۲۴ آمینواسید تشکیل شده و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۴۶ می‌باشد (۱۸). مهمترین محدودیت استفاده از این آنزیم به منظور مهندسی ایمونوتوکسین تمایل اتصال به ممانعت کننده ریبونوکلئازی داخل سلول و عدم توانایی نفوذ به داخل سلول می باشد (۸ و ۱۸). با اینحال، مطالعات زیادی وجود دارد که توانسته اند ایمونوتوکسینی موثر با استفاده از RNase A و مسیر کیسه‌های اندوزومی تولید کنند (۲۲ و ۲۴). با اینحال، RNase A پس از ورود به داخل سلول تحت تاثیر RI قرار گرفته و غیرفعال می گردد (۸).

رانپیرناز با نام تجاری آنکوناز به عنوان کوچکترین عضو خانواده RNase ها شناخته شده که در حال حاضر در مرحله سوم کیلینیکی آزمایشات FDA به منظور درمان بیماران مزوتلیوم می باشد (۹، ۲۳ و ۲۵). این پروتئین از ۱۰۴ آمینواسید تشکیل شده و با نقطه ایزوالکتریک ۹/۷ دارای مشابهت ۳۰ درصدی آمینواسیدی با آنزیم RNase A است (۳). گزارشات نشان می دهد که اندازه کوچک این آنزیم و همچنین ساختار پروتئینی آن سبب شده که آنزیم قادر به فرار از RI باشد (۲۱). با اینحال در بعضی از گزارشات مشخص شده که RI به رانپیرناز نیز اتصال پیدا کرده است (۱۵). در حال حاضر، بیشتر مطالعات بر روی آنزیم رانپیرناز در حوزه افزایش سمیت سلولی است که نسبت به RNase A تا ۵ برابر کمتر می باشد (۵). پژوهشگران به منظور افزایش سمیت سلولی آنزیم رانپیرناز با تغییر آمینواسیدهای لیزین به آرژنین و آلانین موفق به معرفی آنزیم رانپیرناز جهش یافته با خاصیت سمیت سلولی بیشتر نسبت به حالت طبیعی کردند. با اینحال، گزارشات آنها نشان می دهد که این آنزیم ها دارای پایداری مناسب نبودند و خیلی سریع غیرفعال می شدند (۲۵ و ۲۶). امروز، با توجه به پیشرفت های ایجاد شده در علوم کامپیوتری و آنالیز دینامیک و استاتیک پروتئین، محققان قادر هستند که مدل‌های پروتئینی را مهندسی و مدلسازی کرده و ویژگی های ساختاری آنها را قبل از تولید در آزمایشگاه بدست آورند.

از اینرو در این مطالعه، مسیری جدید به منظور مهندسی آنزیم های ریبونوکلئاز معرفی می گردد. با استفاده از این مسیر ساختارهای آنزیم های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی و رانپیرناز مورد بررسی قرار گرفته و سپس با استفاده از روش دینامیک و استاتیک مولکولی ساختاری جهش یافته از آنزیم رانپیرناز با ویژگی های توانایی فرار از RI، افزایش سیتوتوکسیسیته و شارژ سطحی و همچنین پایداری پروتئین معرفی می گردد.

به شباهت ساختاری RNase A و رانپیرناز جهت یابی اتصال مانند هم خواهد بود (شکل ۱). همانطور که در شکل (۱) قابل مشاهده است این دو پروتئین از نظر ساختاری کاملاً با یکدیگر شباهت دارند، با اینحال آنزیم RNase A دارای پروتئینی بازتر نسبت به رانپیرناز می باشد که این به نوبه خود باعث ایجاد اتصالات بیشتر با RI گردید است. آرنولد و همکاران (۳) گزارش کردند که این دو آنزیم دارای ۳۰ درصد مشابهت آمینواسیدی هستند. از آنجا که آنزیم رانپیرناز ۲۰ آمینواسید کمتر از RNase A دارد، این به نوبه خود پوشش دهنده ۱۶ درصد این عدم تشابه است. با اینحال این دو آنزیم سوبسترا ویژه خود را در سلول، برای انجام ماموریت دارند. محققان گزارش کردند که mRNA به عنوان اصلی ترین سوبسترا برای آنزیم RNase A شناخته می شود، با این حال ریز RNA و Ribosomal RNA نیز تحت تخریب این آنزیم قرار می گیرند (۴). سوبسترا آنزیم رانپیرناز tRNA می باشد که با نفوذ این آنزیم به سیتوزول سلول و تخریب tRNA باعث القا آپوپتوزیس می گردد (۲). شکل (۱) نشان می دهد که بسیاری از ساختارهای آلفا و صفحات بتا موجود در هر دو آنزیم کاملاً بر یکدیگر منطبق هستند. محققان گزارش کرده اند که استفاده از داکینگ پروتئینی برای لیگاند و رسپتورهای که نحوه عملکردشان مشخص نشده، غیرواقعی خواهد بود (۱۹). از اینرو، در این مطالعه از کریستالوگرافی RI و RNase A به عنوان معیار صحت داکینگ استفاده گردید. زیرا با توجه به شباهت ساختاری بالا و نحوه عملکرد و سایت کاتالیکی RI، اتصال به ریبونوکلئاز با یک جهت یابی مشخص خواهد بود. از طرفی، در این مطالعه با ارائه مسیر دینامیک مولکولی امکان تصحیح داکینگ پروتئین فراهم گردید بطوریکه آنزیم و RI در کنار هم قرار داده شد تا جهت یابی در صورت تمایل به اتصال مشخص گردد.

به منظور شناسایی آمینواسیدهای کاندید جهت تغییر، اتصالات بین اکسیژن و نیتروژن زیر ۳/۵ آنگستروم بین RI با هر یک از آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۱) (جدول ۱). گزارشات نشان می دهد که این اتصالات می تواند نقش بسیار موثری در غیرفعالسازی آنزیم داشته باشد (۱۴). بیشترین اتصالات بین آنزیم RNase A با RI و تعداد اتصالات آنزیم رانپیرناز با RI شامل ۵ اتصال می گردد. در شکل (۲) چگونگی اتصال بین آنزیم ها و RNase A آورده شده است. همانطور که در این شکل مشخص شده مهمترین اتصال بین آنزیم RNase A و RI در گلوتامین ۱۱ و سرین ۸۹ و مهمترین اتصال بین رانپیرناز با RI شامل گلوتامین ۱ و سرین ۷۲ می باشد. گلوتامین ۱۱ جزء ساختار کاتالیکی آنزیم بوده و جایگزینی آن منجر به غیرفعال شدن آنزیم می گردد. همچنین ساندلس و همکاران (۲۵) گزارش کردند که اسید آمینه پیروگلوتامین ۱ یکی از اجزای ضروری ساختار آنزیم رانپیرناز می باشد که در صورت تغییر آنزیم غیرفعال خواهد بود. از لحاظ ساختاری سرین ۸۹ در آنزیم RNase A و سرین ۷۲ در

و ۵۵ به آرژنین و آمینواسید سرین ۷۲ به منظور دستیابی به توانایی فرار از RI به آلانین تغییر داده شد (۱۳). پژوهش توالی آمینواسیدی بدست آمده به سایت آنلاین Swiss Model ارسال و پس از پردازش به شکل PDB ذخیره گردید. این فایل ها به عنوان نسخه های جهش یافته از آنزیم ریبونوکلئاز جمع آوری و در آنالیزهای بعدی مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز MD

تمامی مراحل شبیه سازی MD با استفاده از نرم افزار گرومکس (ورژن ۵) در محیط لینوکس ۱۷/۲ و در میدان نیروی CHARMM صورت گرفت (۱۷ و ۲۸). به طور مختصر، ساختارهای پروتئینی این مطالعه در جعبه مکعبی حاوی بیش از ۶۷۰۰ مولکول آب قرار داده شد. وضعیت یونی زاسیون برای دستیابی به pH طبیعی محیط صورت گرفت و شارژ اضافی سیستم با اضافه کردن تعداد مناسب یون در ۷- آنگسترومی سطح پروتئین تنظیم گردید. به حداقل رساندن انرژی سیستم به مدت ۲۰ پیکوثانیه در دمای ۳۰۰ کلوین نیز صورت پذیرفت. همچنین طول همه باندها بوسیله الگوریتم Lincs محدود شدند. معادله حرکت نیوتون با یک گام زمانی 2fs هماهنگ گردید و مشخصات اتمی برای تجزیه و تحلیل برای هر ۵/۰ ps ذخیره و پایداری دی الکتریک ۱ در نظر گرفته شد. از طرفی، شبیه سازی برای بررسی شرایط دینامیکی آنزیم رانپیرناز و پروتئین ممانعت کننده ریبونوکلئازی و همچنین آنزیم RNase پانکراتیک با ممانعت کننده ریبونوکلئازی در دمای ۳۰۰ کلوین و در ۱۰۰ نانوثانیه صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل نتایج خروجی MD

پایداری ساختاری، نفوذ سلولی، سیتوتوکسیته و توانایی فرار از RI ساختارهای شبیه سازی انجام شده در این مطالعه با استفاده از چندین پارامتر هندسی در واحد زمان مورد ارزیابی قرار گرفتند. میانگین انحراف مربعات ریشه^۱ (RMSD)، میانگین نوسانات مربعات ریشه^۲ (RMSD) و شعاع ژیراسیون^۳ (Rg) از فایل های مربوطه استخراج گردید. همچنین ساختارهای پروتئینی و برآورد میزان شارژ سطحی پروتئین در زمان های مختلف با استفاده از نرم افزار PyMOL و VMD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

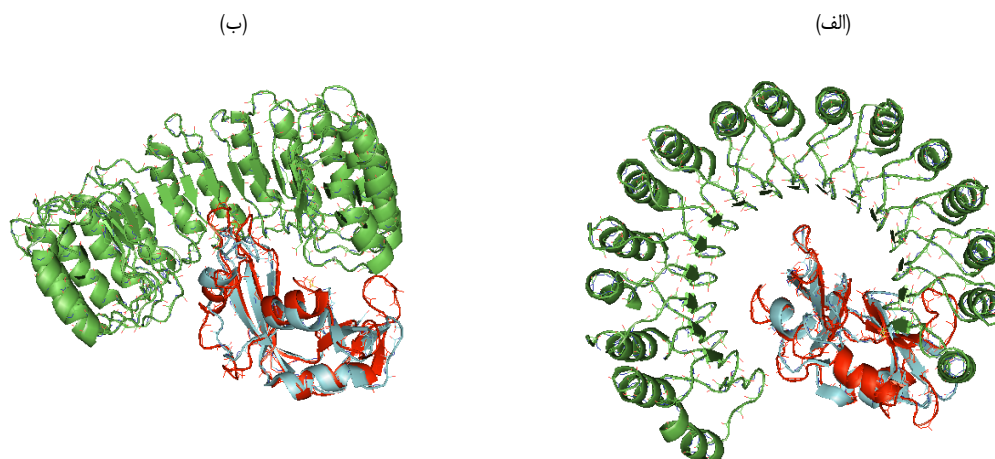
نتایج و بحث

با مقایسه نتایج بدست آمده از داکینگ پروتئینی رانپیرناز و RI و همچنین جهت یابی اتصال رانپیرناز به RI مشخص شد که با توجه

- 1- Root Mean Square Deviations
- 2- root mean Square fluctuation
- 3- gyration radius

تغییر شارژ سطحی پروتئین می گردد، کاندید گردید (۱۳). همچنین تغییر آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین می تواند نقش بسزایی در افزایش شارژ سطحی پروتئین رانپیرناز داشته باشد (۲۵) و (۲۶).

آنزیم رانپیرناز همولوگ هم بوده و از اینرو تغییر در این آمینواسید می تواند به شکل موثری به فرار آنزیم از RI کمک کند. سرین آمینواسید قطبی بوده که به یک آمینواسید غیرقطبی (تریپتوفان) در RI متصل شده است. به منظور ایجاد دافعه استفاده از آمینواسید غیرقطبی آلانین که دارای زنجیره‌های جانبی کوچکتر نسبت به سرین بوده و باعث



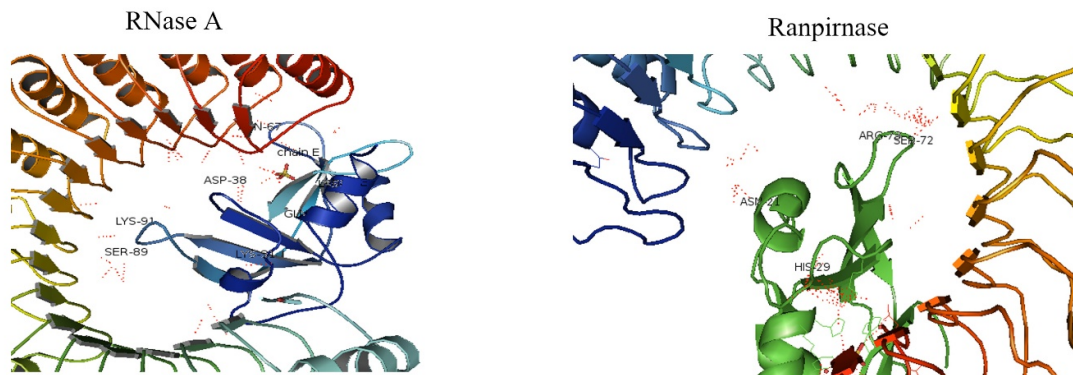
شکل ۱- بررسی جهت یابی اتصال آنزیم های RNase A و رانپیرناز با RI. رنگ سبز نشان دهنده پروتئین RI، رنگ آبی آنزیم رانپیرناز و رنگ قرمز آنزیم RNase A. الف) نمای کناری، ب) نما از بالا.

Figure 1- Investigation the orientation of RNase A and Ranpirnase that binding to RI. The green color showed RI, the blue color showed Ranpirnase and the red color showed RNase A. A) side view, B) top view.

جدول ۱- لیست آمینواسیدهای متصل شونده به RI در داکینگ پروتئین. آمینواسیدهای قرمز رنگ نشان دهنده اتصالات مهم هستند.

Table 1- The list of amino acids bonded to RI in protein docking. The most important residue bonds showed in red color.

نوع آنزیم Enzyme type	آمینواسید در RI Ribonuclease amino acids	آمینواسید در RI RI amino acids
RNase A	LYS7	SER456
	GLN11	SER456
	ASP38	ARG453
	ARG39	GLU397
		GLN426
	LYS41	ASP431
	ASN67	TYR433
		LEU405
	Glu 88	GLN6
	SER89	ASP228
رانپیرناز		LEU405
		TYR433
	GLU 1	TYR 435
	ASP21	CYS 7
	HIS 29	TYR430 and SER 456
	SER 72	TRP259
	ARG 73	GLU 202



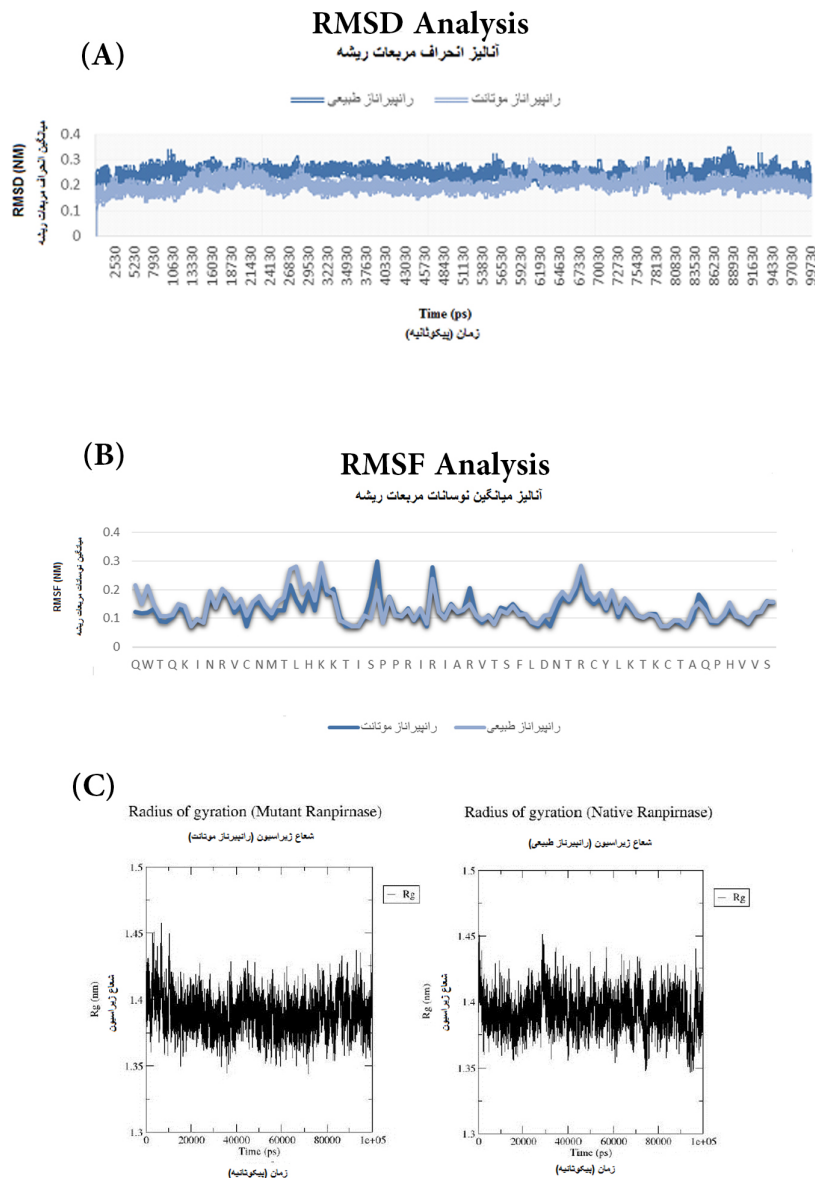
شکل ۲- بررسی اتصالات بین آنزیم های RNase A و رانپیرناز با RI.
Figure 2- Investigation of RNase A and Ranpirnase binding to RI.

آنزیم طبیعی بوده و تغییرات ایجاد شده در این آنزیم ها منجر به عدم پایداری پروتئین نگردیده است (شکل ۴). آنالیز گراف های RMSD، RMSF و Vg تایید می کند که آنزیم های جهش یافته گزارش شده از دیدگاه پایداری هیچ تفاوت معنی داری با آنزیم های طبیعی خود نداشته اند. بررسی نمودار RMSD نشان می دهد که با توجه به اینکه موتاسیون ها باعث پخش شدن شارژ الکتریکی در سطح پروتئین شده، از اینرو، پایداری آنزیم جهش یافته نسبت به طبیعی بیشتر نیز شده است. نمودار RMSF نیز نشان می دهد که سرین ۲۱، آرژنین ۳۷، آرژنین ۴۲ و گلوتامین ۹۲ به شکل میانگین ۰/۵ آنگستروم ناپایداری داشته اند که ناشی از تاثیر تغییرات آمینواسیدی بر روی پروتئین می باشد. شعاع ژیا رسیون نشان دهنده پایداری فضای پروتئین های طبیعی و جهش یافته تولید شده می باشد.

در محیط ترمودینامیکی پروتئین های ریبونوکلئاز در کنار RI قرار داده شدند و بررسی ویژگی های ترمودینامیکی پس از ۱۰۰ نانوثانیه صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که تغییرات داده شده سبب افزایش بار سطحی پروتئین شده است (شکل ۳). تروکت و همکاران (۲۶) گزارش کردند که افزایش بار سطحی آنزیمی می تواند سبب افزایش نفوذ سلولی ریبونوکلئازها شده و با افزایش ورود به سیتوپلاسم سمیت سلولی آنزیم افزایش می یابد. تغییر آمینواسید سرین در آنزیم رانپیرناز منجر به فرار کامل این آنزیم RI گردید، اما تغییر این آمینواسید در RNase A اگرچه که فاصله ها را از RI بیشتر کرده اما منجر به فرار کامل نگردید. نتایج نشان می دهد که گلوتامین ۱۱ پیوند بسیار قوی با RI برقرار می کند که خود مانعی بزرگ برای فرار این مولکول از RI می باشد. بررسی پایداری مولکولی آنزیم های مهندسی نشان می دهد که میزان پایداری این مولکول ها منطبق بر



شکل ۳- مقایسه افزایش بار سطحی رانپیرناز در حالت های طبیعی و جهش یافته؛ رنگ آبی نشان دهنده شارژ الکتریکی مثبت است.
Figure 3- The comparison of increasing the surface charge of native and mutant Ranpirnase. The blue color showed amino acid positive charge.



شکل ۴- آزمون های پایداری RMSD، RMSF و Vg برای آنزیم های رانیپیرناز در حالت های طبیعی و جهش یافته
Figure 4- The RMSD, RMSF and Vg stability tests for native and mutant Ranpirinase.

قابلیت فرار از RI، نفوذ سلولی و به دنبال آن سمیت سلولی بیشتر نسبت به حالت طبیعی و پایدار مهندسی گردید. تولید آنزیم رانیپیرناز جهش یافته (تغییر آمینواسیدهای لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین و سرین ۷۲ به آلانین) بررسی شده در این مطالعه، می تواند منجر به تولید آنزیمی جدید با ویژگی های منحصر به فرد جهت استفاده در مهندسی ایمونوکسین ها شود. همچنین مسیر ارائه شده در این مطالعه، به عنوان مسیری دقیق و کاربردی جهت مهندسی آنزیم های ریبونوکلئازی پیشنهاد می گردد.

نتیجه گیری کلی

اگرچه که ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی یکی از قویترین آنزیم های خانواده ریبونوکلئازها شناخته می شود، اما با توجه به ساختار پروتئینی بررسی شده در این مطالعه، امکان فرار از سد ممانعت کننده ریبونوکلئازی در داخل سلول نخواهد داشت. از اینرو، با توجه به ساختار پروتئینی ویژه رانیپیرناز، با الگوبرداری از ویژگی های ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی آنزیم رانیپیرناز جهش یافته، با ویژگی:

این پژوهش توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
با شماره گرنت ۳/۳۹۱۱۷ حمایت مالی شده است.

سپاسگزاری

منابع

- Allahyari H., S. Heidari, M. Ghamgosha, P. Saffarian and J Amani. 2017. Immunotoxin: A new tool for cancer therapy. *Tumour Biology*, 39(2):1-11.
- Ardelt W., K. Shogen and Z. Darzynkiewicz. 2008. Ranpirnase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):215-225.
- Arnold U. and R. Ulbrich-Hofmann. 2006. Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. *Biotechnology Letters*, 28:1615-1622.
- Aryani A. and B Denecke. 2015. In vitro application of ribonucleases: comparison of the effects on mRNA and miRNA stability. *BMC Research Notes*, 8:164-172.
- Boix E., Y. Wu, V. M. Vasandani, S. K. Saxena, W. Ardel, J. Ladner and R. J. Youle. 1996. Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *Journal of Molecular Biology*, 257(5):992-1007.
- Cuchillo C. M., M. V. Nogués and R. T. Raines. 2011. Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochemistry*, 50(37):7835-41.
- DeLano W. L. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter on Protein Crystallography*, 40: 82-92.
- Erickson H. A., M. D. Jund and C. A. Pennell. 2006. Cytotoxicity of human RNase-based immunotoxins requires cytosolic access and resistance to ribonuclease inhibition. *Protein Engineering, Design and Selection*. 19(1):37-45.
- Fagagnini A., A. Pica, S. Fasoli, R. Montioli, M. Donadelli, M. Cordani, E. Butturini, L. Acquasaliente, D. Picone and G. Gotte. 2017. Ranpirnase dimerization through 3D domain swapping: structural investigations and increase in the apoptotic effect in cancer cells. *Biochemical Journal*, 474(22):3767-3781.
- Fett J.W., D. J. Strydom, R. R. Lobb, E. M. Alderman, J. L. Bethune, J. F. Riordan and B. L. Vallee. 1985. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 24:5480-5486.
- Findlay D., D. G. Herries, A. P. Mathias, B. R. Rabin and C. A. Ross. 1961. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature*, 190:781-784.
- Goo S. M. and S. Cho. 2013. The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty. *Genome Biology and Evolution*, 5: 21-28.
- Johnson R. J., J. G. McCoy, C. A. Bingman, G. N. Phillips and R. T. Raines. 2007. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *Journal of Molecular Biology*, 368(2), 434-449.
- Khazanov N. A. and H. A. Carlson. 2013. Exploring the composition of protein-ligand binding sites on a large scale. *PLOS Computational Biology*, 9(11): e1003321.
- Leland P. A. and R. T. Raines. 2001. Cancer chemotherapy ribonucleases to the rescue. *Chemistry & Biology*, 8(5):405-13.
- Lu L., J. Li, M. Moussaoui and E. Boix. 2018. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*, 16:9:1012.
- Merlino A., L. Mazzarella, A. Carannante, A. Di Fiore, A. Di Donato, E. Notomista and F. Sica. 2005. The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of ranpirnase mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 280(18):17953-60.
- Narayanan C., D. N. Bernard, K. Bafna, D. Gagné, P. K. Agarwal and N. Doucet. 2018. Ligand-Induced Variations in Structural and Dynamical Properties Within an Enzyme Superfamily. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 12: 54-60.
- Ponomarenko J.V. and P.E. Bourne. 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Structural Biology*. 7: 64-85.
- Richards F. M. and H. W. Wyckoff. 1971. Bovine pancreatic ribonuclease. *The Enzymes IV*, 647-806.
- Rutkoski T. J. and R. T. Raines. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):185-189.
- Schmohl J. U., D. Todhunter, E. Taras, V. Bachanova and D. A. Vallera. 2018. Development of a Deimmunized Bispecific Immunotoxin dDT2219 against B-Cell Malignancies. *Toxins (Basel)*, 6:10(1):32-39.
- Smolewski P., M. Witkowska, M. Zwolinska, B. Cebula-Obrzut, A. Majchrzak, A. Jeske, Z. Darzynkiewicz, W. Ardel, B. Ardel and T. Robak. 2014. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases ranpirnase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders. *International Journal of Oncology*, 45(1):419-

- 25.
24. Sun M., L. Sun, D. Sun, C. Zhang and Li M. 2018. Targeted delivery of immuno-RNase may improve cancer therapy. *Cancer Cell International*, 16:18:58-65.
25. Sundlass N. K. and R. T. Raines. 2011. Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of ranpirnase. *Biochemistry*, 50(47), 10293-9.
26. Turcotte R. F., L. D. Lavis and R. T. Raines. 2009. Ranpirnase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *The FEBS Journal*, 276(14), 3846-57.
27. Vakili Azghandi M., M. Nassiri and A. Javadmanesh. 2017. Engineering of bovine pancreatic ribonuclease to induce apoptosis in cancer cell. *Proceedings of the 3rd International Nastaran Cancer Symposium*, Mashhad University of Medical Sciences, Iran. Page 110.
28. Van Der Spoel D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. Berendsen. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701-18.
29. Wu Y., S. M. Mikulski, W. Ardel, S. M. Rybak and R. J. Youle. 1993. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of ranpirnase cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 268:10686–10693.



Designing of Protein Structural of Ranpirnase Based on Bovine Pancreatic Ribonuclease with Using Molecular Dynamic and Static Simulation

H. Ariannejad¹- M. R. Nassiri^{*2}- A. Javadmanesh³- Sh. Ghovvati⁴- H. Dehghani⁵- A. Asoodeh⁶

Submitted: 10-07-2019

Accepted: 15-09-2019

Introduction Animal production is not only restricted to food products but some therapeutics such as bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) (15). The RNase A is known as a powerful enzyme in ribonuclease family that is used in biotechnology industry (1). It has a potential to be used as an immunotoxin although there are two main reasons that RNase A is not suitable for immunotoxin engineering. The lack of ability to evade ribonuclease inhibitor (RI) and very weak cell penetration, which are essential properties for an immunotoxin (1). One of the small member of ribonuclease family is ranpirnase, originated from the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) that has suitable characteristics for immunotoxin engineering (24, 29). It was showed that Ranpirnase cytotoxicity was five times less than RNase A (26). Therefore, detection of enzyme properties of RNase A and Ranpirnase could be useful for engineering efficient immunotoxins from Ranpirnase. The aim of this study was in silico engineering of Ranpirnase enzyme based on properties of RNase A to design an efficient immunotoxin with the high cell penetration, low cytotoxicity, ability to evade RI and structural stability.

Materials and Methods All protein structures required for performing this study were extracted from Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>). The PDB files related to ribonuclease inhibitor (RI) with accession number of (10.2210/pdb2BNH/pdb), the PDB file related to ribonuclease inhibitor bonded to RNase A enzyme with accession number of (10.2210/pdb1DFJ/pdb), the PDB file related to Ranpirnase enzyme (pdb1YV6/pdb/10.2210) and the PDB file of RNase A enzyme with accession number of (10.2210/pdb2K11/pdb) were selected. PyMOL Software and ClusPro online server were used for docking mentioned enzymes with ribonuclease inhibitor. In PyMOL Software (ver 1.8x), RNase enzyme of PDB file related to ribonuclease inhibitor connected to RNase A enzyme (10.2210/pdb2BNH/pdb) was manually replaced by ranpirnase enzyme. Also, docking prediction related to each enzyme with enzymatic inhibitor was performed by introducing ligand and receptor to ClusPro Software. Then, obtained results were used in molecular dynamic (MD) studies. All stages of MD simulation were performed using GROMACS Software (version 5) in Linux 17.2 environment and CHARMM force filed (27). In summary, protein structures of this study were placed in a cube box filling with more than 6700 water molecules. Ionization was performed to achieve the natural pH of the environment. Extra charge of the system was adjusted by adding appropriate number of ions to the distance of 7 angstrom of protein surface. Minimizing system energy was performed at 300 K for 20 ps. The length of all bonds was limited by Links. Newton's equation of motion matched with a 2fs time interval and atomic characteristics for every 0.5 ps were stored to be analyzed. Dielectric stability is considered to be 1. Simulated temperature is 300 K. A 4-ps simulation at 300 K was performed to investigate dynamic condition of ranpirnase and ribonuclease inhibitor, pancreatic RNase with ribonuclease inhibitor. The structural stability of the simulation was assessed using several geometric parameters per unit time such as: Root mean square deviations

1-PhD Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

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

4 -Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, University of Guilan, Iran.

5- Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

6- Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(*- Corresponding Author Email: nassiry@um.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.81620

(RMSD), root mean square fluctuations (RMSF), and gyration radius. Also, protein structures at different time points were analyzed using PyMOL and VMD computer programs.

Results and Discussion Since the topological structures of ranpirnase enzyme and RNase A are similar, it was expected that binding of RI with ranpirnase enzyme is similar to RNase A enzyme. The docking results showed that RNase A enzyme was bonded to RI through 19 amino acids. This binding with RI is through 5 amino acids for ranpirnase enzyme. The glutamine 11 and serine 89 were most important residue that bonded to RI in RNase A. We found that pyroglutamine 1 and serine 72 are the homolog residue in ranpirnase. The ranpirnase ability to evade RI was obtained with mutation S72A and cytotoxicity and cell penetrate were achieved by K45R, K49R, L55R mutations. The molecular dynamic simulation confirmed the stability of mutant ranpirnase by RMSD, RMSF and Vg analysis. Also, protein charge of surface in mutant ranpirnase was increased in compare to the native ranpirnase.

Conclusion It was reported previously that ranpirnase enzyme is able to evade RI but our modeling results demonstrated that RI could bind with ranpirnase. The ranpirnase with 4 mutations (K45R, K49R, L55R and S72A) seemed to be more efficient as a suitable toxin and had favorable properties such as evading from RI, cell penetrate, cytotoxicity and protein stability in comparison of native enzyme. Also, we optimized a new approach for designing and engineering of immunotoxins.

Keywords: Bovine pancreatic ribonuclease, Molecular Dynamic Simulation, Ranpirnase, Ribonuclease Inhibitor.



مقاله علمی - پژوهشی

تجزیه و تحلیل ژنتیکی صفات تولیدی گاوهای هلستاین ایران با در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی

یحیی خالقی فرد^۱ - محمد رکوعی^{۲*} - احمد مقیمی اسفندآبادی^۳ - هادی فرجی آروق^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۱

چکیده

منظور کردن گروه‌بندی ژنتیکی در مدل‌های ارزیابی می‌تواند تفاوت‌های مورد انتظار در ارزش‌های اصلاحی حیوانات که به دلیل نامعلوم بودن والدین تخمین زده نمی‌شود را نشان دهد. هدف از مطالعه حاضر برآورد پارامترهای ژنتیکی و روند ژنتیکی صفات تولیدی (تولید شیر، چربی و پروتئین) گاوهای هلستاین ایران براساس یک مدل حیوانی بدون در نظر گرفتن (مدل ۱) و با در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی (مدل ۲) بود. بدین منظور از اطلاعات صفات تولیدی گاوهای هلستاین سه شکم زایش که توسط مرکز اصلاح نژاد دام کشور تا سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شده بود، استفاده شد. برای حیوانات با پدر و مادر نامعلوم، گروه‌بندی ژنتیکی براساس سال و جنس تولد انجام گرفت. تجزیه و تحلیل برای صفات در دوره‌های شیردهی مختلف با و بدون در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی انجام شده و روند ژنتیکی محاسبه گردید. برای بررسی تغییر در رتبه‌بندی حیوانات در نتیجه در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی از همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن استفاده شد. نتایج نشان داد که در نظر گرفتن گروه ژنتیکی در مدل باعث کاهش واریانس ژنتیک افزایشی و وراثت‌پذیری تمامی صفات شد. رتبه‌بندی حیوانات با منظور کردن گروه‌بندی ژنتیکی تغییر کرده و این تغییر برای ۱۰ درصد بهترین نرها نسبت به کل حیوانات، کل نرها و ماده‌ها بیشتر بود. روند ژنتیکی و صحت برآوردهای ارزش اصلاحی بین دو مدل ۱ و ۲ دارای تفاوت معنی‌دار بود. مدل ۲ ارزش‌های اصلاحی با صحت بالاتری و همچنین روند ژنتیکی بیشتری نسبت به مدل ۱ داشت. نتایج نشان داد که افزودن گروه‌بندی ژنتیکی برای داده‌هایی با والدین نامعلوم باعث برآورد دقیق‌تر ارزش اصلاحی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: روند ژنتیکی، گروه‌بندی ژنتیکی، هلستاین، همبستگی اسپیرمن.

مقدمه^۱

وضعیت بسیار پیچیده‌ای را در ارزیابی ژنتیکی بوجود می‌آورد. اهمیت ماتریس خویشاوندی در از بین بردن این پیچیدگی و درهم آمیختگی اثرات ژنتیکی و محیطی است (۱۱). عدم وجود اطلاعات کافی در شجره که حاصل از عدم ثبت مشخصات شجره‌ای حیوانات است، مانع از پیش‌بینی صحیح ارزش‌های اصلاحی می‌شود.

هندرسون (۱۰) گروه‌بندی ژنتیکی را جهت پیش‌بینی واقعی‌تری از ارزش‌های اصلاحی، در حالت استفاده از رکوردهای فنوتیپی سال-های مختلف، پیشنهاد نمود. برای این گروه‌بندی‌ها، سال تولد، سالی که اولین دختر حیوان نر رکورد ایجاد می‌کرد یا سالی که حیوان نر برای تلقیح مورد استفاده قرار می‌گرفت، در نظر گرفته می‌شد. در واقع این گروه‌بندی برای محاسبه روند ژنتیکی در طی سال‌های مختلف در نظر گرفته می‌شد (۲۴). هندرسون با ذکر مزایای استفاده از روابط خویشاوندی در ارزیابی حیوانات نر بیان نمود که اگر مادران حیوان نر نمونه تصادفی از جمعیت باشند و روابط خویشاوندی به صورت کامل مورد استفاده قرار گیرند به گروه‌بندی در ارزیابی‌های ژنتیکی حیوانات

رابطه خویشاوندی معیاری برای بیان میزان شباهت ارزش‌های اصلاحی بین حیوانات است. بنابراین ارزش‌های اصلاحی از روی ارزش فنوتیپی صفات، به کمک رابطه ژنتیکی افزایشی قابل پیش‌بینی است. افزایش حجم اطلاعات مورد استفاده در ارزیابی‌های ژنتیکی و به دنبال آن افزایش تعداد گله‌های وارد شده در ارزیابی از یک سو، و وجود تفاوت در نحوه مدیریت پرورش بین گله‌های مختلف از سوی دیگر، همچنین وجود روند محیطی و ژنتیکی برای صفات مختلف،

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل.

۲- دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی و بیوانفورماتیک، دانشگاه زابل.

۳- کارشناس ارشد مرکز اصلاح نژاد دام کشور.

۴- استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، پژوهشکده دام‌های خاص، دانشگاه زابل.

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: Email: rokouei@uoz.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.76344

مناسب بودن مدل‌های با گروه‌های ژنتیکی برای ارزیابی ژنتیکی وزن یکسالگی، افزایش وزن بعد شیرگیری، دور کمر و نمره ماهیچه گاوهای نیلور در برخی تحقیقات گزارش شده است (۲۰ و ۳۰). اطلاعات شجره‌ای موجود در ایران در اکثر موارد از شاخص کیفیت مناسبی برخوردار نیست. به عنوان مثال در بیشتر موارد متوسط معیار کامل بودن شجره برای گاوهای هلشتاین ایران کمتر از ۰/۷ است (۲۷). برنامه ثبت مشخصات و رکورد برداری به دلیل حجم بالا و گستردگی زیاد در کشور و اجرا با فواصل زمانی متفاوت در استان‌های مختلف شرایطی را به وجود آورده است که حیوانات با پدر و مادر نامشخص در سال‌های مختلف حتی در سال‌های اخیر نیز ثبت شده و در اطلاعات گاوهای هلشتاین ایران وجود دارند. بنابراین ارزیابی ژنتیکی گاوهای هلشتاین ایران با والدین نامشخص ممکن است منجر به اربیی نتایج شود (۲۷) زیرا این حیوانات به عنوان حیوانات پایه در نظر گرفته شده و ممکن است باعث اربیی برآورد پارامترهای ژنتیکی و ارزش‌های اصلاحی شود. با استفاده از گروه‌های ژنتیکی در ارزیابی‌های ژنتیکی می‌توان تا حدودی مشکل حاصل از حیوانات با والدین نامعلوم را تصحیح کرد. در همین راستا هدف از انجام تحقیق حاضر، برآورد مولفه‌های واریانس و ارزش‌های اصلاحی صفات تولیدی گاوهای هلشتاین با و بدون در نظر گرفتن گروه‌های ژنتیکی و مقایسه نتایج آنها با یکدیگر است.

نیازی نخواهد بود. به بیان دیگر استفاده از روابط خویشاوندی می‌تواند جایگزین گروه‌بندی‌های ژنتیکی باشد (۱۲). عدم امکان ثبت مشخصات کامل حیواناتی که در طول برنامه‌های اصلاح نژادی به جمعیت اضافه می‌شوند یا عدم ثبت مشخصات کامل حیوانات متولد شده در جمعیت، باعث تشخیص ناصحیح ارتباطات واقعی ژنتیکی بین حیوانات خواهد شد. این حیوانات در تجزیه و تحلیل مدل‌های حیوانی به عنوان حیوانات پایه در نظر گرفته می‌شوند، اما در یک زمان متولد نشده‌اند و این امر می‌تواند بر صحت و دقت ارزش‌های اصلاحی پیش‌بینی شده اثر گذاشته و برنامه‌های اصلاحی را از مسیر درست منحرف کند. روش استفاده از مدل‌های حیوانی به همراه گروه‌های ژنتیکی در دهه ۱۹۸۰ ارائه شد (۲۶ و ۳۶). تحقیقات بعدی نحوه وارد کردن آثار گروه‌های ژنتیکی در مدل‌های همراه با آثار مادری را توضیح داد (۲). در تحقیقات دیگر امکان استفاده از گروه‌های ژنتیکی در تجزیه و تحلیل‌های چند صفتی تفسیر گردید (۴). استفاده از مدل‌های حیوانی به همراه گروه‌های ژنتیکی برای رسیدن به دقت مناسب در پیش‌بینی ارزش اصلاحی حیوانات توصیه شده است (۳، ۶، ۲۱، ۲۴). در تحقیقات مختلفی مزایای استفاده از گروه‌های ژنتیکی ذکر شده و از این روش در ارزیابی ژنتیکی استفاده شده است (۷، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۲۲، ۳۰، ۳۱، ۳۲).

جدول ۱- ساختار شجره گاوهای هلشتاین به تفکیک سال تولد

Table 1- The pedigree structure of holstein cows separated by birth year

سال تولد	تعداد	هم‌خون	پدر نامعلوم	مادر نامعلوم	پدر و مادر نامعلوم	پدر و مادر معلوم
Year of birth	Number	Inbreed	Unknown sire	Unknown dam	Unknown parent	Known parent
Before 1370	129048	4440	78937	84934	74295	39472
1370	26368	2818	9618	10911	7451	13290
1371	29845	4986	10230	10432	7119	16302
1372	32066	7414	9909	8635	6241	19763
1373	35304	10165	9400	8093	5933	23744
1374	37851	13446	9382	8007	6068	26530
1375	40508	16753	9458	8095	6281	29236
1376	43220	19817	9527	7733	6318	32278
1377	44844	23178	8839	7517	5999	34487
1378	48901	28591	9053	7806	6281	38323
1379	53406	31314	10300	9403	7459	41162
1380	85469	33683	10875	10873	8013	44734
1381	60442	37866	11317	11918	8567	45774
1382	67454	42159	13103	14244	9938	50045
1383	75314	46876	14023	16631	10836	55496
1384	81649	49665	15347	18350	11438	59390
1385	85920	54713	15145	17420	11174	64529
1386	90868	60500	13775	15619	9328	70802
1387	101044	67514	13931	15278	8760	80595
1388	103637	73609	11350	13080	7140	86347
1389	105369	81212	7216	8922	3688	92919
1390	100376	83239	5381	5552	2152	91595
1391	85182	75719	2793	1967	613	81035
1392	18444	17111	305	144	17	18012
Total	1555702	886788	39214	321564	231109	1155860

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از شجره ۱۵۵۵۷۰۲ رأس گاو هلشتاین ایران حاصل ۱۴۶۲۳ گاو نر و ۶۹۷۹۴۰ گاو ماده که توسط مرکز اصلاح نژاد دام کشور از سال ۱۳۶۹ تا اوایل سال ۱۳۹۲ ثبت شده بود، استفاده شد. شجره با استفاده از نرم‌افزار CFC (۲۹) مورد بررسی قرار گرفت. خلاصه اطلاعات مربوط به شجره به تفکیک سال‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است.

صفات تولیدی شامل تولید شیر، چربی و پروتئین تصحیح شده

جدول ۲- آمار توصیفی صفات تولیدی و تعداد حیوانات شجره آنها به تفکیک دوره شیردهی

صفات*	دوره شیردهی	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	تعداد افراد موجود در شجره
Trait	Lactation period	Number	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Number of Pedigree
شیر Milk	1	501183	7649.14	2467.27	1500.27	18839.29	675741
چربی Fat	1	431139	239.49	85.81	7.31	724.60	615782
پروتئین Protein	1	280235	249.03	76.81	8.50	580.28	478682
شیر Milk	2	389375	8297.79	2500.20	1700.03	20162.80	538067
چربی Fat	2	336068	259.67	99.66	14.70	898.25	490566
پروتئین Protein	2	219459	273.36	87.23	12.21	692.23	384288
شیر Milk	3	274503	8333.93	2880.68	1800.19	19938.89	404218
چربی Fat	3	236945	262.26	102.89	14.04	943.03	366565
پروتئین Protein	3	152236	273.40	89.51	12.44	661.47	285467

* واحد همه صفات کیلوگرم می‌باشد

* Units of all traits are in kg

چربی و پروتئین در سه دوره زایش اول، b بردار آثار ثابت شامل HYS (گله-سال - فصل زایش)، تابعیت خطی و درجه دوم سن حیوان هنگام زایش بر اساس ماه (محدوده سنی برای سه زایش اول به ترتیب بین ۱۸ تا ۴۰، ۳۰ تا ۶۰ و ۴۰ تا ۸۰ ماه منظور گردید) و تابعیت خطی درصد خلوص هلشتاین، a، e و g به ترتیب بردارهای آثار تصادفی ژنتیک افزایشی حیوان، باقی‌مانده و گروه‌های ژنتیکی بر اساس سال تولد و جنس می‌باشد و X، Z و ZQ به ترتیب ماتریس-های ارتباط دهنده آثار ثابت، تصادفی و گروه‌های ژنتیکی به مشاهدات است.

برای پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی با توجه به اینکه مؤلفه‌های واریانس برای دو مدل یکسان نبود، بهترین پیش‌بینی ناریب خطی

گروه‌بندی ژنتیکی حیوانات شجره بر اساس سال تولد و جنس انجام گرفت و از ترکیب سال و جنس تولد گروه‌های ژنتیکی تشکیل شدند. حیواناتی که والدین نامعلوم داشتند بر اساس جنس والد و سال تولد خود حیوان دو گروه ژنتیکی دریافت کرده و حیواناتی که فقط یک والد نامعلوم داشتند نیز فقط یک گروه ژنتیکی دریافت نموده‌اند. برای برآورد مؤلفه‌های واریانس و ارزش‌های اصلاحی حیوانات از دو مدل حیوانی تک صفت استفاده شد که شکل ماتریسی آنها به صورت زیر است:

$$y = Xb + Za + e \quad [مدل ۱]$$

$$y = Xb + ZQg + Za + e \quad [مدل ۲]$$

در دو مدل فوق y بردار مشاهدات مربوط به صفات تولید شیر،

(BLUP) ارزش اصلاحی دام‌هل بر اساس مدل اول و با استفاده از مؤلفه‌های واریانس بدست آمده از مدل دوم تخمین زده شد [مدل ۱۲]. همچنین بهترین پیش‌بینی ناریب خطی (BLUP) ارزش اصلاحی دام‌ها بر اساس مدل دوم و با استفاده از مؤلفه‌های بدست آمده از مدل اول تخمین زده شد [مدل ۲۱]. سپس صحت ارزش‌های اصلاحی حاصل و روند ژنتیکی صفات، با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. صحت ارزش‌های اصلاحی برآورد شده برای دو مدل به صورت زیر محاسبه گردید:

$$r = \sqrt{1 - \frac{SEP^2}{\sigma_a^2}}$$

در معادله بالا، r ، SEP و σ_a^2 به ترتیب صحت، خطای معیار پیش‌بینی و واریانس ژنتیک افزایشی می‌باشند (۱۹). برای مقایسه تغییرات رتبه ارزش‌های اصلاحی حیوانات از همبستگی اسپیرمن و برای مقایسه خطای معیار پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی، از آزمون t جفت شده استفاده شد. آماده سازی داده‌ها و محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار R3.1.1 و تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی به کمک نرم‌افزار ASReml 3.1 (۱) انجام شد.

نتایج و بحث

مؤلفه‌های واریانس برآورد شده بر اساس دو مدل با و بدون گروه‌های ژنتیکی برای صفات تولیدی به تفکیک سه دوره اول شیردهی در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه واریانس ژنتیکی افزایشی بین مدل یک و دو نشان داد که برای همه صفات، وارد نمودن گروه‌های ژنتیکی به تجزیه و تحلیل‌ها باعث کاهش واریانس ژنتیکی افزایشی شد. همچنین مقایسه خطای معیار مؤلفه واریانس ژنتیکی افزایشی بین دو مدل نشان داد که خطای معیار برآورد شده برای مدل دوم در تمام موارد کمتر از مدل یک است. از آنجایی که مؤلفه واریانس ژنتیکی و به تبع آن سایر مؤلفه‌ها بر اساس جمعیت پایه برآورد می‌شوند و حیواناتی که والدین نامعلوم دارند به عنوان حیوانات پایه در نظر گرفته می‌شوند. اما این حیوانات اگر در طول نسل‌های متمادی وجود داشته باشند تنوع بین آنها که بخشی از تاثیر پیشرفت ژنتیکی است به صورت ناصحیح به عنوان واریانس ژنتیکی در تجزیه تحلیل برآورد شده و مؤلفه‌های ژنتیکی بیشتر از مقدار واقعی برآورد می‌شوند. بنابراین مدل‌های بدون گروه بندی ژنتیکی مؤلفه‌ی بزرگتری برآورد کرده است. از طرف دیگر، گروه‌بندی ژنتیکی باعث می‌شود حیواناتی که به دلیل سال تولد یکسان از یکخواختی بیشتری برخوردار هستند در یک گروه قرار گیرند و همین امر باعث کاهش خطای معیار برآورد شده شود.

میزان واریانس باقی‌مانده و فنوتیپی برآورد شده برای مدل دوم (به استثنای صفت تولید شیر در دوره اول شیردهی) به ترتیب بزرگتر

و کوچکتر از مدل اول برآورد شد. خطای معیار مؤلفه واریانس باقی‌مانده برای صفت تولید شیر متفاوت از صفات تولید چربی و پروتئین بود به نحوی که برای صفت تولید شیر خطای معیار برآورد شده مدل همراه با گروه‌های ژنتیکی بیشتر از مدل اول بدست آمد در حالی که برای صفات تولید چربی و پروتئین بر عکس بود. خطای معیار واریانس فنوتیپی مدل دوم در تمام موارد کمتر از مدل اول برآورد شد. با وجود برآورد بالای وراثت‌پذیری صفات در دوره‌های مختلف زایش با مدل ۱ نسبت به مدل ۲، میزان خطای معیار وراثت‌پذیری در دو مدل برای تمامی صفات یکسان بود.

بالاترین مقدار وراثت‌پذیری برای تولید شیر مربوط به دوره زایش اول و پایین‌ترین آن برای دوره زایش سوم بدست آمد. واریانس ژنتیکی صفات مختلف در سه دوره شیردهی تغییرات به نسبت محدودی را از خود نشان داد اما واریانس باقیمانده از دوره اول تا سوم برای تمام صفات مورد بررسی افزایش نشان داد که بیان‌کننده تغییرات غیر ژنتیکی است و باعث پایین بودن میزان وراثت‌پذیری برای دوره زایش سوم شده است. به بیان دیگر تنوع محیطی سهم عمده‌ای از تنوع فنوتیپی صفات تولیدی را در دوره زایش سوم نسبت به دو دوره قبلی تشکیل می‌دهد. کاهش در وراثت‌پذیری صفات تولیدی در دوره‌های شیردهی دوم و به بعد در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است (۵ و ۳۴). میزان واریانس ژنتیکی برآورد شده برای صفت تولید شیر و چربی در تحقیق حاضر به ترتیب پایین‌تر و بالاتر از مقادیر گزارش شده توسط یعقوبی و همکاران (۳۷) برای گاوهای هلشتاین استان آذربایجان شرقی می‌باشد. وراثت‌پذیری تولید شیر در تحقیق حاضر پایین‌تر از مقادیر گزارش شده توسط صاحب هنر و همکاران (۲۸) و حسین پور و همکاران (۱۵) و نزدیک به برآوردهای دالین و همکاران (۵) بود. میزان وراثت‌پذیری برای تولید چربی و پروتئین در این تحقیق نسبت به سایر برآوردها برای گاوهای هلشتاین ایران کمتر می‌باشد (۲۵ و ۲۸). مشرف و همکاران (۱۸) وراثت‌پذیری تولید چربی را در محدوده ۰/۰۶ تا ۰/۱۸ گزارش کردند و نتایج تحقیق حاضر برای تولید چربی در محدوده گزارش شده توسط مشرف و همکاران (۱۸) بود. مقادیر بدست آمده وراثت‌پذیری برای تولید پروتئین در تحقیق حاضر در دامنه گزارش شده (۰/۰۷-۰/۲۲) (۱۶ و ۱۸) قرار داشت.

بخشی از دلایل پایین‌تر برآورد شدن وراثت‌پذیری صفات در این تحقیق نسبت به سایر تحقیقات می‌تواند به دلیل ساختار داده‌ها و مدل آماری مورد استفاده باشد چرا که وراثت‌پذیری یک صفت در گله‌های مختلف، سطوح تولیدی متفاوت و دوره‌های زمانی خاص می‌تواند متفاوت باشد. از سوی دیگر اطلاعات نادرست شجره باعث اریب در برآورد وراثت‌پذیری می‌کند و هر چقدر نقص موجود در شجره بیشتر باشد به تبع آن میزان اریبی بیشتری مشاهده می‌شود (۸).

جدول ۳- مؤلفه‌های واریانس و پارامترهای ژنتیکی (خطای معیار) صفات مختلف به تفکیک مدل با و بدون گروه‌بندی ژنتیکی

Table 3- Genetic parameters and components (standard error) of different traits separated by model with and without genetic grouping

صفات Trait	دوره شیردهی Lactation period	مدل * Model	واریانس ژنتیکی افزایشی σ_a^2	واریانس باقیمانده σ_e^2	واریانس فنوتیپی σ_p^2	وراثت‌پذیری h^2
شیر Milk	1	1	468110 (11461)	2410100(9367.8)	2878200(6973.2)	0.163(0.004)
	1	2	463189(11474)	2409800(9378.1)	2873000(6965.3)	0.161(0.004)
	2	1	471812(16353)	3565700(14560)	4037600(10716)	0.117(0.004)
	2	2	457549(16343)	3572300(14577)	4029800(10693)	0.114(0.004)
	3	1	431387(20196)	4159800(19414)	4591200(14310)	0.094(0.004)
	3	2	412766(20142)	4170500(19423)	4584400(14278)	0.090(0.004)
چربی Fat	1	1	341.03(11.56)	2654.30(11.18)	2995.30(7.55)	0.114(0.004)
	1	2	327.97(11.47)	2661.20(10.15)	2989.20(7.52)	0.110(0.004)
	2	1	345.61(19.24)	4027.80(18.90)	4373.41(11.88)	0.097(0.004)
	2	2	320.61(18.56)	4044.90(18.56)	4365.51(11.83)	0.073(0.004)
	3	1	341.09(20.41)	4608.00(21.39)	4949.10(16.34)	0.069(0.004)
	3	2	322.15(20.12)	4619.70(21.28)	4941.90(16.29)	0.066(0.004)
پروتئین Protein	1	1	345.11(13.72)	2456.50(11.91)	2801.60(8.74)	0.123(0.004)
	1	2	330.52(13.62)	2464.10(11.88)	2794.60(8.71)	0.118(0.004)
	2	1	386.63(19.66)	3648.50(18.55)	4035.10(13.85)	0.096(0.005)
	2	2	363.87(19.39)	3661.80(18.45)	4025.60(13.78)	0.090(0.005)
	3	1	364.30(24.96)	4255.30(24.96)	4620.20(18.88)	0.079(0.005)
	3	2	331.13(23.69)	4277.60(24.67)	4608.70(18.78)	0.072(0.005)

* مدل ۱ و ۲ به ترتیب با و بدون گروه‌بندی ژنتیکی هستند.

* Model 2 and 1 are with and without genetic grouping, respectively.

تصمیم‌های انتخابی هستند در دسترس نباشد. مدل‌هایی با اثرات گروه‌های ژنتیکی در صورتی که حیوانات پایه مربوط به یک نسل نباشد ممکن است بخشی از خطا را در برآوردهای واریانس ژنتیکی تصحیح کند (۳۳).

در مطالعات انجام شده برای مقایسه مدل‌های با و بدون در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی گزارش شده است که منظور کردن اثر گروه‌بندی ژنتیکی باعث افزایش صحت پیش‌بینی شایستگی ژنتیک افزایشی حیوان می‌شود (۹، ۲۳، ۳۰). به هر حال، در تحقیق فامولا و ون‌ولک (۶) گزارش گردید که تعریف مناسب از گروه‌بندی ژنتیکی بستگی به معیار انتخاب برای گروه بندی ژنتیکی داشته و تعریف واحدی از گروه‌های ژنتیکی وجود ندارد.

همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن برای تعیین میزان تغییر در رتبه حیوانات بین مدل‌های ۱ با ۱۲ همچنین بین مدل‌های ۲ با ۲۱ اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین مشخص گردید که تغییرات اندکی که در مؤلفه‌های واریانس بین مدل‌های یک و دو وجود داشت، تأثیری در تغییر رتبه‌های حیوانات نداشت. به همین دلیل برای بررسی تأثیر گروه‌های ژنتیکی در تغییر رتبه‌های حیوانات همبستگی رتبه‌ای

در مطالعه اثر گروه‌بندی ژنتیکی بر برآورد واریانس ژنتیکی افزایشی در یک مدل حیوانی با انتخاب جمعیت پایه گزارش شد که اضافه کردن گروه‌های ژنتیکی در مدل، برآوردهای واریانس ژنتیکی را در جمعیت‌هایی با انتخاب حیوانات پایه کاهش داده و اثر کمتری بر برآوردها در جمعیت انتخاب نشده داشت. همچنین اثر گروه‌بندی ژنتیکی با توجه به مقدار و نوع اطلاعات از دست رفته متفاوت بود و هنگامی که گروه‌بندی ژنتیکی به صورت تصادفی انجام می‌شد بر روی برآوردها اثری مشاهده نشد (۳۳). عدم تأثیر زیاد اضافه کردن گروه ژنتیکی بر روی برآوردهای واریانس ژنتیکی در دو مدل ۱ و ۲ در این تحقیق می‌تواند به دلیل انتخاب محدود در جمعیت مورد مطالعه باشد.

وندروورف و دبوتر (۳۳) گزارش کردند که زمانی که برخی اطلاعات شجره از دست رفته باشد برآوردهای کمتری از واریانس ژنتیک افزایشی را بدست می‌آید و نشان دادند که استفاده از روابط خویشاوندی در میان حیوانات پایه می‌تواند بسیاری از خطاها را در برآورد واریانس ژنتیکی کاهش دهد حتی اگر رکوردهایی که مبنای

نیز معنی‌دار بود (به استثنای برخی سال‌ها برای تولید شیر و چربی) (جدول ۵). این نشان می‌دهد که استفاده از مدل با گروه‌بندی ژنتیکی نسبت به مدل با عدم گروه‌بندی ژنتیکی باعث تغییر در رتبه گاوهای ماده در سال‌های تولد مختلف شده است. برای صفات تولیدی میزان همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن برای دوره شیردهی سوم نسبت به دو دوره اول و دوم در بیشتر سال‌ها پایین‌تر بود و در سال‌های آخر میزان همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن بالاتر از سال‌های اولیه می‌باشد که نشان می‌دهد تغییر در رتبه‌بندی گاوهای ماده برای دوره شیردهی سوم و سال‌های تولید قبلی بیشتر از دو دوره شیردهی اولیه و سال‌های اخیر صورت می‌گیرد. برای سال‌های بعد ۱۳۸۹، مقدار همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن به دلیل عدم وجود داده‌های کافی برای نرم‌افزار قابل برآورد نبود. یکی از دلایل تاثیر کم در نظر گرفتن گروه بندی ژنتیکی بر رتبه‌بندی حیوانات در سال‌های اخیر می‌تواند سطح کامل بودن شجره مطلوب‌تر حیوانات در سال‌های اخیر در مقایسه با سال‌های اولیه باشد.

مطالعات در مورد تغییر رتبه‌بندی حیوانات در نتیجه وارد کردن گروه‌بندی ژنتیکی در مدل کم بوده و اکثر مطالعات انجام شده در صفات رشد گاو بوده است. تغییر در رتبه‌بندی حیوانات با در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی در مدل برای صفات وزن یکسالگی و افزایش وزن بعد شیرگیری گاوهای نیلور گزارش شده است (۳۰).

اسپیرمن بین مدل ۱ با ۲۱ در حالت‌های مختلف محاسبه گردید که نتایج آن در جداول ۴ و ۵ آورده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن برای صفات تولیدی در دوره‌های مختلف شیردهی برای کل حیوانات، نرها و ماده‌ها و ۱۰ درصد بهترین نرها پایین‌تر از یک بوده و از لحاظ آماری اختلاف همه همبستگی‌ها با یک معنی‌دار است و نشان می‌دهد که رتبه حیوانات با در نظر گرفتن گروه‌های ژنتیکی در مدل تغییر یافت. بالاترین همبستگی بین ارزش‌های اصلاحی در دو مدل مختلف بین صفات مربوط به شیردهی اول و صفت تولید چربی و زمانیکه گروه ژنتیکی تمام حیوانات در برآوردها بودند (۰/۹۶۹) و کمترین مقدار نیز مربوط به صفت تولید چربی در شیردهی دوم و زمانیکه گروه ژنتیکی همه حیوانات منظور شد (۰/۷۸۱) محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان تغییر در وراثت‌پذیری حاصل از دو مدل، در صفت چربی و در دوره شیردهی دوم می‌باشد که می‌تواند دلیلی بر همبستگی پایین بین ارزش‌های اصلاحی حاصل از دو مدل برای صفت مربوطه باشد. برای کلیه حالات مورد بررسی، با افزایش دوره میزان همبستگی کاهش یافته و بالاترین میزان کاهش مربوط به صفت چربی در دوره دوم شیردهی نسبت به اول بدست آمد و در شیردهی سوم نسبت به دوره دوم افزایش یافت. همچنین تفاوت معنی‌دار بین دو جنس از لحاظ همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن مشاهده شد و برای نرها میزان همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن پایین‌تر از ماده‌ها بود که می‌تواند نشان دهنده تغییر بیشتر در رتبه‌بندی نرها در مقایسه با ماده‌ها باشد.

میزان همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن برای ۸۰ درصد بهترین گاوهای ماده برای صفات مختلف در زایش‌ها و سال‌های تولد متفاوت

جدول ۴- همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن بین مدل ۱ با ۲۱ به تفکیک صفات مختلف و احتمال اختلاف با ۱

Table 4- Spearman's rank correlation between model 1 and 21 separated by different traits and the probability of difference with 1

صفت Trait	دوره شیردهی Lactation period	کل حیوانات Total	P ¹	۱۰ درصد نرها 10% male	P	نرها Male	P	ماده‌ها Female	P	*P
شیر Milk	1	0.965	<0.001	0.919	<0.001	0.955	<0.001	0.966	<0.001	<0.001
	2	0.962	<0.001	0.910	<0.001	0.935	<0.001	0.963	<0.001	<0.001
	3	0.961	<0.001	0.887	<0.001	0.936	<0.001	0.961	<0.001	<0.001
چربی Fat	1	0.969	<0.001	0.926	<0.001	0.935	<0.001	0.970	<0.001	<0.001
	2	0.781	<0.001	0.861	<0.001	0.806	<0.001	0.782	<0.001	<0.001
	3	0.931	<0.001	0.885	<0.001	0.929	<0.001	0.932	<0.001	<0.009
پروتئین Protein	1	0.968	<0.001	0.911	<0.001	0.925	<0.001	0.969	<0.001	<0.001
	2	0.946	<0.001	0.891	<0.001	0.894	<0.001	0.948	<0.001	<0.001
	3	0.905	<0.001	0.826	<0.001	0.864	<0.001	0.906	<0.001	<0.001

P: احتمال وجود اختلاف با یک، *P: احتمال وجود اختلاف بین دو جنس

P: The probability of a difference with one; P*: The probability of a difference between sexes

جدول ۵- همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن هشتاد درصد بهترین گاوهای ماده بین مدل ۱ به تفکیک صفات، سال تولد و احتمال اختلاف آنها با یک
Table 5- Spearman rank correlation for 80% of the best females between Model 1 and 21 separated by birth year and the probability of their difference with one

سال Year	شیر Milk m			چربی Fat			پروتئین Protein		
	1*			2			3		
	80%F**	<P	80%F	80%F	<P	80%F	80%F	<P	80%F
1369	0.878	0.001	0.886	0.001	0.883	0.001	0.805	0.001	0.752
1370	0.953	0.001	0.965	0.001	0.900	0.001	0.858	0.001	0.832
1371	0.954	0.001	0.963	0.001	0.838	0.001	0.908	0.001	0.723
1372	0.958	0.001	0.926	0.001	0.792	0.001	0.918	0.001	0.858
1373	0.970	0.001	0.944	0.001	0.807	0.001	0.903	0.001	0.821
1374	0.979	0.001	0.977	0.001	0.803	0.001	0.942	0.001	0.891
1375	0.969	0.001	0.942	0.001	0.933	0.001	0.886	0.001	0.873
1376	0.985	0.001	0.961	0.001	0.956	0.001	0.921	0.001	0.926
1377	0.989	0.001	0.978	0.001	0.973	0.001	0.947	0.001	0.947
1378	0.985	0.001	0.979	0.001	0.966	0.001	0.929	0.001	0.947
1379	0.989	0.001	0.985	0.001	0.978	0.001	0.946	0.001	0.968
1380	0.988	0.001	0.987	0.001	0.979	0.001	0.959	0.001	0.973
1381	0.991	ns	0.990	ns	0.982	0.001	0.955	0.001	0.979
1382	0.989	0.001	0.987	0.001	0.974	0.001	0.962	0.001	0.988
1383	0.987	0.001	0.983	0.001	0.980	0.001	0.954	0.001	0.989
1384	0.984	0.001	0.985	0.001	0.972	0.001	0.956	0.001	0.980
1385	0.982	0.001	0.982	0.001	0.977	0.001	0.947	0.001	0.982
1386	0.980	0.001	0.987	0.001	0.988	0.001	0.973	0.001	0.986
1387	0.978	0.001	0.987	0.001	0.981	0.001	0.966	0.001	0.981
1388	0.980	0.001	0.979	0.001	0.975	0.001	0.963	0.001	0.987
1389	0.977	0.001	0.983	0.001	0.983	0.001	0.961	0.001	0.986

* اعداد ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دوره شیردهی اول، دوم و سوم را نشان می‌دهد.

** ۸۰ درصد بهترین ماده‌ها (80%F)؛ P احتمال اختلاف با عدد یک؛ ns غیر معنی‌دار

* The numbers 1, 2, and 3 indicate the first, second and third lactation period, respectively.

**80%F: 80% of the best females; P: The probability of difference with one; ns: non- significant

روند ژنتیکی صفات مربوط به دوره شیردهی اول بیشتر از دوره شیردهی دوم و در دوره شیردهی دوم بیشتر از دوره شیردهی سوم بود و بالاترین روند ژنتیکی برآورد شده مربوط به دوره شیردهی اول بود. با وجود برآورد بالاتر روند ژنتیکی صفات با استفاده از مدل دوم، میزان خطای معیار برآوردها نیز در این مدل بالاتر بود. بنابراین در برآورد روندهای ژنتیکی با مدل با گروه‌بندی ژنتیکی، دقت برآورد روندها افزایش نیافته است.

میانگین صحت ارزش‌های اصلاحی برآورد شده برای دو مدل ۱ و ۲۱ برای صفات مختلف در زایش‌های مختلف در جدول ۶ نشان داده شده است. میزان صحت برآورد شده برای مدل ۲۱ (مدل دارای گروه‌بندی ژنتیکی) برای کلیه صفات در سه زایش نسبت به مدل ۱ بالاتر بدست آمد و تفاوت بین دو مدل از لحاظ صحت برآوردی معنی‌دار بود. در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی در مدل آماری روی روند ژنتیکی صفات نیز تاثیر معنی‌داری گذاشت و میزان روند ژنتیکی برآورد شده برای صفات با مدل ۲۱ بالاتر از مدل ۱ بود (جدول ۷).

جدول ۶- میانگین صحت ارزش‌های اصلاحی برآورد شده با دو مدل ۱ و ۲۱ و احتمال اختلاف بین آنها

Table 6- Mean accuracy of estimated breeding values with model 1 and 21, and the probability of the difference between them

صفت	دوره شیردهی	مدل ۱	مدل ۲۱	P-value
Trait	Lactation period	Model 1	Model 21	
شیر Milk	1	0.527	0.542	<0.001
	2	0.520	0.521	0.014
	3	0.478	0.478	0.09
چربی Fat	1	0.525	0.528	<0.001
	2	0.443	0.455	<0.001
	3	0.455	0.462	<0.001
پروتئین Protein	1	0.514	0.526	<0.001
	2	0.479	0.497	<0.001
	3	0.462	0.501	<0.001

جدول ۷- روند ژنتیکی (خطای معیار) صفات مختلف بر اساس مدل ۱ و ۲۱ و احتمال وجود اختلاف بین آنها

Table 7- Genetic trend (standard error) of different traits based on model 1 and 21, and the probability of the difference between them

صفت	دوره شیردهی	مدل ۱	مدل ۲۱	P-value
Trait	Lactation period	Model 1	Model 21	
شیر Milk	1	43.65 (1.904)	63.06 (2.006)	<0.001
	2	42.14 (2.620)	59.60 (2.920)	<0.001
	3	32.18 (1.960)	44.64 (2.440)	<0.001
چربی Fat	1	0.994 (0.045)	1.346 (0.048)	<0.001
	2	0.745 (0.056)	1.095 (0.059)	<0.001
	3	0.695 (0.047)	0.943 (0.058)	<0.001
پروتئین Protein	1	1.194 (0.063)	1.542 (0.065)	<0.001
	2	1.181 (0.089)	1.514 (0.101)	0.012
	3	0.843 (0.068)	1.035 (0.081)	0.043

گله‌های مختلف بستگی به عوامل مختلفی نظیر متفاوت بودن ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، دوره‌های زمانی مختلف برای ارزیابی گله‌ها، فشار انتخاب و برنامه‌های اصلاح نژادی بکار رفته در جمعیت‌های مختلف می‌باشد.

میزان روند ژنتیکی برآورد شده برای صفات وزن یکسالگی و افزایش وزن بعد از شیرگیری در مدل با گروه‌بندی ژنتیکی براساس سال تولد بالاتر از مدل بدون گروه‌بندی ژنتیکی گزارش شد (۳۰). حذف داده‌های عملکردی حیواناتی با والدین نامعلوم از تجزیه و تحلیل‌ها در مقایسه با مدل‌های با گروه‌بندی ژنتیکی باعث کاهش

میزان روند ژنتیکی گزارش شده برای تولید شیر، چربی و پروتئین در گاوهای هلشتاین ایران در تحقیقات مختلف به ترتیب در دامنه ۳۳/۸۴ - ۳۵/۴۴، ۰/۶۴ - ۰/۷۱ و ۱-۰/۹۵ کیلوگرم به ازای هر سال می‌باشد و روندهای ژنتیکی بدست آمده در این تحقیق نسبت به دامنه گزارش شده در تحقیقات دیگر بالاتر بود (۲۵ و ۲۸). روند ژنتیکی برای تولید شیر، چربی و پروتئین در تحقیق ولیر و ازرا (۳۵) به ترتیب ۵۳/۷، ۲ و ۲/۱۵ کیلوگرم گزارش شد که برای تولید شیر پایین‌تر از نتایج تحقیق حاضر و برای تولید چربی و پروتئین بالاتر می‌باشد. تفاوت در مقادیر روندهای ژنتیکی بدست آمده در صفات مذکور در

۲۴ درصد پاسخ به انتخاب می‌شود و این کاهش پاسخ به انتخاب می‌تواند باعث کاهش روند ژنتیکی محاسبه شده برای حیوانات گردد (۳۱).

نتیجه‌گیری کلی

صفات تولیدی (تولید شیر، چربی و پروتئین) با و بدون در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج نشان داد که در نظر گرفتن گروه‌بندی ژنتیکی در مدل باعث کاهش واریانس ژنتیکی افزایشی شده و میزان وراثت‌پذیری برآورد شده در مدل فاقد گروه‌بندی ژنتیکی بالاتر از مدل دوم بود. همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن نشان داد که با وارد کردن گروه‌های ژنتیکی در مدل،

رتبه‌بندی دام‌های نر و ماده تغییر کرده و این تغییر در رتبه حیوانات برای نرها بیشتر از ماده‌ها بود. صحت برآورد ارزش‌های اصلاحی و میزان روند ژنتیکی صفات در مدلی که دارای گروه‌بندی ژنتیکی بود بالاتر از مدل فاقد گروه‌بندی ژنتیکی بدست آمد. شایان ذکر است در صورتی که علاوه بر ارزش اصلاحی، دقت ارزش اصلاحی برآورد شده نیز به عنوان معیار تصمیم‌گیری برای انتخاب حیوانات برتر مورد توجه قرار گیرد، تاثیر استفاده از گروه‌بندی ژنتیکی بیشتر خواهد گردید. بنابراین جهت برآورد دقیق‌تر ارزش‌های اصلاحی و ارزیابی بهتر عملکرد برنامه‌های اصلاحی، گروه‌بندی ژنتیکی برای حیوانات با والدین نامعلوم و وارد کردن آن در مدل تجزیه و تحلیل صفات تولیدی گاوهای هلشتاین کشور ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

- Butler, D. G., B. R. Cullis, A. R. Gilmour, and B. J. Gogel. 2009. ASReml-R reference manual. The State of Queensland, Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane. Available at <http://discoveryfoundation.org.uk/downloads/asreml/release3/asreml-R.pdf>.
- Cantet, R. J., L. R. Schaeffer, and C. Smith. 1992. Reduced animal model with differential genetic grouping for direct and maternal effects. *Journal of Animal Science*, 70(6):1730-1741.
- Casellas, J., J. Piedrafta, and L. Varona. 2007. Bayes factor for testing between different structures of random genetic groups: A case study using weaning weight in Bruna dels Pirineus beef cattle. *Genetic Selection Evolution*, 39:39-53.
- Da, Y., and M. Grossman. 1991. Multitrait animal model with genetic groups¹. *Journal of Dairy Science*, 74(9):3183-3195.
- Dahlin, A., U. N. Khan, A. H. Zafar, M. Saleem, M. A. Chaudhry, and J. Philipsson. 1998. Genetic and environmental causes of variation in milk production traits of Sahiwal cattle in Pakistan. *Animal Science*, 66(2):307-318.
- Famula, T., and L. Van Vleck. 1982. Monte Carlo study of genetic groups in sire evaluation. *Journal of Dairy Science*, 65:1286-1293.
- Florence, P., and D. Lalou. 2004. Should genetic groups be fitted in BLUP evaluation? Practical answer for the French AI beef sire evaluation. *Genetic Selection Evolution*, 36(3):325-345.
- Geldermann, H., U. Pieper, and W. E. Weber. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. *Journal of Animal Science*, 63:1759-1768.
- Golden, B. L., R. M. Bourdon, and W. M. Snelling. 1994. Additive genetic groups for animals evaluated in more than one breed association national cattle evaluation. *Journal of Animal Science*, 72(10):2559-2567.
- Henderson, C. R. 1949. Estimation of changes in herd environment. *Journal of Dairy Science*, 32: 709 (Abstr).
- Henderson, C. R. 1975a. Use of all relatives in intraherd prediction of breeding values and producing abilities. *Journal of Dairy Science*, 58(12):1910-1916.
- Henderson, C. R. 1975b. Use of relationships among sires to increase accuracy of sire evaluation. *Journal of Dairy Science*, 58(11):1731-1738.
- Hickey, J. M., M. G. Keane, D. A. Kenny, A. R. Cromie, and R. F. Veerkamp. 2007. Genetic parameters for EUROP carcass traits within different groups of cattle in Ireland. *Journal of Animal Science*, 85(2):314-321.
- Hickey, J. M., M. G. Keane, D. A. Kenny, A. R. Cromie, H. A. Mulder, and R. F. Veerkamp. 2008. Estimation of accuracy and bias in genetic evaluations with genetic groups using sampling. *Journal of Animal Science*, 86(5):1047-1056.
- Hosseinpour Mashhadi, M., M. R. Nassiri, N. Emam Jomeh Kashan, and R. Vaez Torshizi. 2007. Prediction breeding value and genetic parameter in Iranian Holstein bulls for milk production traits. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (3): 108-112.
- Jafari Torbaghan, M., H. Farhangfar, M. Bashtani, B. Mohammad Nazari, and H. Sarir. 2012. Genetic evaluation of cows for milk protein yield trait using fixed and random regression test day models. *Animal Production Research*, 1(2): 9-20.

- 17- Joaquim, C., J. Piedrafita, and L. Varona. 2007. Bayes factor for testing between different structures of random genetic groups: A case study using weaning weight in Bruna dels Pirineus beef cattle. *Genetic Selection Evolution*, 39(1):39-53.
- 18- Mosharraf, R., J. Shodja, M. Bohlouli, S. Alijani, and S. A. Rafat. 2014. Estimation of (co) variance components and breeding values for test-day milk production traits of Holstein dairy cattle via Bayesian approach. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 30: (1): 15-28.
- 19- Mrode, R. A., and R. Thompson. 2005. *Linear Models for the Prediction of Animal Breeding Values*. 2nd ed. CABI Pub.
- 20- Oliveira Júnior, G. A., J. P. Eler, J. B. S. Ferraz, J. Petrini, E. C. Mattos, and G. B. Mourão. 2013. Prediction of breeding values in beef cattle using different definitions of additive genetic groups. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 14: 277-286.
- 21- Petrini, J., S. F. N. Pertile, J. P. Eler, J. B. S. Ferraz, E. C. Mattos, L. G. G. Figueiredo, and G. B. Mourão. 2015. Genetic grouping strategies in selection efficiency of composite beef cattle (*Bos taurus* × *Bos indicus*). *Journal of Animal Science*, 93(2): 541-552.
- 22- Phocas, F., and D. Laloë. 2004. Genetic parameters for birth and weaning traits in French specialized beef cattle breeds. *Livestock Production Science*, 89:121-128.
- 23- Piermati, C., and L. D. Van Vleck. 1993. Effect of genetic groups on estimates additive genetic variance. *Journal of Animal Science*, 71(1): 66-70.
- 24- Pollak, E. J., and R. L. Quaas. 1983. Definition of group effects in sire evaluation models. *Journal of Dairy Science*, 66(7):1503-1509.
- 25- Razm kabir, M., A. Nejati Javaremi, M. Moradi Shahr Babak, A. Rashidi, and M. Sayadnejad. 2009. Estimation of genetic trend for production traits of Holstein cattle in Iran. *Iranian Journal of Animal Science*, 40(1):7-11 [In Persian].
- 26- Robinson, G. K. 1986. Group effects and computing strategies for models for estimating breeding values. *Journal of Dairy Science*, 69(12):3106-3111.
- 27- Rokouei, M., R. Vaez Torshizi, M. Moradi Shahr Babak, M. Sargolzaei, and A. C. Srensen. 2010. Monitoring inbreeding trends and inbreeding depression for economically important traits of Holstein cattle in Iran. *Journal of Dairy Science*, 93(7): 3294-3302.
- 28- Saheb Honar, M.; M. Moradi Shahr Babak, S. R. Miraei Ashtiani, and M. Bagher Sayad Nezhad. 2010. An Estimation of genetic trend for production traits and a determination of the impact of some factors on it in Iranian Holstein cattle. *Iranian Journal of Animal Science*, 41(2):173-184 [In Persian].
- 29- Sargolzaei, M., H. Iwaisaki, and J. J. Colleau. 2006. CFC: A tool for monitoring geneic diversity. In 8th World Congress on Geneics Applied to Livestock Producion, Belo Horizonte, Brazil.
- 30- Shiotsuki, L., F. F. Cardoso, J. A. Silva, and L. G. Albuquerque. 2013. Comparison of a genetic group and unknown paternity models for growth traits in Nellore cattle. *Journal of Animal Science*, 91(11):5135-5143.
- 31- Sullivan, P. 1995. Alternatives for genetic evaluation with uncertain parentage. *Canadian Journal of Animal Science*, 75:31-36.
- 32- Theron, H., F. Kanfer, and L. Rautenbach. 2002. The effect of phantom parent groups on genetic trend estimation. *South African Journal of Animal Science*, 32:130-135.
- 33- Van der Werf, J. H., and I. J. de Boer. 1990. Estimation of additive genetic variance when base populations are selected. *Journal of Animal Science*, 68(10): 3124-3132.
- 34- Visscher, P. M., and R. Thompson. 1992. Univariate and multivariate parameter estimates for milk production traits using an animal model. I. Description and results of REML analyses. *Genetics Selection Evolution*, 24(5): 415 (Abstr).
- 35- Weller, J. I., and E. Ezra. 2004. Genetic analysis of the Israeli Holstein dairy cattle population for production and nonproduction traits with a multitrait animal model. *Journal of Dairy Science*, 87(5): 1519-1527.
- 36- Westell, R. A., R. L. Quaas, and L. D. Van Vleck. 1988. Genetic groups in an animal model. *Journal of Dairy Science*, 71(5):1310-1318.
- 37- Yaeghoobi, R., A. Doosti, A. M. Noorian, and A. M. Bahrami. 2011. Genetic parameters and trends of milk and fat yield in Holstein: s dairy cattle of West provinces of Iran. *International Journal of Dairy Science*, 6: 142-149.



Genetic Analysis of Production Traits in Iranian Holstein Cows Considering Genetic Grouping

Y. Khaleghi fard¹- M. Rokouei^{2*}- A. Moghimi Esfand Abadi³- H. Faraji-Arough⁴

Submitted: 31-10-2018

Accepted: 12-11-2019

Introduction: The lack of sufficient information in the pedigree of the animals prevents the correct estimation of the breeding values. Henderson proposed a genetic grouping for a more realistic estimation of breeding values for phenotypic records in different years. For these groups, the birth year, the year that the first daughter of the male had recorded, or the year that the male animal was used for insemination were used for grouping. In fact, this grouping was considered for calculating the genetic trend over the years. The incomplete recording of the animals in the population will result in the elimination of true genetic relationships between animals. Although, these animals are considered as the base animal in the analysis, but not born at the same time, and can affect the accuracy of estimated breeding values. The available pedigree information in Iran does not have a good quality index. So that the average of pedigree completeness criterion for Iranian Holstein cows has been reported less than 0.7. Genetic evaluation of Iranian Holstein cows with unknown parents may cause a bias in estimating genetic parameters and breeding values. The use of genetic groups in genetic analysis can partly correct the problem of animals with unknown parents. In this regard, the purpose of this study was to estimate the genetic parameters and breeding values of the production traits (milk, fat, protein) of Iranian Holstein cows with and without genetic grouping in model.

Materials and Methods: In this study, the pedigree of 1555702 heads of the Iranian Holstein cattle from 14623 sires and 697940 dams that collected by Animal breeding center of Iran till 2013, were used. Production traits, including milk, fat and protein corrected for 305 days and twice milking from first to third lactation periods were used to estimate variance components and breeding values. Herds under 100 heads were not considered for analysis and for all production traits; pedigree related to animals with the record was extracted from the general pedigree using CFC software and used. For animals with unknown parents, genetic grouping was performed based on the sex and the birth year. Traits at different lactation periods analyzed with (model 2) and without (model 1) genetic grouping in the model and genetic trend was calculated. Then the accuracy of breeding values and genetic trend of traits obtained from different models were compared with each other. The Spearman rank correlation was used to investigate the change in animal ranking in a result of considering the genetic grouping.

Results and Discussion: The additive genetic variance and their standard error were lower for milk, fat and protein production traits in model with genetic grouping (model 21) than the model without genetic grouping (model 1). The estimated heritability range for milk, fat and protein production in three lactation periods with model 1 was 0.094-0.162, 0.069-0.114, and 0.079-0.123, respectively, that these values were higher than model 21 in terms of magnitude. Spearman rank correlation between the estimated breeding values with model 1 and 21 was significantly different from 1, indicating a change in animal rank with consideration of genetic grouping in the model. The spearman rank correlation was lower for males than females, suggesting a higher change in male animal's rank than females. The average accuracy estimated breeding values with model 21 was higher than model 1 and the average accuracy difference was significant between two models. The genetic trend in the first, second and third lactation periods with the model 21 was estimated 63.06, 59.60 and 44.64 for milk production, 1.346, 1.095 and 0.943 for fat and 1.542, 1.514 and 1.035 kg per year for protein, which were higher than the estimates of model 1.

1- MSc graduated of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, University of Zabol.

2-Associate Professor of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science and Bioinformatics, University of Zabol.

3-Senior Expert of the Animal Breeding Center of Iran, karaj.

4-Assistant Professor of Genetics and Animal Breeding, Research Center of special domestic animal, University of Zabol.

(*- Corresponding Author Email: rokouei@uoz.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.76344

Conclusion: The results showed that consideration of genetic grouping in the model reduced the additive genetic variances of traits and the heritability estimated were higher without consideration of genetic grouping. The significance of the Spearman rank correlation indicates that the rank of males and females changed by inserting genetic groups into the model and change in the animal's rank for males was higher than females. The high accuracy of estimated breeding values and the genetic trends of traits in the model with genetic grouping suggests that genetic grouping for animals with unknown parents has been done and entered into the model in order to more accurately estimate the breeding values and to better reflect the performance of the breeding programs.

Keywords: Genetic grouping, Genetic trend, Holstein, Spearman correlation.



مقاله علمی - پژوهشی

آنالیز بیوانفورماتیکی اثر پروتئین و پپتیدهای زیست فعال آلفا S1 کازئین شیر انسان بر مهار آنزیم ACE و مقایسه آن با گونه های مختلف پستانداران

حجت الله یامی^۱ - مجتبی طهمورث پور^{۲*} - مرجان ازغندی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

چکیده

فشار خون بالا یک عامل خطرناک برای بیماری های قلبی-عروقی از جمله بیماری عروق کرونر قلب و سکتاهای مغزی محسوب می شود. در بدن انسان سیستمی بانام سیستم رنین-آنژیوتنسین تنظیم فشار خون را برعهده دارد که آنزیم مبدل آنژیوتنسین ACE نقش مهمی در افزایش فشارخون دارد. پپتید کازئوکلینین از پروتئین آلفا S1 کازئین شیر مشتق شده است و دارای خاصیت مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون می باشد. هدف از انجام این پژوهش، شناسایی پروتئین آلفا S1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال مهارکننده آنزیم ACE در شیر انسان و همچنین مقایسه آن با چند گونه مختلف از پستانداران می باشد. جمع آوری داده های ژنومی و پروتئینی برای هشت گونه مختلف پستانداران (گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسان، گاو میش و خوک) از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) صورت گرفت و پس از آن پیش بینی پپتیدهای زیست فعال پروتئین آلفا S1 کازئین و ساختار سه بعدی آن ها با کمک نرم افزارهای آنالیز I-TASSER.ACCLUSTERServer و GalaxyWEB انجام شد. شبیه سازی برهمکنش (داکینگ) پروتئین های آلفا S1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکلینین با آنزیم مهارکننده آنژیوتنسین ACE در درون سلول با استفاده از نرم افزار آنالیز ClusPro2.0 انجام شد. نتایج آنالیز بیوانفورماتیکی پروتئین آلفا S1 کازئین شیر انسان با سایر پستانداران نشان داد که شیر "شتر" از لحاظ خواص فیزیوشیمیایی شبیه ترین شیر به انسان است. همچنین در بررسی برهمکنش مولکولی این پروتئین و پپتیدهای زیست فعال آن در هشت گونه مختلف از پستانداران مشخص شد که شیر "شتر" بعد از شیر انسان بیشترین عملکرد در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون را دارد. با توجه به شباهت ساختار این پپتید در پروتئین آلفا S1 کازئین شیر انسان و شتر در کنار خاصیت ضد فشار خونی آن می توان شیر شتر را به عنوان جایگزین مناسب برای شیر انسان در تغذیه و کمک به درمان فشارخون و بیماری های قلبی بیماری معرفی کرد. همچنین از این پپتید می توان به عنوان افزودنی های غذایی فراسودمند و طبیعی، جایگزین مناسب برای داروهای سنتزی ضد فشارخون استفاده کرد.

واژه های کلیدی: آنزیم مبدل آنژیوتنسین ACE، برهمکنش مولکولی، پروتئین آلفا S1 کازئین

مقدمه

آنژیوتنسین I- وارد شش شده و در آنجا بوسیله آنزیم ACE به آنژیوتنسین II- یعنی شکل فعال تر آن تبدیل می شود. آنزیم های آنژیوتنسین I- و II قطر عروق خونی را کاهش می دهند و بدین ترتیب فشار خون را بالا می برند. بنابراین هر ترکیبی که بتواند از فعالیت این سیستم یا آنزیم ACE جلوگیری کند به درمان فشار خون کمک می نماید (۵ و ۱۱). شیر به عنوان یک ماده غذایی ارزشمند، تأمین کننده مواد مغذی مورد نیاز برای سلامت بدن از جمله کلسیم، فسفر، پروتئین و ریبوفلاوین می باشد. شیر غنی از پروتئین هایی با کیفیت بالا می باشد که دارای ویژگی های تغذیه ای، عملکردی و بیولوژیکی بی نظیری هستند (۲۰). پروتئین های ویژه شیر شامل ۴ کازئین (آلفا S1، آلفا S2، گاما و کاپا) و ۲ آب پنیر (آلفا لاکتالبومین و بتا لاکتوگلوبولین) می باشد که از این میان کازئین یکی از پروتئین های اصلی شیر می باشد که حدود ۸۰ درصد از کل پروتئین های شیر را به

فشار خون بالا یک عامل خطرناک برای بیماری های قلبی-عروقی از جمله بیماری عروق کرونر قلب و سکتاهای مغزی محسوب می شود. در بدن انسان سیستمی با نام سیستم رنین-آنژیوتنسین تنظیم فشار خون را برعهده دارد. آنژیوتنسین I- پروتئینی است که از پیش سازی با نام آنژیوتنسینوژن در کبد ساخته و به خون رها می شود. در خون آنزیم رنین این پیش ساز را به آنژیوتنسین I- تبدیل می کند.

۳ و ۱- دانشجوی دکترای ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) ایمیل نویسنده مسئول: m_tahmoorepur@yahoo.com

CSN1S1 و جدول ۲ توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین در هشت گونه مختلف از پستانداران (گاو، گوسفند، شتر، اسب، انسان، گاو میش و خوک) را نشان می‌دهد که از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (WWW.NCBI.COM) استخراج شده‌اند. توالی‌های استفاده شده در این پژوهش اکثر از نوع توالی‌های مرجع^۵ می‌باشند که بلندترین و کوتاه‌ترین قطعه پپتیدی به ترتیب مربوط به خوک و انسان می‌باشد.

خواص فیزیکی و شیمیایی

آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب دوستی و آب‌گریزی و همچنین بار الکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکیپین در هشت گونه مختلف از پستانداران با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 5 انجام شد.

مقایسه هم ردیف توالی‌های پروتئین

مقایسه هم ردیف^۶ توالی‌های پروتئین آلفا s1 کازئین برای هشت گونه مختلف از پستانداران با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 5 انجام شده است. پیش بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیست فعال در ۸ گونه مختلف از پستانداران

ابتدا با بررسی سوابق تحقیق، توالی پپتیدهای ثبت شده برای کازئوکیپین از مقالات مختلف استخراج شد (۷، ۱۱ و ۱۹) و سپس براساس آنالیزهای بیوانفورماتیکی در نرم افزار CLC Main Workbench 5 و همچنین با استفاده از نرم افزارهای آنالیز ACCLUSTER Server و PeptiMap Server، SPRINT جایگاه‌های فعال پروتئین‌ها که احتمال تبدیل شدن به یک پپتید زیست فعال را دارد برای هر هشت گونه مختلف از پستانداران شناسایی گردید و در پایان فایل PDB برای تمامی توالی‌های پپتیدی با استفاده از نرم افزار PYMOL تهیه و ذخیره شد (۲۹).

پیش بینی و مقایسه ساختار سه بعدی

ساختار سوم (سه بعدی) پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکیپین با استفاده از روش بندکشی شده (Threading) پیش بینی شد. براساس این روش پس از استخراج توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکیپین، ساختار سه بعدی پروتئین‌ها و پپتیدهای مورد نظر برای هشت گونه از پستانداران با استفاده از نرم افزاری آنالیز I-TASSER

خود اختصاص می‌دهد (۱۴، ۱۸، ۲۴). پژوهش‌های متعددی بر روی ژن کازئین در پستانداران انجام شده است، اما هیچ کدام نقش آن در کاهش فشار خون را مورد بررسی قرار نداده‌اند (۲، ۱۵، ۱۸، ۲۴). از طرفی، پروتئین آلفا s1 کازئین یکی از پروتئین‌های خانواده کازئین می‌باشد که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای بالا، دارای ویژگی‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی از جمله کاهش فشار خون و مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE)^۱ می‌باشد (۱).

پپتیدهای زیست فعال^۲ در توالی پروتئین اصلی بصورت غیرفعال قرار دارند و طی هضم شیر در دستگاه گوارش یا تخمیر شیر توسط باکتری‌های پروتئولیتیک و یا هیدرولیز توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک آزاد می‌شوند. بسیاری از این پپتیدها دارای چندین فعالیت زیستی هستند. کازئین موجود در شیر یا سایر فرآورده‌های لبنی مثل پنیر منبع غنی پپتیدهای زیست فعال هستند. پپتیدهای بدست آمده از کازئین از قبیل پپتیدهای اپیوئیدی، پپتیدهای ضد پرفشاری خون^۳، کازئین فسفوپپتیدها و گلیکوماکروپپتیدها نقش‌های فیزیولوژیکی گوناگونی از جمله مهم‌ترین آن تنظیم و کاهش فشار خون از طریق مهار آنزیم ACE ایفا می‌کنند (۲۵ و ۲۷).

تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای مشتق شده از پروتئین کازئین آلفا S1 شیر، با نام کازئوکیپین^۴ دارای خاصیت مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون می‌باشد (۸ و ۱۷). مطالعات زیادی بر روی رابطه ی بین ساختار و فعالیت مهار آنزیم ACE پپتیدهای مهار کننده ی این آنزیم انجام شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که انتهای C این پپتیدها نقش مهمی در اتصال آنها به آنزیم ACE دارد. همچنین این بررسی‌ها نشان می‌دهد که این پپتیدها در انتهای C خود دارای آمینواسیدهای آبگریز مانند تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و پرولین هستند و توانایی بالایی در مهار آنزیم ACE از خود نشان می‌دهند (۱۳).

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتنسنین (ACE) در شیر انسان و همچنین مقایسه آن با گونه‌های مختلف از پستانداران بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌های ژنومی و پروتئینی

پروتئین آلفا s1 کازئین توسط ژن CSN1S1 در موجودات مختلف کدگذاری شده است. جدول ۱ توالی نوکلئوتیدی ژن

- 1- Angiotensin Converting Enzyme
- 2- Bioactive Peptides
- 3- Antihypertensive Peptides (ACE Inhibitors)
- 4- Casokinins

- 5- Refrence Sequences
- 6- alignment

GalaxyWEB پیش بینی و برای بررسی پایداری پروتئین و پپتیدها در شرایط دینامیکی (شرایط درون سلول) از نرم افزارهای آنالیز YASARA Energy Minimization و 3Drefine استفاده گردید (۲۳، ۲۵، ۳۰ و ۳۲).

جدول ۱- طول توالی نوکلئوتیدی ژن CSN1S1 و شماره دسترسی آن در بانک اطلاعاتی

Table 1- Nucleotide sequence length of CSN1S1 gene and its access number in the database

گونه پستاندار Mammalian species	طول توالی Sequence Length	شماره دسترسی بانک اطلاعاتی Database Access Number
گاو BOS	645 bp	NM_181029
بز CAPRA	642 bp	NM_001285695
گوسفند OVIS	633 bp	NM_001009795
شتر CAMELUS	669 bp	NM_001303566
اسب EQUASS	639 bp	NM_001081883
انسان HOMO	567 bp	NM_001890
گاو میش BUBALUS	633 bp	FJ392261
خوک CAVIA	668 bp	XM_023564129

جدول ۲- طول توالی اسید آمینه پروتئین آلفا s1 کازئین و بانک اطلاعاتی استخراج شده

Table 2- Sequence Length of the amino acid sequence of alpha protein s1 casein and extracted database

گونه پستاندار Mammalian species	طول توالی Sequence Length	شماره دسترسی بانک اطلاعاتی Database Access Number
گاو BOS	214 aa	NP_851372
بز CAPRA	213 aa	NP_001272624
گوسفند OVIS	206 aa	NP_001009795
شتر CAMELUS	222 aa	NP_001290495
اسب EQUASS	212 aa	NP_001075352
انسان HOMO	185 aa	NP_001881
گاو میش BUBALUS	206 aa	ACJ14317
خوک CAVIA	251 aa	XP_023419897

پروتئین و پپتیدهای آلفا s1 کازئین از سایت PDB^۱ استخراج شد. با بررسی منابع مختلف جایگاه فعال^۲ آنزیم ACE که شامل قطعه ۳۲ اسید آمینه‌ای با توالی (HEMG.... EAIGD) استخراج شد (۶).

نتایج و بحث

آنالیز خواص فیزیکوشیمیایی

آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر، آب دوستی و آب گریزی و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین در هشت گونه مختلف از پستانداران در جداول شماره ۳ و ۴ آورده شده است. همانطور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، از لحاظ مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی بین پروتئین شیر انسان با سایر

سپس برای ارزیابی دقت پیش بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله در نرم افزار آنالیز (Ramachandran Plot Analysis) RAMPAGE و SAVES v5.0 مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت بهترین ساختارهای پیش بینی شده انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی برهمکنش پروتئین‌ها (داکینگ)

برای بررسی اثرات متقابل پروتئین‌های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین با آنزیم ACE و همچنین شبیه سازی این برهمکنش‌ها در درون سلول از نرم افزار آنالیز ClusPro2.0 (<https://cluspro.bu.edu/>) استفاده شد و با توجه به شرایط مختلف از جمله موقعیت مناسب و حداقل انرژی مورد نیاز برای اتصال پروتئین‌ها، نتایج برای انتخاب بهترین اتصال مورد بررسی قرار گرفتند (۴). همچنین فایل PDB آنزیم مبدل آنژیوتنسن ACE (با شماره دسترسی 1O8A) برای بررسی اثرات متقابل آن با

1-Protein Data Bank

2-Active Site

پستانداران، بیشترین تشابه مربوط به شیر "شتر" و کمترین آن مربوط به شیر "گاو میش" می باشد. بنابراین می توان گفت شیر شتر از لحاظ خواص فیزیکیوشیمیایی شبیه ترین شیر به انسان بوده و می تواند منبع جایگزین مناسبی برای شیر انسان در تغذیه کودکان باشد. تحقیقات لی و همکاران (۲۰۰۴)، نشان می دهد اتصال پپتیدها به آنزیم مبدل آنژیوتنسن وابسته به انتهای کربوکسیل پپتید است و پپتیدهای دارای اسید آمینه های آگریز در این بخش مهارکننده های قوی تری می باشند. این اسید آمینه ها در حقیقت با جایگاه فعال آنزیم برهمکنش می دهند. از طرفی این تحقیقات خبر از مؤثر بودن اسید آمینه بیشتر تریپتوفان، شامل آروماتیک های تایروزین و فنیل آلانین و همچنین پرولین برای برهمکنش می دهند. نسبت آمینواسیدهای آبدوست/آگریز در توالی پپتیدها نقش کلیدی در میزان فعالیت بازدارندگی ایفا می کند زیرا آمینواسیدهای آبدوست دسترسی

پپتید به سایت فعال آنزیم را محدود می سازند (۱۲).

با بررسی خواص فیزیکیوشیمیایی پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین برای هشت گونه مختلف از پستانداران، مشخص شد که بیشترین فراوانی اسید آمینه های تیروزین و پرولین که سبب ایجاد خاصیت آگریزی در پروتئین و پپتیدها می شود مربوط به شیر "شتر، گاو و گاو میش" و کمترین آن مربوط به "گوسفند و بز" می باشد که نشان می دهد خاصیت ضد فشار خون و مهارکنندگی فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسن (ACE) در شیر این گونه از پستانداران بیشتر از سایرین می باشد. زیرا با توجه به نتایج آزمایشگاهی در تحقیقات لی و همکاران (۲۰۰۴) نشان داده شده است که اسید آمینه های آگریز مانند تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و پرولین توانایی بالایی در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون دارد (۱۲).

جدول ۳- مقایسه خواص فیزیکیوشیمیایی پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین در ۸ گونه از پستانداران

Table 3- Comparison of the physico-chemical properties of alpha-s1 protein casein and Casokinin peptide in 8 species of mammals

آنالیز analyze	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMELUS		گاو میش BUBALUS		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein	پپتید pepti de	پروتئین protein
وزن Weight(kDa)	1.1	21.6	0.6	24.5	0.9	24.1	0.9	23.3	1.1	25.8	0.6	23.4	0.8	25.3	1	28.9
نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	5.5	5.5	5.2	5.18	9.9	5.28	9.9	5.67	5.5	5.23	5.7	5.9	5.6	6.24	3.4	7.8
نیمه عمر half time	2.8	30	5.5	30	1.3	30	1.3	30	2.8	30	5.5	30	0.8	30	2.8	30
وضعیت آبدوستی Hydrophilic	5	66	2	55	3	63	3	56	5	59	2	54	3	61	4	70
وضعیت آبگریزی Hydrophobic	3	75	4	101	3	100	3	99	4	97	4	304	3	84	3	120

با توجه به نتایج تحقیق یاماموتو و همکاران (۱۹۹۴)، وجود اسید آمینه پرولین در پپتیدهای مؤثر بر فشار خون بسیار ضروری می باشد. زیرا این پپتیدها می بایست در برابر آنزیم های هضمی در معده مقاوم باشند تا به روده رسیده و از آن طریق جذب شوند و فعالیت های مهار آنزیم ACE را انجام دهند که وجود اسید آمینه پرولین در ساختار این پپتیدها سبب پایداری آنها در برابر آنزیم های هضمی می گردد (۳۱). از این رو براساس جدول شماره ۴، از میان پپتیدهای زیست فعال شناسائی و پیش بینی شده در هشت گونه از پستانداران مورد مطالعه ما، کازئوکینین مربوط به شیر "شتر" به دلیل داشتن پرولین بیشتر نسبت به سایر گونه ها از پایداری بیشتری برخوردار می باشد. بنابراین

خاصیت ضد فشار خون بیشتری نسبت به سایر پستانداران دارد و کازئوکینین اسب به دلیل نداشتن پرولین دارای کمترین مقاومت و پایداری بوده و احتمال هیدرولیز آن در محیط معده بسیار بالاست. همچنین نتایج حاصله از آنالیز خواص فیزیکیوشیمیایی پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین برای هشت گونه مختلف از پستانداران نشان می دهد که در محیط با PH پایین فعالیت پروتئین و پپتیدهای انسان بیشتر از سایر گونه های می باشد.

مقایسه هم ردیف توالی های پروتئین

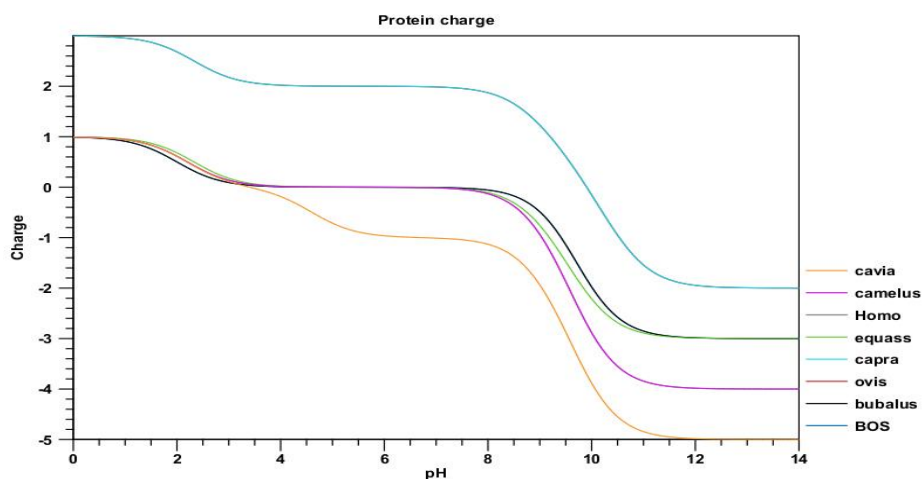
براساس آنالیز بیوانفورماتیکی مشخص شد که بیشترین درصد

تشابه توالی اسید آمینه پروتئین آلفا S1 کازئین در پستانداران مختلف با انسان مربوط به اسب و شتر و کمترین درصد تشابه مربوط به گاو میش و بز است. مقایسه هم ردیف توالی های پروتئین آلفا S1

جدول ۴- مقایسه وضعیت اسید آمینه در ۸ گونه از پستانداران

Table 4- Comparison of amino acid status in 8 species of mammals

اسید آمینه Amino Asid	انسان HOMO		گاو BOS		بز CAPRA		گوسفند OVIS		شتر CAMELUS		گاو میش BUBALUS		اسب EQUASS		خوک CAVIA	
	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein	پپتید peptide	پروتئین protein
آلانین Alanine	-	12	1	12	-	15	-	14	-	9	1	12	1	13	-	19
سیتونین Cysteine	-	4	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	6
آسپار تیک اسید Aspartic Asid	-	3	-	7	-	7	-	7	-	12	-	7	-	7	-	6
گلو تامیک اسید Glutamic Asid	-	20	-	25	-	20	-	19	-	24	-	20	-	25	1	18
فنیل آلانین Phenilalanine	-	4	1	8	-	7	-	6	-	5	1	8	1	6	-	10
گلا یسین Glycine	-	1	-	9	-	9	-	9	-	6	-	11	-	۰	1	6
هیستیدین Histidine	-	3	-	5	-	4	-	4	-	5	-	4	-	7	-	13
ایزولوسین Isolecsine	1	8	-	12	-	9	-	12	-	12	-	12	-	13	-	8
لیزین Lysine	-	6	-	15	2	13	2	15	-	14	-	12	-	15	-	9
لوسین Lecsine	-	17	1	22	1	22	1	22	-	23	1	22	1	22	-	27
متیونین Methionine	1	8	-	6	-	6	-	6	1	5	-	7	-	5	-	9
آسپارژین Asparagine	-	15	-	8	1	12	1	10	-	7	-	7	-	8	-	7
پرو لین Proline	1	14	1	17	1	19	1	17	2	19	1	18	-	14	1	23
گلو تامین Glutamine	2	17	-	14	1	14	1	14	2	15	-	17	1	22	1	26
آرژنین Arginine	-	12	-	6	-	6	-	6	-	11	-	5	-	13	-	15
سرین Serine	-	16	-	16	-	18	-	18	-	16	-	14	-	14	-	16
نین [ترئو Teronine	-	5	-	6	-	7	-	4	-	9	-	5	-	6	-	8
والین Valine	-	9	-	13	1	11	1	11	1	1	-	1	-	1	1	16
تریپتوفان Tryptophan	-	2	-	2	-	2	-	2	-	3	-	2	-	2	-	2
تیروزین Tyrosine	3	9	2	10	1	11	1	9	3	11	2	10	2	10	3	7



شکل ۱- بارالکتریکی و PH پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین در ۸ گونه پستانداران
Figure 1- Charge and pH of alpha-protein s1 casein and Casokinin peptide in 8 species of mammals

جدول ۵- درصد تشابه و اختلاف اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین در ۸ گونه مختلف از پستانداران

		1	2	3	4	5	6	7	8
گاوبوس BOS	1		55	40	72	256	254	347	398
گاو میش BUBALUS	2	91.63		78	86	280	272	356	410
بز CAPRA	3	93.80	88.13		49	253	259	340	403
گوسفند OVIS	4	89.04	89.91	92.54		285	288	331	384
شتر CAMELUS	5	62.90	59.77	63.33	62.02		218	319	407
اسب EQUASS	6	62.09	59.70	61.34	57.71	67.56		296	385
انسان HOMO	7	49.12	47.95	49.39	50.52	53.43	54.95		412
خوک CAVIA	8	46.36	45.41	45.69	47.18	45.37	46.97	42.22	

شباهت مربوط به اسب می‌باشد (۹ درصد) که در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.

پیش بینی و مقایسه ساختار سه بعدی

با استفاده نرم افزارهای آنالین I-TASSER و GalaxyWEB براساس توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین آلفا s1 کازئین استخراج شده برای تمامی گونه‌های مختلف از پستانداران ساختار سه بعدی پیش بینی گردید. سپس برای ارزیابی دقت پیش بینی‌ها و انتخاب بهترین ساختار سه بعدی، تمامی فایل‌های PDB حاصله از نرم افزار آنالین RAMPAGE (Ramachandran Plot Analysis) استفاده شد.

طبق این نرم افزار، تمامی اسید آمینه‌های موجود در ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدهای پیش‌بینی شده در نواحی مختلف مورد ارزیابی قرار می‌گیرند و در صورتی که درصد دقت تخمین ساختار

پیش بینی و مقایسه هم ردیف پپتید زیست فعال در ۸ گونه مختلف از پستانداران

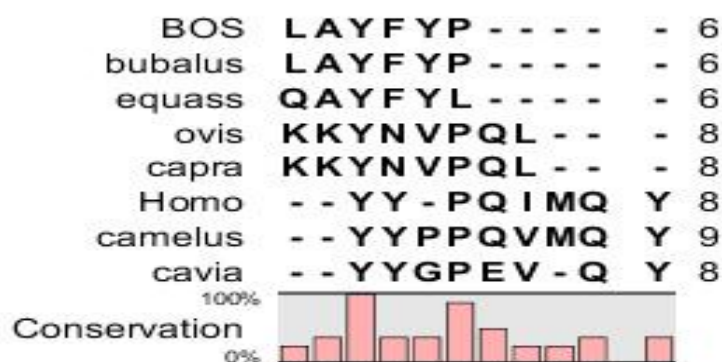
از طریق بررسی منابع موجود، توالی پپتید کازئوکینین برای سه پستاندار (انسان، گاو و گوسفند) استخراج و براساس موقعیت قرارگیری آن‌ها برای سایر گونه‌های پستانداران توالی پپتیدی پیش بینی شد و با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی ساختار سه بعدی توالی‌های مورد نظر پیش بینی گردید و از میان ساختارهای مورد نظر بهترین پیش بینی براساس حداقل انرژی و شرایط دینامیکی انتخاب گردید و بصورت فایل PDB برای آنالیزهای پپتیدی ذخیره شد. توالی‌های پپتیدی کازئوکینین در گونه‌های مختلف پستانداران در جدول شماره ۶ نشان داده شده است.

براساس مقایسه هم ردیف پپتید کازئوکینین، بیشترین شباهت پپتید کازئوکینین با انسان مربوط به شتر (۷۸ درصد) و کمترین

مورد نظر در نظر بالای ۹۰ درصد باشد می توان گفت که ساختارهای پروتئین و پپتیدهای موثر بر کاهش فشار خون در ساختار ثانویه کازئین در ۸ گونه از پستانداران پیش بینی شده از دقت کافی برای استفاده در آنالیز داکینگ مولکولی برخوردار می باشد.

جدول ۶- پپتیدهای موثر بر کاهش فشار خون در ساختار ثانویه کازئین در ۸ گونه از پستانداران
Table 6- Antihypertensive peptides in the secondary structure of casein in 8 species of mammals

گونه	نام پپتید	توالی پپتیدی	قطعه اسید آمینه	منابع
Species	peptide name	Peptide sequence	Amino acid segment	References
گاو (homo)	Casokinins	136-143	YYPQIMQY	13
انسان (bos)	Casokinins	142-147	LAYFYYP	19
گوسفند (ovis)	Casokinins	102-109	KKYNVPQL	8
گاو میش (bubalus)	Casokinins	142-147	LAYFYYP	Predicted in this study
بز (capra)	Casokinins	102-109	KKYNVPQL	Predicted in this study
اسب (equass)	Casokinins	142-147	QAYFYLY	Predicted in this study
شتر (camelus)	Casokinins	136-143	YYPPQVMQY	Predicted in this study
خوک (cavia)	Casokinins	136-143	YYGPEVQY	Predicted in this study



شکل ۲- مقایسه هم ردیف پپتید کازئوکینین در ۸ گونه از پستانداران
Figure 2- Multiple sequence alignment of Casokinin peptide in 8 species of mammals

پروتئین-پروتئین نظیر نرم افزار آنلاین ClusPro2.0 صورت گرفت. براین اساس میزان انرژی و موقعیت اتصال پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای کازئوکینین با آنزیم ACE مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج براساس فرمول زیر در جدول زیر نشان داده شده است (۹ و ۱۰).

$$E = 0.40E_{\text{asp}} \pm 0.40E_{\text{att}} + 600E_{\text{elec}} + 1.00E_{\text{DARS}}$$

نتایج بررسی موقعیت و انرژی اتصال نشان می دهد که مناسب ترین موقعیت اتصال که در آن پروتئین و پپتید کازئوکینین با بیشترین انرژی به جایگاه فعال آنزیم متصل شده است مربوط به شیر انسان است و در مقایسه با سایر پستانداران، شیر "شتر" از لحاظ این خاصیت بسیار به شیر انسان نزدیک می باشد. همچنین این نتایج تأیید می کند که ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدهای مورد نظر در قدرت اتصال آن ها با جایگاه فعال آنزیم ACE موثر بوده است زیرا شکل

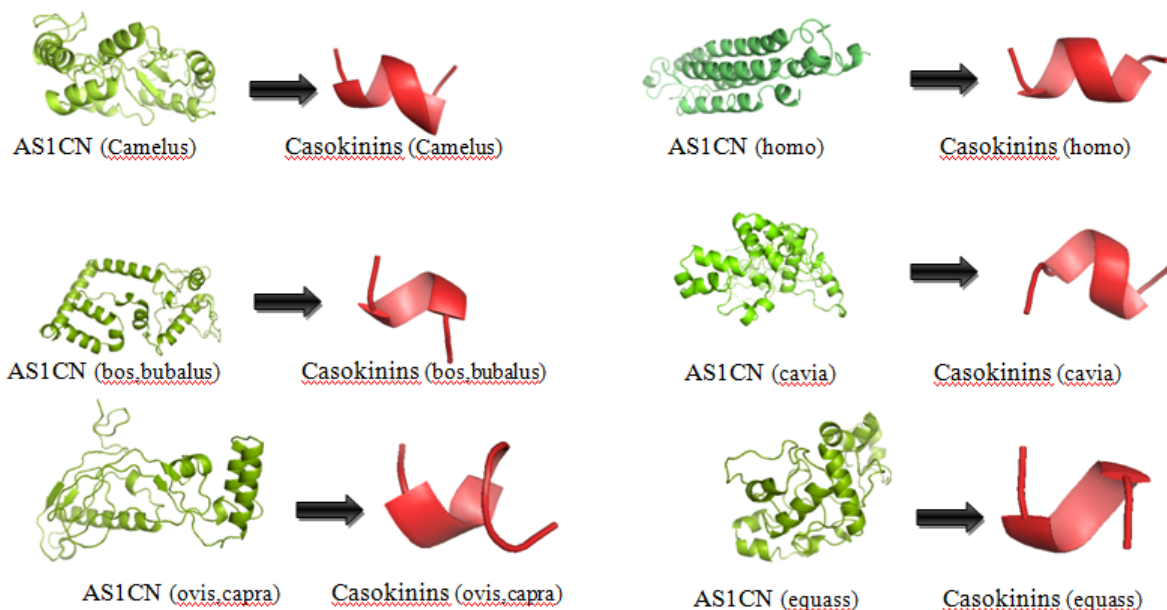
نتایج دقت ساختار پروتئین و پپتیدهای مورد نظر در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصله می توان پیش بینی کرد که آرایش فضائی (ساختار سه بعدی) پروتئین و پپتیدهای اثر زیادی بر خاصیت ضد فشار خون آن ها خواهد داشت بطوریکه ساختار صحیح از پروتئین یا پپتید باعث می شود تا برهمکنش مناسبی (اتصال قوی با جایگاه فعال آنزیم ACE) ایجاد شود و در نتیجه آن مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون را به دنبال خواهد داشت.

بررسی برهمکنش (داکینگ) پروتئین ها و پپتیدهای شناسائی شده با آنزیم ACE

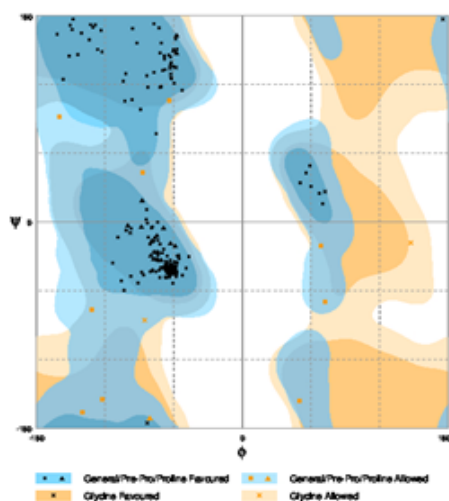
بررسی عملکرد پروتئین های آلفا s1 کازئین و پپتیدهای کازئوکینین شناسائی شده برای هشت گونه مختلف از پستانداران و مقایسه نتایج آن با شیر انسان در مهار آنزیم ACE و کاهش فشار خون با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مختص داکینگ

بینی کرد که شیر "شتر" بعد از شیر انسان بیشترین عملکرد در مهار آنزیم ACE را خواهد داشت اما اثبات این موضوع نیاز به انجام آزمایشات تکمیلی دارد.

فضایی پپتید کازئوکینین در انسان و شتر بسیار مشابه است و این تشابه در ساختار ضایی بخوبی در نتایج حاصل از داکینگ مولکولی مشاهده می شود. بنابراین براساس نتایج بیوانفورماتیکی می توان پیش



شکل ۳ - ساختار سه بعدی پیش بینی شده برای پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتید کازئوکینین
Figure 3- The predicted three-dimensional structure for alpha-protein s1 casein and Casokinin peptide



Evaluation of residues

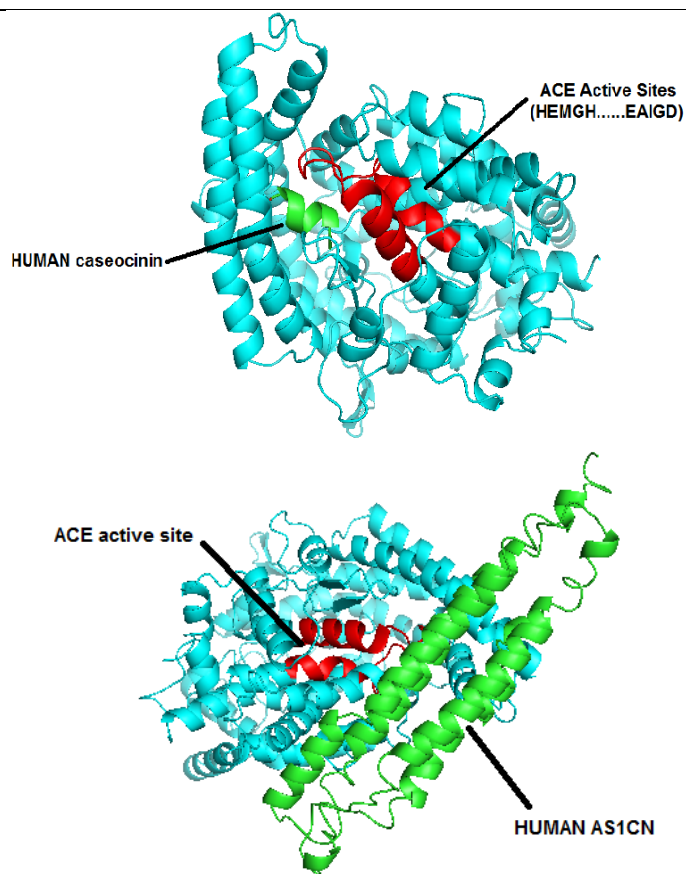
Residue [A 11 :ALA]	(-139.65,-165.98)	in Allowed region
Residue [A 22 :LYS]	(72.43, -69.76)	in Allowed region
Residue [A 112 :ASN]	(-122.30,-154.66)	in Allowed region
Residue [A 114 :PRO]	(-80.76,-170.94)	in Allowed region
Residue [A 144 :GLY]	(-85.34, -85.65)	in Allowed region
Residue [A 159 :GLN]	(68.82, -20.93)	in Allowed region
Residue [A 164 :ASP]	(-131.52, -76.52)	in Allowed region
Residue [A 173 :TYR]	(-63.83, 105.86)	in Allowed region
Residue [A 176 :LEU]	(-86.98, 43.05)	in Allowed region
Residue [A 177 :GLY]	(147.43, -18.24)	in Allowed region
Residue [A 191 :ASN]	(-159.78, 91.70)	in Allowed region
Residue [A 201 :THR]	(50.02,-156.13)	in Allowed region
Number of residues in favoured region	(~98.0% expected)	: 192 (94.1%)
Number of residues in allowed region	(~2.0% expected)	: 12 (5.9%)
Number of residues in outlier region		: 0 (0.0%)

شکل ۴ - بررسی نتایج ساختار سه بعدی پروتئین و پپتیدها پیش بینی شده در پلات رام-چاندران
Figure 4- The results of three-dimensional structure of protein and peptides predicted in the Rama-Chandran Plate

جدول ۷- مقایسه انرژی اتصال برای برهمکنش های پروتئین و پپتیدهای در ۸ گونه مختلف پستانداران

Table 7- Comparison of binding energy for protein and peptide interactions in 8 different mammalian species

گونه Species	- ΔG (kcal/mol)	
	Isracidin	AS1CN
انسان (homo)	-631.4	-850.4
گاو (bos)	-563.5	-777.6
گوسفند (ovis)	-378.3	-904
گاو میش (bubalus)	-563.5	-778.2
بز (capra)	-378.3	-827.3
اسب (equass)	-555.6	-825.9
شتر (Camelus)	-659.7	-808.6
خوک (cavia)	-492.5	-859



شکل ۵- موقعیت فضایی برهمکنش پروتئین آلفا S1 کازئین و پپتید کازئینین انسان با جایگاه فعال آنزیم ACE

Figure 5- Situation of the interaction between proteins $\alpha s1$ and casein and human Casokinin peptide with Active site of the ACE enzyme

پس در نهایت با توجه به نتایج بیوانفورماتیکی می توان پیش بینی نمود که پروتئین آلفا S1 کازئین و محصولات حاصل از هیدرولیز

می‌باشد. پپتید زیست فعال کازئوکینین دارای ترکیبات دارویی می‌باشد که می‌تواند در درمان فشار خون و بیماری‌های قلبی مورد استفاده قرارگیرد. همچنین براساس نتایج حاصل از این پژوهش بر روی پپتیدهای کازئوکینین در موجودات مختلف مشخص شد که شیر شتر دارای بالاترین خاصیت ضد فشار خون و مهار آنزیم ACE بوده و به دلیل بالا بودن شباهت ساختاری این پروتئین در شیر شتر با شیر انسان، می‌تواند منبع جایگزین مناسبی برای تغذیه انسان باشد. بنابراین پپتیدهای کازئوکینین می‌توانند به عنوان افزودنی‌های غذایی فراسودمند و طبیعی، جایگزین مناسبی برای داروهای سنتزی ضد فشار خون باشند.

آن (پپتید زیست فعال کازئوکینین) از طریق کاهش عوامل خطر ساز بروز بیماری‌های قلبی عروقی از قبیل مهار فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتنسن (ACE) و فشار خون در پیشگیری از بروز و پیشرفت بیماری‌های قلبی عروقی نقش دارند و از میان شیر پستانداران بالاترین خاصیت مربوط به شتر می‌باشد و با توجه به شباهت آن با شیر انسان می‌تواند منبع مناسبی برای تغذیه انسان باشد.

نتیجه‌گیری کلی

پروتئین آلفا s1 کازئین و پپتیدهای زیست فعال کازئوکینین به دلیل خواص بیولوژیکی فراوان و از جمله آن خاصیت ضد فشار خون و مهار آنزیم ACE در سلامتی بدن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار

منابع

1. Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *Journal of Nutrition*, 134(4): 89-95.
2. Alinaghizadeh, R., M. R. Mohammad Abadi, And S. Moradnasab Badrabadi. 2007. Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (23): 4291-4294.
3. Bhattacharya, D., J. Nowotny., R. Cao, And J. Cheng. 2016. 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. *Nucleic Acids Research*, 8(44): 406-409.
4. Comeau, S. R., D. W. Gatchell., S. Vajda, And C. J. Camacho. 2004. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1): 45-50.
5. Cordopatis, P. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(1): 403-429.
6. Georgios, A., G. Spyroulias., S. Athanassios., P. George., M. Z. Evy, and C. Paul. 2004. Structural Features of Angiotensin-I Converting Enzyme Catalytic Sites: Conformational Studies in Solution, Homology Models and Comparison with Other Zinc Metallopeptidases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(3): 403-429.
7. Gomez-Ruiz, J. A., M. Ramos, And I. Recio. 2002. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12(8): 697-706.
8. Hata, Y., M. Yamamoto., M. Ohni., K. Nakajima., Y. Nakamura, And T. Takano. 1996. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5): 767-771.
9. Kozakov, D., D. Beglov., T. Bohnuud., S. Mottarella., B. Xia., D. Hall, And R. S. Vajda. 2013. How good is automated protein docking?. *Journal of Proteins*, 8(12): 2159-2166.
10. Kozakov, D., D. R. Hall., B. Xia., K. A. Porter., D. Padhorny., C. Yueh., D. Beglov, And S. Vajda. 2017. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2): 255-278.
11. Kim, Y. K., S. Yoon., D. Y. Yu., B. Lönnnerdal, And B. H. Chung. 1999. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *Journal Dairy Research*, 66(4): 431-9.
12. Li, G. H., G. W. Le., Y. H. Shi, And S. Shrestha. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24(7): 469-486.
13. Nakamura, Y., N. Yamamoto., K. Sakai., A. Okubo., S. Yamazaki, And T. Takano. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal Dairy Science*, 78(4): 777-783.
14. Madureira, A. R., C. I. Pereira., A. Gomes., M. E. Pintado, And M. F. Xavier. 2007. Bovine whey proteins-Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10): 1197-211.
15. Mahmoodi, M., A. Ayatollahi, And M. R. Mohammadabadi. 2018. Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 9(3): 119-128.
16. Miller, G. D., J. K. Jarvis, And L. D. McBean. 2007. Handbook of dairy foods and nutrition. 3rd Edition. CRC press: Taylor & Francis group, 6: 1-55.

17. Mizuno, S., K. Matsuura., T. Gotou., S. Nishimura., O. Kajimoto, And M. Yabune. 2005. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94(1): 84-91.
18. Mohammadi, A., M. R. Mohammadabadi, H. Mirzaei., A. Baghizadeh., O. Dayani., M. Asadi Fozi, And V. Bahrampoor. 2009. Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 16 (2): 125-132.
19. Pihlanto, A, And H. Korhonen. 2005. Bioactive peptides and proteins. *International Dairy Journal*, 16(9): 945-960.
20. Playne, M., L. Bennett, And G. Smithers. 2003. Functional dairy foods and ingredients. *Aust J Dairy Technol*, 58(3):242-64.
21. Restani, P., C. Ballabio., C. Di Lorenzo., S. Tripodi, And A. Fiocchi. 2009. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Analitical and Bioanalitical Chemistry*, 395(1): 47-56.
22. Rival, S. G., C. G. Boeriu, And H. J. Wicher. 2000. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties Peroral calcium dosage of infants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1): 295-302.
23. Roy, A., A. Kucukural, And Y. Zhang. 2010. a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4): 725-738.
24. Sulimova, G. E., M. A. Abani., J. Rostamzadeh., M. R. A. Mohammad, And O. E. Lazebnyĭ. 2007. Allelic polymorphism of kappa-casein gene (CSN3) in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. *Genetika*, 43(1): 88-95.
25. Shah, N. P. 2000. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*, 84(1): 3-10.
26. Shin, W. H., G. R. Lee., L. Heo., H. Lee, and C. Seok. 2014. Prediction of Protein Structure and Interaction by GALAXY protein modeling programs. *BioDesign - Nature Science*, 2(1): 1-11.
27. Suetsuna, K., H. Ukeda, And H. Ochi. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal Nutrition Biochemistry*, 11(3): 128-131.
28. Tonstad, S, And K. L. Smerud. 2002. A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1): 78-84.
29. Yan, C., X. Xu., X. Zou. 2017. The Usage of ACCLUSTER for Peptide Binding Site Prediction. *Modeling Peptide-Protein Interactions: Methods and Protocols*, 5(1): 3-9.
30. Yang, J ., R. Yan., A. Roy., D. Xu., J. Poisson, And Y. Zhang. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1): 7-8.
31. Yamamoto, N., A, And. T. Takano. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, 77(4): 917-22.
32. Zhang , Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1): 1-8.



Bioinformatics Analysis of Human Milk Protein and Bioactive Peptides alpha s-1 casein Effect on Inhibiting ACE Enzyme and Comparing to Different Mammalian Species

H. A. Yami¹- M. Tahmoorespur^{2*} - M. Azghandi¹

Submitted: 23-07-2018

Accepted: 09-11-2019

Introduction: High blood pressure is a dangerous risk factor for cardio-vascular disease, including coronary artery disease and strokes. In the human body, a system called renin-angiotensin system regulates blood pressure, in which the angiotensin converting enzyme ACE plays an important role in increasing blood pressure. Angiotensin I as a converting enzyme (ACE) catalyzes the conversion of angiotensin I to vasoconstrictor angiotensin II, and also inactivates the antihypertensive vasodilator bradykinin. Inhibition of ACE mainly results in an overall antihypertensive effect. Peptides derived from food proteins can have angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting properties. Casein protein in milk or other dairy products such as cheese is a rich source of bioactive peptides. Bioactive peptides are inactive in the main protein sequence and are released in during milk digestion or milk fermentation by proteolytic bacteria or hydrolysis by proteolytic enzymes. Many of these peptides have several biological activities. Casein-derived peptides, such as opioid peptides, antihypertensive peptides, casein phosphopeptides and glycomacropetides have various physiological roles, including adjusting and lowering blood pressure by inhibiting angiotensin converting enzyme (ACE). Caseocinin peptide has been derived from the casein Alpha S1 protein It has an ACE-inhibiting enzyme inhibitor and low blood pressure.

The purpose of this study was to identify the alpha S1 protein casein and bioactive peptides of the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor in human milk and compare it with different species of mammals.

Materials and Methods: At first, genomic and protein data for eight different species of mammals (cattle, sheep, camels, horses, humans, ewes and pigs) was collected from the National Center for Bioinformatics Information (NCBI). Physico-chemical properties analysis (atomic state, isoelectric point, half-life, hydrophobicity hydrophilicity, barometric and pH) and - Multiple sequence alignment of of alpha-s1 casein and the bioactive peptides of Casokinin in 8 species of mammals was done using CLC Main Workbench 5 software. Then, the prediction of bioactive peptide alpha s1 casein and its three-dimensional structure was done with the help of the online software ACCLUSTER Server, I-TASSER and GalaxyWEB. The simulation of the Molecular interaction (docking) of alpha-s1 casein and the bioactive peptides of Casokinin with angiotensin converting enzyme ACE in the cell was done using ClusPro 2.0 software online.

Results and Discussion: the results of bioinformatics analysis of human milk protein with other mammals showed that camel milk has the most similar physicochemical properties of milk to humans and can be a good alternative to human milk in feeding children. The highest and least percentage of amino acid sequence amino acids in alpha-secl casein in different mammals with humans respectively is related to camel and Goat. The results of the determination of the position and energy of the connection show that the most suitable binding location with maximum energy is related to human and camel milk. Among the bioactive peptides identified and predicted in eight species of mammals, due to having more proline amino acid in Caseocinin peptide, the camel milk is more resistant than other species. Therefore, the antihypertensive effect in camel milk is greater than other mammals. According to the results, it can be predicted that three-dimensional structure of protein and peptides will have a great effect on antihypertensive properties and it causes a good interaction with the active site of the angiotensin converting enzyme (ACE) and thus inhibits the ACE enzyme and lowers blood pressure. Investigating the performance of alpha S1 protein casein and Caseocinin peptide identified for eight different species of mammals And comparing its results with human milk in inhibiting ACE enzyme With Molecular interaction (Docking) Protein's Bioinformatics Software showed that milk of camels after human milk

1-Ph.D. student, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Corresponding author: m_tahmoorespur@yahoo.com

has the highest performance in Reducing the risk factors for cardiovascular disease such as inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) and blood pressure in preventing the development and progression of cardiovascular disease.

Conclusion: the alpha S1 protein casein and Caseocinin peptide have many biological properties and are very important in the health of the body. It can be said that camel milk is the most similar to human-like physico-chemical properties and It can be a good alternative to human milk in feeding children. The bioactive Caseocinin peptide has pharmaceutical compounds that can be used to treat high blood pressure and heart disease. Therefore, this peptide can be used as superbenefit and natural additives, an appropriate replacement to antihypertensive drugs.

Keywords: alpha s1 casein Protein angiotensin, converting enzyme ACE, molecular interactions.



مقاله علمی - پژوهشی

تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه‌های گوشتی

حمیدرضا سیدآبادی^{۱*} - خدیجه نصیری^۲ - زهرا رودباری^۳ - سیدعبدالله حسینی^۴ - ابوالفضل اکبری^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۳

چکیده

متیونین اولین اسید آمینه محدودکننده‌ای است که نقش مهمی در متابولیسم پروتئین و عملکرد سیستم ایمنی در جوجه‌ها دارد. اینترفرون گاما ($IFN\gamma$) یکی از اجزا گروه سایتوکاین‌های ایمنی اختصاصی و عامل مهم فعال‌کننده‌ی ماکروفاژها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف اسید آمینه متیونین بر عملکرد سیستم ایمنی و بیان ژن $IFN\gamma$ در جوجه‌های گوشتی سویه آرین می‌باشد. به این منظور در این مطالعه با استفاده از ۴۸۰ قطعه جوجه در دوره رشد (۱۴-۲۸ روزگی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ سطح اسید آمینه متیونین (۰/۲۹، ۰/۳۶، ۰/۴۳، ۰/۵۰، ۰/۵۷ و ۰/۶۴)، ۴ تکرار و ۲۰ جوجه در هر تکرار انجام شد. شاخص‌های مورد مطالعه شامل بررسی ایمنی همورال، اندازه‌گیری سلول‌های خونی و میزان بیان ژن $IFN\gamma$ بود. به منظور بررسی بیان ژن $IFN\gamma$ ابتدا کل RNA از بافت کبد استخراج و پس از ساخت cDNA، میزان بیان ژن با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن $IFN\gamma$ در سطوح مختلف اسید آمینه متیونین اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها نشان داد ($p \leq 0/05$)، بطوریکه بیان ژن $IFN\gamma$ با افزایش سطوح مصرف متیونین، از ۰/۲۹ درصد به ۰/۴۳ به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش ولی تفاوت معنی‌داری بین سطوح متیونین ۰/۵۷ و ۰/۶۴ درصد مشاهده نشد. شاید یکی از دلایل افزایش بیان ژن $IFN\gamma$ بکارگیری سطوح مناسب متیونین در تیمارهای آزمایشی و بهره‌مندی از مزایای سطوح مناسب متیونین به منظور افزایش عملکرد سیستم ایمنی در پرنده باشد، هرچند که تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بدون چالش عوامل بیماری‌زا انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، جوجه گوشتی، ژن $IFN\gamma$ ، سیستم ایمنی.

مقدمه

جهت جلوگیری از کاهش تولید، امری ضروری می‌باشد. با ادامه تهدید بروز بیماری‌های مختلف و نگرانی در رابطه با استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها در تولیدات حیوانی، یافتن روش‌های جایگزین مناسب، ایمن و عملی، برای جلوگیری یا کنترل پاتوژن‌ها به طور جدی و مبرم مورد نیاز می‌باشد. تعیین شیوه‌های جدید برای طرح ریزی روش‌های درمانی ایمنولوژیکی یا درمان ضد میکروبی برای کاهش پاتوژن‌های میکروبی در طیور، بیشتر از همیشه مورد نیاز است. درمان ایمنولوژیکی برای کاهش پاتوژن‌های میکروبی در طیور، هم برای صنعت طیور و هم برای خریداران، دارای ارزش بالایی می‌باشد. فرموله کردن جیره خوراکی براساس اسید آمینه‌ها منجر به تأمین نیاز واقعی طیور می‌گردد و باعث صرفه‌جویی اقتصادی خواهد شد (۲). متیونین که به عنوان اولین اسید آمینه محدود کننده در خوراک-های تجاری شناخته شده است در تولید آنتی‌بادی نیز مهم است (۱۰). متیونین به عنوان یک پیش‌ماده برای سنتز دیگر اسیدهای آمینه

بیماری‌های ویروسی و باکتریایی برای صنعت طیور تهدید بزرگی محسوب می‌شوند، بطوریکه پیشگیری و کنترل عوامل بیماری‌زا در

۱- استادیار موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران.

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۴- استاد موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۵- دانش آموخته دکتری گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران.

*- ایمیل نویسنده مسئول: hseyedabady@gmail.com

سولفوردار به ویژه سیستمین و چندین متابولیت دیگر عمل می کند که شامل گلوکاتایون، کوآنزیم A، تائورین و سولفور غیرآلی می باشد (۱۲). در دسترس بودن اسیدهای آمینه بر وضعیت پاسخ ایمنی تأثیر دارد که وابسته به افزایش DNA و سنتز پروتئین در طی تکثیر لنفوسیت ها و سنتز آنتی بادی ها می باشد (۱۲). بنظر می رسد در خلال یک پاسخ ایمنی، اجزای جیره خوراکی اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر روی شدت و اثرگذاری پاسخ ایمنی خواهد داشت. برخی موجب افزایش و برخی دیگر موجب کاهش شدت پاسخ ایمنی می شوند. لذا هنگام فرمولاسیون جیره هایی که برای سیستم ایمنی اپتیمم هستند، توجه به نوع مواد مغذی بالاخص اسیدهای آمینه در این راستا ضروری می باشد (۱۰). مطالعات نشان داده اند که متیونین اثرات سودمندی روی سیستم ایمنی دارد و پاسخ ایمنی همورال و سلولی را بهبود می بخشد (۱۰). مکمل سازی جیره های خوراکی با متیونین معمولاً برای اطمینان از عملکرد مناسب در متابولیسم پروتئین و عملکرد ایمنی ضروری می باشد. متیونین مانند سایر اسید آمینه، جزئی از پروتئین های بافت است، بنابراین به عنوان پایه ای برای سنتز پروتئین عمل می کند. علاوه بر این متیونین در متابولیسم گروه متیل شرکت می کند که هر دو مسیر ترانس متیلاسیون و ری متیلاسیون را شامل می شود (۱۳) و (۱۴). کمبود متیونین می تواند منجر به تغییرات پاتولوژیکی و فراساختاری در تیموس، کاهش مقادیر اینترلوکین ۲ (IL-2) سرم و جمعیت سلول های T و باعث اختلال در عملکرد پرولیفراتیو سلول های T و افزایش درصد آپوپتوز سلول های طحال شود (۲۰). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد متابولیت متیونین، گلوکاتایون، مسیر فاکتور رونویسی هسته kB، عملکرد سلول T کمک کننده و تولید آنتی بادی و اینترفرون گاما را در پاسخ به چالش های ایمنی تنظیم می کند (۹). بنابراین، دخالت متیونین در عملکرد ایمنی احتمالاً مربوط به سنتز آنتی بادی ها، سایتوکین ها و سایر مواد سیتوتوکسیک و همچنین تنظیمات بیان ژن، مسیرهای سیگنال دهی و وضعیت اکسیداتیو احیا سلولی می باشد (۹). در جوجه ها نیاز متیونین برای مصونیت بهینه بالاتر از نیاز برای رشد یا تبدیل غذایی است. یکی از مکانیسم های پیشنهادی برای توضیح تداخل متیونین در سیستم ایمنی بر پایه تکثیر سلول های ایمنی است که حساس به تغییرات داخل سلولی در سطوح گلوکاتایون و سیستمین می باشند؛ ترکیباتی که در متابولیسم متیونین سهیم می باشند. محدودیت اسیدهای آمینه سولفوردار منتج به کاهش لنفوبیدی شدید در بافت ها روده ای و آستر مخاط می شود (۱۸). متیونین مورد نیاز در جیره آغازین طیور نباید کمتر از ۰/۵ درصد باشد. با این وجود، توصیه شده است که برای رشد بهینه ۰/۳ درصد متیونین نیاز است. بدون در نظر گرفتن کل اسیدهای آمینه گوگرد دار، سطح متیونین جیره به بیش از ۰/۷ درصد برسد عملکرد و رشد طیور کاهش می یابد. میزان احتیاجات متیونین برای مراحل آغازین، رشد و پایانی بستگی به سرعت رشد پرند دارد که این میزان می تواند تحت تأثیر

سن جوجه و سطح انرژی جیره نیز قرار گیرد (۱۶).

اینترفرون ها (IFNs) پروتئین های طبیعی هستند که به وسیله سلول های سیستم ایمنی مهره داران تولید می شود و مسئولیت آنها مبارزه با عوامل خارجی از قبیل ویروس ها، انگل ها و تومورها می باشد. اینترفرون ها به گروه بزرگی از گلیکوپروتئین ها تعلق دارند که سایتوکین نام دارند. اینترفرون ها با جلوگیری از رونویسی ویروسی در سلول های میزبان، فعال کردن سلول های کشنده طبیعی و ماکروفاژها و افزایش مقاومت سلول ها به آلودگی ویروسی به پاسخ ایمنی کمک می کنند. یکی از انواع اینترفرون ها، اینترفرون گاما می باشد. اینترفرون گاما تقویت کننده سیستم ایمنی بوده و با اثر فعال کنندگی فاگوسیت ها باعث از بین بردن میکروارگانیسم هایی مانند اسیتوفیلوکوک / اورئوس، توکسوپلازما گوندی، لیشمانیا دونووانی، لیستریا مونوسیتوژنر و مایکوباکتریوم / اویوم در داخل سلول ها می شود (۱۷).

با توجه به اینکه سطح مناسب متیونین جیره باعث افزایش رشد می شود و برای ایجاد حداکثر پاسخ ایمنی ضروری است و همچنین متیونین برای افزایش عملکرد سلول های T تولید شده از تیموس مورد نیاز می باشد و از طرفی با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای بر روی اثرات سطوح مختلف متیونین جیره بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه های گوشتی سویه آرین در دوره رشد انجام نشده است، مطالعه حاضر اثرات سطوح مختلف متیونین را بر بیان ژن اینترفرون گاما در جوجه های گوشتی سویه آرین در دوره رشد مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش ها

گروه های آزمایشی، شرایط پرورش و تغذیه

این مطالعه در سالن مرغداری مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در کرج انجام گرفت. قبل از ورود جوجه ها آماده سازی سالن و مراحل شستشو، ضد عفونی و گازدهی انجام گرفت. در این مطالعه از ۴۸۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه تجاری آرین استفاده شد. جوجه ها به ۶ گروه آزمایشی مشتمل بر ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۲۰ قطعه جوجه گروه بندی شدند. شرایط دما، نور و ترکیب جیره برای تمامی جوجه ها یکسان بود و جوجه ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در زمان شروع پرورش، جیره ی آغازین (۱-۱۴ روزگی) به صورت یکسان در اختیار تمامی جوجه ها قرار گرفت، اما میزان متیونین خوراک در دوره رشد (۱۵-۲۸ روزگی) در تکرارهای مختلف متفاوت بود. جیره های آزمایشی (جدول ۱)، براساس ترکیبات اندازه گیری شده در آزمایشگاه و با احتساب مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ارائه شده در جدول (NRC 1994) با استفاده از برنامه UFFDA تنظیم شد (جدول ۲). اختلاف در سطوح متیونین جیره در دوره رشد شامل ۰/۲۹، ۰/۳۶، ۰/۴۳، ۰/۵۰، ۰/۵۷ و ۰/۶۴ درصد بود.

جدول ۱- مواد خوراکی مورد استفاده در جیره گروههای آزمایشی در دوره رشد

مواد خوراکی Ingredients	سطح متیونین					سطح متیونین (۰/۵۷) Met Level 0.57(%)					سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)				
	سطح متیونین (۰/۲۹) Met Level 0.29(%)	سطح متیونین (۰/۴۶) Met Level 0.36(%)	سطح متیونین (۰/۴۳) Met Level 0.43(%)	سطح متیونین (۰/۵) Met Level 0.50(%)	سطح متیونین (۰/۵۷) Met Level 0.57(%)	سطح متیونین (۰/۵) Met Level 0.50(%)	سطح متیونین (۰/۴۳) Met Level 0.43(%)	سطح متیونین (۰/۴۶) Met Level 0.36(%)	سطح متیونین (۰/۵) Met Level 0.50(%)	سطح متیونین (۰/۵۷) Met Level 0.57(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)	سطح متیونین (۰/۶۴) Met Level 0.64(%)
ذرت Corn	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97	36.97
کنجاله سویا Soybean meal	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4	37.4
نشاسته ذرت Corn starch	5.54	5.87	6.2	6.53	6.86	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
روغن سویا Soybean oil	1.79	1.75	1.72	1.68	1.64	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61	1.61
گندم Wheat	15	14.63	14.26	13.89	13.52	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16	13.16
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63
صدف Calcium carbonate (CaCO ₃)	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
نمک NaCl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
جوش شیرین Sodium bicarbonate	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
دی ال - متیونین DL-Methionin	-	0.07	0.14	0.21	0.28	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
ال - لیزین L-Lysine	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
مکمل معدنی ^۱ Mineral supplements ¹	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
مکمل ویتامینی ^۲ Vitamin supplements ²	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

مکمل مواد معدنی در هر کیلوگرم خوراک مقدار زیر را تأمین می نمود. منگنز (اکسید منگنز) ۱۰۰ میلی گرم، آهن (سولفات آهن H₂O) ۵۰۰ میلی گرم، روی (اکسید روی) ۱۰۰ میلی گرم، مس (سولفات مس (H₂O) ۱۰ میلی-گرم، ید (یدات کلسیم) ۱ میلی گرم، سلنیوم (سدیم سلنیت) ۲ میلی گرم.
^۲ مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم خوراک مقدار زیر را تأمین می نمود. ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین B_۱، ۱/۸ میلی گرم، ویتامین B_۲، ۶/۶ میلی گرم، ویتامین B_۶، ۳۰ میلی گرم، کلسیم پانتوتات، ۱۰ میلی گرم، ویتامین B_{۱۲}، ۳ میلی گرم، فولیک اسید ۱ میلی گرم، ویتامین B_{۱۲}، ۰/۱۵ میلیگرم، بیوتین ۱/۱ میلیگرم، ویتامین D_۳، ۲۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E، ۱۸ واحد بین المللی، ویتامین K_۳، ۲ میلی گرم، کولین کلراید ۵۰۰ میلی گرم.
^۱ The mineral premix supplied per kilogram of diet: Manganese (manganese oxide) 100 milligrams, Iron (iron sulfate H₂O) 50 mg, zinc (zinc oxide) 100 mg, copper (copper sulfate H₂O) 10 mg, iodine (calcium iodine) 1 mg, selenium (sodium selenite) milligrams.
^۲ The vitamin premix supplied per kilogram of diet: vitamin A as acetate, 9000 IU; Vitamin B₁, 1.8 milligrams, Vitamin B₂, 6.6 mg, Niacin, 30 milligrams, Calcium pantothenate, 10 milligrams, Vitamin B₆, 3 milligrams, Folic acid 1 milligram, Vitamin B₁₂, 0.015 mg, Biotin 0.1 mg, Vitamin D₃, 2000 IU, Vitamin E, 18 IU, Vitamin K₃, 2 mg, Choline Chloride 500 mg.

جدول ۲- آنالیز مواد مغذی جیره گروه‌های آزمایشی

Table 2- Nutrient analysis of diet in the experimental groups

سطوح متیونین Met levels	متیونین (Met) 0.29(%)	متیونین (Met) 0.36(%)	متیونین (Met) 0.43(%)	متیونین (Met) 0.5(%)	متیونین (Met) 0.57(%)	متیونین (Met) 0.64(%)
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم) Metabolisable energy, Kcal/kg	2900	2900	2900	2900	2900	2900
پروتئین خام (درصد) Crude protein(%)	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
کلسیم (درصد) Calcium(%)	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
فسفر قابل دسترس (درصد) Available Phosphorus (%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
سدیم (درصد) Sodium (%)	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167
متیونین + سیستین (درصد) Methionine+cysteine(%)	0.65	0.72	0.79	0.86	0.93	1
لیزین (درصد) Lysine(%)	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16
آرژنین (درصد) Arginine (%)	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41	1.41
ایزو لوسین (درصد) Iso Loucine (%)	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
لوسین (درصد) Leucine(%)	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72
ترئونین (درصد) Threonine(%)	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
تریپتوفان (درصد) Tryptophan (%)	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27

دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. نمونه‌های سرم خون جهت خنثی شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند و در ادامه برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند (IgG+IgM) از روش هم‌آگلوتیناسیون میکروتیتر توسط روش آزمایشگاهی که توسط محققین (۱۹) شرح داده شده است، انجام شد.

شمارش گلبول‌های قرمز خون

جهت شمارش گلبول‌های قرمز از روش دستی با استفاده از لام هموسیتمومتر نتوبار و میکروسکوپ نوری استفاده شد و نتیجه برحسب تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌مترمکعب خون محاسبه گردید. جهت رقیق نمودن خون از محلول رقیق کننده نات^۱ و هریک^۲ استفاده شد.

جیره‌ها از لحاظ میزان انرژی قابل سوخت و ساز، نیتروژن، تعادل الکترولیت ها (Na+K-CL) و سایر مواد مغذی یکسان بودند به طوری که تنها عامل متغیر میزان متیونین موجود در جیره‌ها بود. جیره‌های آزمایشی از لحاظ سایر آمینواسیدها ضروری براساس نسبت ایده آل آمینواسید به آمینواسید مرجع (لیزین) که توسط فیشر در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد شده است تنظیم شد. همچنین مقدار سیستمین جیره‌ها بالاتر از سطح نیاز تأمین شد تا از تبدیل متیونین به سیستمین جلوگیری شود.

تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند

به منظور ارزیابی سیستم ایمنی در روزهای ۲۱ و ۳۵ از دوره پرورش به سه قطعه از هر گروه آزمایشی از طریق عضله سینه مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند (۰/۵ درصد) تهیه شده در بافر فسفات استریل تزریق شد و یک هفته بعد از هر تزریق از همان جوجه‌های گوشتی یک میلی‌لیتر خون از ورید بال گرفته شد. سرم خون با قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰

1 - Natt

2 - Herrik

شد. تعیین میزان هماتوکریت نیز توسط روش آزمایشگاهی که توسط محققین (۱۵) شرح داده شده است، انجام شد.

بیان ژن IFN γ

به منظور بررسی بیان نسبی ژن IFN γ در سن ۲۸ روزگی دوره پرورش تعداد ۴ قطعه پرنده از هر تیمار آزمایشی انتخاب شده و بعد از کشتار، نمونه‌هایی از بافت کبد جدا و نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در ادامه، استخراج RNA کل از بافت کبد طبق دستورالعمل کیت استخراج SV Total RNA Isolation System (پرومگا، آمریکا) صورت گرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و نانودراپ صورت گرفت. در ادامه، RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI عاری از RNase از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA پاکسازی شد. برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت ترمو فیشر (آمریکا) (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. از هر نمونه ۲ میکروگرم از RNA کل جهت سنتز cDNA استفاده شد. طراحی آغازگرها به منظور بررسی بیان ژن IFN γ در جوجه‌های گوشتی با استفاده از نرم‌افزار Primer premier نسخه ۵ (پرایمر بایوسافت، آمریکا) انجام شد و توسط شرکت سیناکلون (ایران) ساخته شد. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن IFN γ در جدول ۳ نشان داده شده است.

مواد مورد استفاده جهت ساخت محلول فوق عبارتند از: NaCl (۳/۸۸ گرم)، Na₂SO₄ (۲/۵ گرم)، Na₂HPO₄ 12H₂O (۲/۹۱ گرم)، KH₂PO₄ (۰/۲۵ گرم)، فرمالین ۳۷ درصد (۷/۵ میلی لیتر) و متیل و لوله (۰/۱ گرم) که در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و پس از صاف کردن با کاغذ صافی تا ۲۴ ساعت قابل استفاده است.

شمارش تفریقی گلبول های سفید

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید به طریق تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا و شمارش زیر میکروسکوپ انجام شد. به این ترتیب که قطره خون در یک سانتیمتری انتهای لام هموسایتومتر قرار داده شد. لبه لام دیگر بر روی قطره خون قرار گرفت. بعد از خشک شدن گستره خونی، خون خشک شده روی لام توسط متانول ثابت شد. بعد از خشک کردن مجدد، لام هموسایتومتر برای رنگ‌آمیزی آماده شد. رنگ گیمسا به نسبت ۱:۱۰ رقیق (۱ میکرولیتر رنگ + ۹ میکرولیتر آب) شد و سپس لام هموسایتومتر داخل آن قرار گرفت. شمارش گلبول‌های سفید (هتروفیل و لنفوسیت) زیر میکروسکوپ نوری و به روش شمارش با چشم انجام شد (۶).

تعیین درصد حجمی گلبول قرمز (هماتوکریت)

در این آزمایش در ۲۸ روزگی از هر تکرار دو قطعه جوجه به طور تصادفی انتخاب کرده و با استفاده از لوله های موئینه‌ای که در داخل این لوله‌ها آغشته به ماده ضد انعقاد هپارین بود از پرنده‌ها خون گرفته

جدول ۳- توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای بیان ژنهای IFN γ و GAPDH
Table 3- Sequence of specific primers used for GAPDH and IFN γ gene expression

ژن Gene	توالی‌های آغازگر Primer sequences	شماره دسترسی Accession Number	دمای اتصال Annealing Temperature	طول محصول Product length
IFN γ	F 5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3' R 5'-GGCTTTGCGCTGGATTTC-3'	NM_205149.1	۶۰°C	۲۵۹ جفت باز 259 bp
GAPDH	F 5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTAT-3' R 5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'	NM_204305.1	۶۰°C	۲۶۴ جفت باز 264bp

ها در دستگاه Lightcycler96 (رش، آلمان) با برنامه حرارتی زیر جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن IFN γ قرار داده شدند. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ برای ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ برای ثانیه انجام شد. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها رسم شد. در پژوهش حاضر، تغییرات نسبی بیان ژن IFN γ نسبت به ژن GAPDH (ژن مرجع) نرمال شد. در ادامه بیان نسبی ژن IFN γ نسبت به GAPDH به روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ محاسبه شد

جهت انجام واکنش Real Time PCR از کیت SYBER Green qPCR Master Mixes ساخت شرکت ترمو فیشر (آمریکا) استفاده شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix SYBER Green® ROX qPCR (2X)، ۰/۷۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکو مول)، ۱ میکرولیتر cDNA الگو و ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. هر واکنش به صورت ۳ تکرار صورت گرفت. به منظور تهیه نمونه کنترل منفی برای انجام واکنش Real Time PCR به تیوپ دیگر، به جای cDNA آب دوبار تقطیر اضافه گردید و در ادامه نمونه-

لنفوسیت تحت تأثیر سطوح مختلف متیونین قرار نگرفت ($p>0.05$). اما تعداد گلبول‌های قرمز تحت تأثیر سطوح مختلف متیونین قرار گرفت ($p<0.05$) به طوری که بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز مربوط به سطح متیونین ۰/۲۹ و کمترین آن مربوط به ۰/۵۷ بود.

با توجه به اینکه تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بدون چالش‌های بیماری‌زا و غیره انجام شد، بنابراین سطوح مختلف متیونین جیره تأثیری در فراسنجه‌های ایمنی نداشتند.

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های RNA استخراج شده در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده ۱/۸-۱/۹ بود و حضور باندهای ۱۸s و ۲۸s در شکل ۱A که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده بود. نتایج منحنی تکثیر Real Time PCR محصولات PCR روی ژل آگارز نشان دادند که ژن IFN γ و GAPDH در بافت کبد تکثیر شده است. صحت تکثیر قطعات ژنی IFN γ و GAPDH در شکل ۱B نشان داده شده است. مشاهده تک باند در محدوده‌ی ۲۵۹ جفت باز برای ژن IFN γ و در محدوده‌ی ۲۶۴ جفت باز برای ژن GAPDH در مورد همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر می‌باشد.

(۱۱). در روش فوق فرض بر این است که بازدهی ژن‌های مورد نظر نزدیک به ۱۰۰ درصد است و برای این منظور از منحنی استاندارد استفاده می‌شود. در این روش رقت‌های مختلفی از cDNA تهیه و برای آن‌ها Real time PCR گذاشته می‌شود.

تحلیل آماری داده‌ها

کل اطلاعات بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز گردید (SAS Institute 2003). برای مقایسه میانگین‌ها گروه‌های آزمایشی از آزمون تعقیبی توکی و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

نتایج و بحث

یافته‌های مربوط به شاخص فراسنجه‌های ایمنی همومورال در جدول ۴ ارائه شده است. طبق یافته‌ها پاسخ به گلبول قرمز گوسفندی، ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین M تحت تأثیر سطوح مختلف متیونین قرار نگرفت ($P>0.05$).

نتایج مربوط به ایمنی سلولی در جدول ۵ درج شده است. طبق نتایج، گلبول‌های سفید خون، هتروفیل، لنفوسیت و نسبت هتروفیل به

جدول ۴- اثر سطوح مختلف متیونین جیره بر شاخص فراسنجه‌های ایمنی همومورال

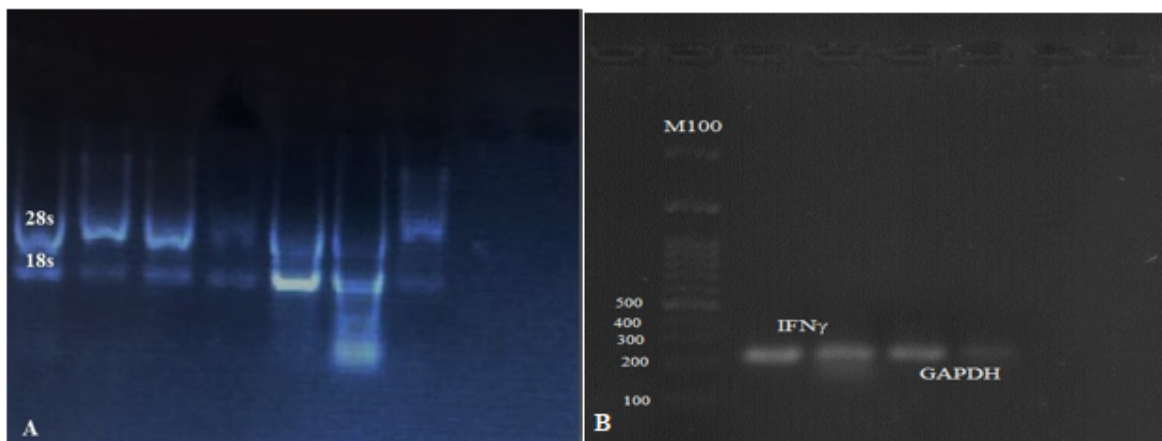
Table 4- Effect of different levels of dietary methionine on humoral immune parameters

ایمنوگلوبولین M IgM	ایمنوگلوبولین G IgG	پاسخ به SRBC Response to SRBC	سطوح متیونین Methionine levels (%)
3.1	1.9	5	0.29
2.6	1.9	4.5	0.36
3.2	1.9	5.1	0.43
2.8	1.2	4.9	0.50
2.6	1.7	3.4	0.57
2.3	2.2	4.5	0.64
0.145	0.133	0.179	SE
0.684	0.973	0.847	معنی داری Significant

جدول ۵- اثرات سطوح متیونین بر هماتوکریت، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید و اجزاء آن

Table 5- Effects of methionine levels on hematocrit, number of red and white blood cells and its components

نسبت هتروفیل به لنفوسیت Heterophile ratio to lymphocyte	لنفوسیت Lymphocyte	هتروفیل Heterophile	گلبول‌های قرمز خون Red Blood Cells	گلبول‌های سفید خون White Blood cells	سطح متیونین Methionine level (%)
-	درصد (%)	درصد (%)	$10^6 \times$ تعداد در میکرولیتر	$10^6 \times$ تعداد در میکرولیتر	
0.399	70	27.8	2.962	36060	0.29
0.386	69.8	26.8	2.580	36980	0.36
0.410	69	28	2.460	30740	0.43
0.415	68.6	28.4	2.380	33000	0.5
0.394	70.2	28.4	2.194	41140	0.57
0.431	68.2	29.2	2.368	33020	0.64
0.01	0.56	0.55	0.059	10.32	SE
0.41	0.61	0.43	0.0104	0.0938	معنی داری Significant

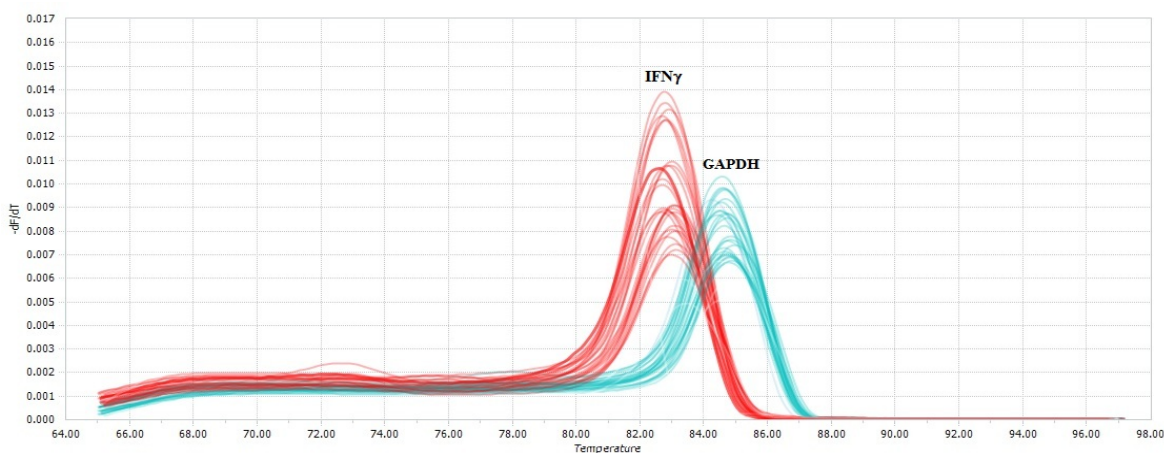


شکل ۱- A کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های کبد جوجه گوشتی روی ژل آگارز. B الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن IFN γ و GAPDH روی ژل آگارز

Figure 1- (A) Quality of RNA extracted from liver tissues on agarose gel. (B) Electrophoresis of PCR products using IFN γ and GAPDH specific primers on agarose gel

منحنی ذوب (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است) ژن‌های IFN γ و GAPDH که در شکل ۲ نشان داده شده است اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR را نشان می‌دهد.

در طی انجام واکنش Real-time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل به صورت منحنی تکثیر نشان داده می‌شود. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.

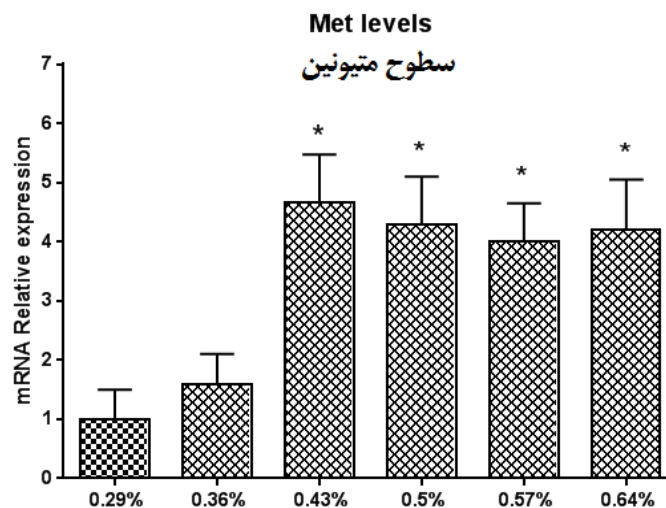


شکل ۲- منحنی ذوب محصول ژن IFN γ و GAPDH حاصل از واکنش Real Time PCR برای جوجه‌های گوشتی

Figure 2- Melting curve of IFN γ and GAPDH amplification using Real Time PCR for broiler chickens

بیان ژن IFN γ با افزایش سطوح مصرف متیونین، از ۰/۲۹ درصد به ۰/۴۳ به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود ($p \leq 0/05$). اما تفاوت معنی‌داری بین سطوح متیونین ۰/۵، ۰/۵۷ و ۰/۶۴ درصد مشاهده نشد.

با توجه به اینکه در این آزمایش سطوح مختلف متیونین مورد بررسی قرار گرفت و برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا پایین‌ترین سطح مصرف روزانه متیونین (۰/۲۹ درصد) به عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود



شکل ۳- تغییرات چند برابری ژن IFN γ در سطوح مختلف متیونین جیره در مقایسه با سطح متیونین ۰/۲۹ (گروه کنترل)

Figure 3-The fold change of IFN γ gene in different levels of diet methionine in comparison with Met level 0.29% (Control group)

بر پروفاایل بیان ژن‌های مرتبط با رشد (IGF-II, IGF-I, GH) و mucin) و مرتبط با ایمنی (IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α و IFN- γ) در جبین ۱۴ روزه جوجه گوشتی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان دادند که آرژنین و ترئونین باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد می‌شوند، در حالی که ترئونین و Met + Cys موجب بیان ژن‌های ایمنی در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (۳).

همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر ترکیب متیونین (پیشنهادی NRC و دو برابر پیشنهادی NRC) و روغن ماهی (۰، ۲/۵ و ۵/۵ درصد) روی ایمنی سلولی در جوجه‌های گوشتی در معرض چالش با بیمای بورس عفونی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج پس از ۷ روز چالش نشان دادند که جوجه‌های تغذیه شده با ۵/۵ درصد روغن ماهی پروتئین کل بالاتر، تعداد گلبول‌های سفید بالاتر و غلظت IL-2 بالاتری دارند. استفاده از روغن ماهی روی غلظت IFN- γ تأثیری نداشت؛ در حالیکه مکمل سازی جیره با سطح متیونین دو برابر پیشنهادی NRC منجر به افزایش غلظت سرمی IFN- γ و گلوبولین شده بود و پیشنهاد شد که سطح متیونین دو برابر پیشنهادی NRC و ۲/۵ درصد روغن ماهی ممکن است پاسخ ایمنی را در جوجه‌های گوشتی در معرض چالش با عفونت بورس افزایش دهد (۱۲).

نشان داده شد که افزایش سطوح متیونین جیره از سطح ۰/۴۵ درصد به ۰/۵۶ و ۰/۶۸ درصد منجر به افزایش وزن و بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده یا تحت درمان علیه کوکسیدیا شده است. در مقابل سطوح بالای متیونین در جیره منجر به بهبود عملکرد رشد در حیوانات واکسینه شده نشد. سطوح بالای متیونین (۰/۵۶ درصد و ۰/۶۸ درصد) در جیره به جوجه‌های

در مطالعه‌ای نشان داده شد که دما و بالانس اسیدهای آمینه هر دو روی نیازهای اسیدهای آمینه جوجه‌های گوشتی تأثیر می‌گذارند. این آزمایش در سن ۷ تا ۲۱ روزگی انجام شد و جوجه‌ها با جیره‌های ذرت-سویا حاوی ۱/۵۲ درصد آرژنین تغذیه شده بودند، نیازهای متیونین جوجه‌های گوشتی راس به ترتیب بر طبق افزایش وزن بدن و اطلاعات ضریب تبدیل غذایی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد 0.43 ± 0.03 درصد و 0.43 ± 0.03 درصد به ترتیب بر طبق افزایش وزن بدن و اطلاعات ضریب تبدیل غذایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 0.43 ± 0.01 و 0.43 ± 0.03 درصد بود (۴).

در مطالعه‌ای دیگر بیان mRNA ژن IFN γ در جوجه‌های مبتلا به عفونت سالمونلا با استفاده از روش Real Time PCR بررسی شد و نتایج نشان داد که با توجه به اینکه ژن‌های سایتوکاین دارای نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی طیور دارند اما بیان ژن IFN γ تغییری در آن مشاهده نشد (۷). نشان داده شد که نیاز متیونین برای پاسخ ایمنی سلولی بیشتر از مقداری است که برای رشد بهینه لازم است، و جیره‌های همراه با متیونین ۰/۴۵، ۰/۶۰، ۰/۷۵ و ۰/۹ درصد به طور معنی‌داری پاسخ ایمنی سلولی جوجه‌های گوشتی را در مقایسه با جیره‌های پایه و تجاری بهبود بخشیدند (۱۷). مطالعه‌ای به منظور بررسی بیان ژن‌های سایتوکاین در جوجه‌های گوشتی و اردک‌های آلوده به ویروس آنفلوآنزای مرغی انجام شد و نشان داده شد که بیان ژن IFN γ در کبد جوجه‌های گوشتی بالاتر از بیان آن در کبد اردک بود؛ در حالیکه بیان ژن IFN α در هر دو گونه یکسان بود (۱).

اثر اسیدآمینه‌های لیزین، آرژنتین، ترئونین یا متیونین + سیستین

مولکول‌های از پیش ساخته وجود ندارند و تولیدشان با آغاز نسخه برداری از ژن‌ها انجام می‌گیرد. این فعالیت نسخه برداری معمولاً موقتی بوده و mRNA کد کننده سایتوکاین‌ها ناپایدارند و در صورتی که سیستم ایمنی تحت تأثیر پاتوژن تحریک شود ایمنی ذاتی اولین راه دفاعی میزبان می‌باشد که بعد از تشخیص حمله پاتوژن‌ها، گیرنده‌های سلولی میزبان مانند Toll-like و الیگومرهای نوکلئوتیدی که گیرنده‌ها را در بر می‌گیرند، قادرند سیگنال‌هایی را انتقال دهند و متعاقب آن شبکه‌های بیان ژن‌های سایتوکاین شروع به فعالیت می‌کنند تا در نهایت پاسخ‌های ایمنی ذاتی آغاز گردند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که بیان ژن IFN γ با افزایش سطوح مصرف متیونین از ۰/۲۹ درصد به بالا به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. شاید یکی از دلایل افزایش بیان ژن IFN γ در این تحقیق بکارگیری سطوح مناسب متیونین در تیمارهای آزمایشی و بهره‌مندی از مزایای سطوح مناسب متیونین در جیره به منظور افزایش عملکرد سیستم ایمنی در پرنده باشد، هرچند که تحقیق حاضر در شرایط عادی پرورش و بدون چالش عوامل بیماری‌زا انجام شده بود.

واکسینه شده یا تحت درمان کمک کرد تا در مقابل عفونت *Eimeria tenella* مقاوم بمانند که نشان دهنده بهبود مورفولوژی روده و عملکرد سیستم ایمنی بود. همچنین با افزایش سطح متیونین جیره از ۰/۵۶ درصد به ۰/۶۸ درصد سطوح بیان TNF- α و IL-2 را در جوجه‌های تحت درمان افزایش یافته بود، درحالی‌که سطوح بیان TNF- α و IL-2 در جوجه‌های واکسینه شده تحت تأثیر متیونین جیره قرار نگرفته بود. بیان ژن IFN γ نیز در جوجه‌های گوشتی تحت درمان افزایش یافته بود اما در جوجه‌های واکسینه شده کاهش یافته بود. سطح متیونین ۰/۴۵ درصد در جیره بالاترین بیان ژن IFN γ را در بین همه تیمارهای آزمایشی منجر شد (۸).

در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که مکمل‌سازی جیره با متیونین آزاد یا متیونین دی پپتید باعث کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش بیان ژن‌های IFN γ و CAT-1 و سرکوب ژن‌های OCLN، IL2، TLR5، PEPT1 و B0 AT1 در جوجه‌های گوشتی مبتلا به عفونت *Eimeria spp* می‌شود (۵).

یافته‌های این پژوهش در زمینه بررسی اثرات سطوح تغذیه‌ای متیونین در جوجه‌های گوشتی آرین، با برخی تحقیقات مشابه صورت گرفته مطابقت (۶ و ۸) دارد. با توجه به اینکه ژن IFN γ یک نوع سایتوکاین می‌باشد و سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های سیستم ایمنی مهره‌داران تولید می‌شوند و به طور کلی سایتوکاین‌ها به صورت

منابع

- 1- Adams, S.C., Z. Xing, J. Li, and C. J. Cardona. 2009. Immune-related gene expression in response to H1N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Immunology*, 46:1744-1749.
- 2- Bateman, A., D. A. Roland and M. Bryant. 2008. Optimal methionine + cysteine / lysine ratio for first cycle of egg production in commercial leghorns. *International Journal of Poultry Science*, 7: 932-939.
- 3- Bhanja, S. K., M. Sudhagar, A. Goel, N. Pandey, M. Mehra, S. K. Agarwal, and A. Mandal. 2014. Differential expression of growth and immunity related genes influenced by in ovo supplementation of amino acids in broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*, 59:399-408.
- 4- Chamruspollert, M., G. M. Pesti, and R. I. Bakalli. 2004. Influence of Temperature on the Arginine and Methionine Requirements of Young Broiler Chicks. *The Journal of Applied Poultry Research*, 13:628-638.
- 5- De Souza Khatlab, A., A. P. Del Vesco, A. R. de Oliveira Neto, R. P. Fernandes, and E. Gasparino. 2019. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide mitigates intestinal oxidative stress induced by *Eimeria spp.* challenge in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1):58.
- 6- Grass, W. B., and H. S. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophile/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Disease*, 27:972-979.
- 7- Kogut, M. H., L. Rothwell, and P. Kaiser. 2005. IFN- γ priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 25:73-81.
- 8- Lai, A., G. Dong, D. Song, T. Yang, and X. Zhang. 2018. Responses to dietary levels of methionine in broilers medicated or vaccinated against coccidia under *Eimeria tenella*-challenged condition. *BMC Veterinary Research*, 14:140.
- 9- Li, P., Y. L. Yin, D. Li, S. W. Kim, and G. Wu. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition*, 98: 237-252.
- 10- Liu, Z., A. Bateman, M. Bryant, A. Abebe, and D. Roland. 2004. Estimation of bioavailability of DL-methionine hydroxy analogue relative to DL-methionine in layers with exponential and slope-ratio model. *Poultry Science*, 83:1580-1586.

- 11- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- 12- Maroufyan, E., A. Kasim, G. Yong Meng, M. Ebrahimi, L. Teck Chwen, P. Mehrbod, B. Kamalidehghan, and A. Soleimani Farjam. 2013. Effect of dietary combination of methionine and fish oil on cellular immunity and plasma fatty acids in infectious bursal disease challenged chickens. *The Scientific World Journal*, 2013(1):531397.
- 13- Métayer, S., I. Seiliez, A. Collin, S. Duchêne, Y. Mercier, P. A. Geraert, and S. Tesseraud. 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19:207-215.
- 14- Mirzaaghatabar, F., A. A. Saki, P. Zamani, H. Aliarabi, and H. R. Hemati Matin. 2011. Effect of different levels of diet methionine and metabolisable energy on broiler performance and immune system. *Food and Agricultural Immunology*, 22:93-103.
- 15- Nafisi Bahabadi, M., S. Dadgar, F. Lakzaei, Z. Mohajeri, and R. Abdolahi. 2016. The effect of subacute concentrations of Butachlor herbicide on some blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25:151-160. (In Persian)
- 16- Ohta, Y., and T. Ishibashi. 1995. Effect of dietary glycine on reduced performance by deficient and excessive methionine in broilers. *Japanese Poultry Science*, 32:81-89.
- 17- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75:163-189.
- 18- Shini, S., X. Li, and W. L. Bryden. 2005. Methionine requirement and cell-mediated immunity in chicks. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14: 123.
- 19- Wegmann, T., and O. Smithies. 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. *Transfusion*, 6: 67-75.
- 20- Wu, B.Y., H. M. Cui, P. Xi, J. Fang, W. Cui, and X. D. Liu. 2012. Effect of methionine deficiency on the thymus and the subsets and proliferation of peripheral blood T-cell, and serum IL-2 contents in broilers. *Journal of Integrative Agriculture*, 11:1009-1019.



Effect of Different Levels of Methionine on Immune Function and IFN- γ Gene Expression in Broilers Chickens

H. R. Seyedabadi^{1*} - K. Nasiri² - Z. Roudbari³ - S. A. Hosseini⁴ - A. Akbari⁵

Submitted: 10-07-2019

Accepted: 24-11-2019

Introduction: Essential amino acids comprise 10 to 13% of the poultry diet. Methionine is the first limiting amino acid that plays important roles in protein metabolism and immune functions in chickens. Previous studies have shown that the appropriate level of methionine in the diet increases the growth and it is essential for enhancing the immune response. Methionine is also requirement to increase the function of the T cells produced from the thymus. Methionine has beneficial effects on the immune system and improves both humoral and cellular immune responses. Interferon-gamma (IFN- γ) is one of the components of group-specific immune cytokines and an important activator of macrophages. IFN- γ is known as cytokine which it is critical for innate and adaptive immunity against viral, some bacterial and protozoa infections. The aim of present study was to investigate effect of different diet levels of methionine on immune system and IFN γ gene expression in broiler chickens.

Materials and Methods: This study was conducted in a completely randomized design with six experimental groups with 4 replicates and 20 observations in each replicate. The difference was in the levels of dietary methionine in the growth period, which included experimental groups 0.29, 0.36, 0.43, 0.51, 0.57 and 0.64%. The antibody produced against the sheep's red blood cell, white blood cell differential counts and the volume percentages of red blood cells were determined. In order to determine the IFN γ gene expression, the whole RNA was extracted from the liver tissue of different treatment chickens. Then, cDNA was synthesized and the expression of the IFN γ gene was evaluated using Real Time PCR. In this study, design of primers (GAPDH and IFN γ) was performed using primer premier software version 5 to evaluate IFN γ gene expression in broiler chickens. Real-time PCR was performed using SYBER Green qPCR Master Mixes (Thermo) in Lightcycler 96 (Roche). Melting curve of IFN γ and GAPDH gene productions were drawn using Real Time PCR for broiler chickens. The relative gene expression was quantified by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The results were analyzed by GLM method of SAS software. Tukey post hoc test was used to compare the means of the experimental groups at the significant level of 0.05.

Results and Discussion: The results showed that response to sheep's red blood cell, immunoglobulin G, immunoglobulin M, white blood cells, heterophile, lymphocyte and heterophile to lymphocyte ratio were not affected by different levels of methionine, but the number of red blood cells was affected by different levels of methionine, so that the highest number of red blood cells associated to methionine level was 0.29% and the lowest value was 0.57% ($p \leq 0.05$). The result of the absorption measurement of the extracted RNA samples at a wavelength of 280/260 was in a range of 1.8 to 1.9 mm, indicating the desired quality of extracted RNA. The result of melting curve of Real Time PCR and PCR products on agarose gel showed that the IFN γ and GAPDH genes were amplified in the liver tissue. The observation of band at 259 bp for the IFN γ and at 264 bp for the GAPDH gene for all samples indicates the correctness of the test and the amplification of the desired fragments. The expression results showed that there was a

1- Assistance Professor of Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2-Assistance Professor of Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

3- Assistance Professor of Department Animal Science, University of Jiroft, Jiroft, Iran

4- Professor of Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

5- Graduated Student of Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(*- Corresponding Author Email: hseyedabady@gmail.com)

DOI: 10.22067/ijasr.v12i3.81829

significant increase in IFN γ gene expression with increasing methionine levels from 0.29% to 0.43% and higher levels ($p \leq 0.05$). However, there was no significant difference between the levels of methionine 0.43 to 0.64%. Regarding the fact that the present study was carried out under normal conditions without disease challenges, etc., different levels of methionine not effect on the immune system. IFN- γ gene is a type of cytokine. Cytokines do not exist as precursor molecules, and their production begins with transcription of the genes. This transcription activity is usually temporary and mRNA coding for cytokines is unstable and if the immune system is stimulated by the pathogen, Innate immune is the first hostile defense way. After detecting pathogens, host cell receptors such as Toll-like and nucleotide oligomers that include receptors are able to transmit a variety of signals, and subsequently cytokine gene expression networks begin to function until the innate immune responses begin.

Conclusion: The results showed that IFN- γ gene expression was significantly increased by increasing methionine levels from 0.29% upwards. Perhaps one of the reasons for increased IFN2 gene expression in this study is the application of appropriate methionine levels in experimental treatments and the benefits of appropriate methionine levels in the diet to enhance immune function in the bird, although the present study was conducted under normal growing conditions and without the challenge of pathogens.

Keywords: Broiler chickens, Gene expression, Immune system, IFN γ gene.



مقاله علمی - پژوهشی

بررسی عملکرد هفت هیبرید کرم ابریشم در تربت حیدریه

مسعود علی پناه^{۱*} - ذبیح الله عابدیان^۲ - عبدالمعظم نصیری^۲ - فرید سرجمعی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۰

چکیده

شش هیبرید تجاری ایرانی و یک هیبرید چینی کرم ابریشم موجود در کشور، در بهار سال ۱۳۹۵ پس از تفریح در اتاق تفریح مرکز توسعه نوغانداری تربت حیدریه پرورش داده شدند. هدف از این تحقیق مقایسه عملکرد هیبریدهای مورد استفاده کرم ابریشم در منطقه تربت حیدریه بود. پس از اتمام دوره پرورش، پیل‌های تولیدی جمع‌آوری گردید. بعضی از صفات مورد بررسی شامل تعداد لارو زنده، تعداد شفیره زنده، وزن پیل، وزن قشر پیل، درصد قشر پیل، اندازه گیری و رنگ پوسته تخم‌نوغان و طول دوره لاروی بود. مقایسه بین هیبریدها نشان داد که هیبرید 31×32 دارای بالاترین وزن برای پیل‌های خوب تولیدی ($147/86$ گرم)، بیشترین میانگین وزن یک پیل خوب ($1/64$ گرم) و بیشترین میانگین وزن یک پیل خوب ($0/39$ گرم) بود ($P < 0/05$). از طرفی هیبرید چینی و هیبرید 151×154 برای صفات وزن پیل خوب تولیدی به ترتیب با $121/66$ و $121/61$ و میانگین وزن قشر یک پیل خوب به ترتیب با $0/29$ و $0/31$ کمترین عملکرد را نشان دادند ($P < 0/05$). همچنین پروانه‌های هیبرید 31×32 با تولید $604/67$ عدد تخم بیشترین مقدار تخم‌گذاری را داشتند ($P < 0/05$).

واژه‌های کلیدی: پیل، عملکرد، کرم ابریشم، لارو، نوغانداری، هیبرید

مقدمه

مختلف گامی مؤثر باشد. به‌طور کلی در کرم ابریشم سه گروه از صفات شامل صفات کمی پیل، صفات تولیدمثلی و صفات مربوط به مقاومت کرم ابریشم نسبت به بیماری‌ها از اهمیت خاصی برخوردارند (۱ و ۲). در این میان صفات پیل، صفات مهم اقتصادی در کرم ابریشم هستند که وراثت‌پذیری بالایی دارند و کارایی انتخاب مستقیم آن‌ها بسیار بالاست (۳ و ۴). تحقیقات در داخل و خارج کشور برای شناسایی هیبریدهای مناسب برای پرورش همواره در حال انجام است که از جمله می‌توان به تحقیق کرامتلو و همکاران (۵) اشاره کرد که در مقایسه بین هیبریدهای کرم ابریشم ایرانی و خارجی گزارش دادند که تمام هیبریدهای ایرانی پیل بزرگ‌تری در مقایسه با هیبریدهای خارجی تولید می‌کنند و بهترین عملکرد مربوط به هیبریدهای 104×103 ، 104×103 و 31×32 و 154×151 بود. همچنین گزارش نمودند که بهترین عملکرد قطر پیل مربوط به هیبرید 31×32 بوده است و کمترین قطر پیل نیز در هیبرید 151×154 مشاهده شده است. تخم‌نوغان تجارتی که برای تولید پیل استفاده می‌شود حاصل آمیزش واریته‌های کرم ابریشم با خصوصیات ژنتیکی متفاوت است که آن‌ها را واریته‌های چینی و ژاپنی می‌نامند (۷). لذا مطالعه ژنتیکی این صفات کمی در تجارتی ضروری است. از جمله به تحقیق غنی پور و همکاران (۸) می‌توان اشاره کرد که محققان به بررسی شاخص‌های

با توجه به اینکه برای پرورش کرم ابریشم از هیبریدهای وارداتی استفاده می‌شود و واریته‌های مورد استفاده در منطقه تربت حیدریه براساس آزمایش‌ها عملکرد سال‌های قبل انتخاب شده است. همچنین هر ساله اداره توسعه نوغانداری اقدام به وارد کردن و توزیع هیبریدهای جدید کرم ابریشم در کشور نموده است، لذا ضروری به نظر می‌رسد که علاوه بر آزمایش مجدد واریته‌های مورد استفاده، از واریته‌های جدید وارداتی نیز در آزمایش‌ها استفاده شود تا بتوان بهترین واریته‌های را براساس صفات عملکردی در شهرستان تربت حیدریه انتخاب نمود. برگ‌درخت توت غذای منحصر به فرد کرم ابریشم است، با توجه به خشک‌سالی‌ها و کمبود منابع آبی کشور کشت درختان توت با محدودیت مواجه است، لذا شناسایی واریته‌های مناسب کرم ابریشم از نظر عملکرد در منطقه می‌تواند در جهت بهبود کیفیت ابریشم تولیدی، صرفه اقتصادی و شناسایی نژادهای سازگار با واریته‌های

۱- دانشیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه تربت حیدریه.

۲- اداره توسعه نوغانداری خراسان رضوی، تربت حیدریه.

(*)- ایمیل نویسنده مسئول: m.alipanah@torbath.ac.ir
DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75418

گیلان و $110 \times$ پرتقالی گیلانی به ترتیب با $220/2$ و $208/2$ عدد و وزن قشرپيله خوب در آميخته $107 \times$ بغدادی با $327/0$ گرم و درصد قشر پيله نیز در آميخته $107 \times$ صورتی خراسانی با $19/8$ درصد، نسبت به سایر آميخته‌ها برتر بودند ($P < 0.05$). نتایج فوق بر شناخت دقیق پتانسیل ژنتیکی گروه‌های بومی و استفاده از آنها جهت بهبود عملکرد و اريته‌های اصلاح شده فعلی تأکیدی کند (۱۳).

نتایج مقایسه عملکرد دو هیبرید ایرانی و چینی نشان داد که هیبرید چینی نسبت به گرما مقاوم‌تر است (۱۴)، مندل و مورتی (۱۵) در تحقیقی برای یافتن بهترین هیبرید کرم‌ابریشم که مقاوم به دما و رطوبت بالا باشد اعلام کردند که هیبرید حاصل از تلاقی‌های مرطوب مناسب است و سایر هیبریدهای مورد آزمایش تنها می‌تواند در فصل‌های خاصی مورد استفاده قرار گیرد. سیتارامولا و همکاران (۱۶) با مقایسه بین ۲۸ هیبرید کرم‌ابریشم گزارش دادند که هیبرید APC1 $\times$ APJ1 نسبت به دمای بالا و رطوبت بالا مقاومت دارد. عملکرد این هیبرید برای صفات باروری، وزن پيله و وزن قشر پيله به ترتیب 610 ، $1/95$ و $0/44$ بود.

در حال حاضر لاین‌های مختلفی از کرم‌ابریشم در کشور تولید و عرضه می‌گردد که با توجه به پتانسیل‌های ژنتیکی هر کدام، عملکرد آن نیز متفاوت است. شناخت میزان مقاومت و حساسیت این لاین‌ها هم برای انتخاب لاین‌های برتر و هم برای آگاهی از قابلیت‌های-ژنتیکی آن‌ها برای اعمال فرایندهای اصلاح‌نژادی آتی ضروری است. همچنین با توجه به شرایط موجود در مزارع و تلمبارهای سنتی و صنعتی پرورش کرم‌ابریشم که به دلایل عدیده بروز آلودگی و مرگ‌ومیر ناشی از آن محتمل است، انتخاب لاین‌ها و هیبریدهای مقاوم به بیماری برای جلوگیری از افت شدید تولید از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۷).

هدف از مطالعه حاضر بررسی شش هیبرید ایرانی 32×31 ، 104×103 ، 103×154 ، 151×154 ، 153×154 و 154×151 و یک هیبرید وارداتی چینی از نظر عملکرد در شرایط تربت‌حیدریه بود.

مواد و روش‌ها

تخم‌نوغان هیبریدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل شش هیبرید تجاری ایرانی (حاصل از تلاقی نژادهای چینی و ژاپنی) 32×31 ، 104×103 ، 103×154 ، 151×154 ، 153×154 و 154×151 و یک هیبرید وارداتی چینی بود که از مرکز تحقیقات نوغانداری کشور تهیه شدند. کلیه تخم‌نوغان‌ها تحت شرایط 25 ± 5 درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی 80 ± 5 و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۱۲ روز در اتاق تفریح نگهداری شدند. سپس پرورش کرم جوان لاروهای تفریح‌شده با شرایط استاندارد

شش هیبرید کرم‌ابریشم 32×31 ، 31×32 ، 103×104 ، 104×103 ، 107×110 و 110×107 پرداختند. براساس نتایج این تحقیق مشخص شد که مصرف، هضم و راندمان استفاده از غذا به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر ژنوتیپ و سن هیبرید قرار می‌گیرد. براساس نتایج فوق بیان شد که تفاوت شاخص‌های تغذیه‌ای در هیبریدهای مختلف کرم‌ابریشم وجود دارد و باید توجه به تولید این هیبریدها بر اساس خصوصیات تغذیه‌ای انجام شود (۹).

در سایر کشورها نیز برای یافتن مناسب‌ترین هیبرید کرم‌ابریشم تحقیقات زیادی انجام پذیرفته است. ویدومالا و همکاران (۱۰) در مطالعه‌ای پنج ترکیب آميخته کرم‌ابریشم دونسلی $\times$ چندنسلی را به همراه واریته آميخته رایج $PM \times NB4D2$ برای اثرات تجمعی روی صفات طول دوره لاروی، نسبت مؤثر پرورش برحسب تعداد، نسبت مؤثر پرورش برحسب وزن، وزن پيله، وزن قشر پيله و نسبت ابریشم به منظور شناسایی مناسب‌ترین ترکیب آميخته برای منطقه آندراپرادش مورد ارزیابی قرار دادند، آن‌ها اعلام کردند که براساس شاخص‌های ارزیابی، آميخته‌های $BL26 \times 4D2$ ، $BL24 \times NB4d2$ و $4D2$ باید به عنوان ترکیب آميخته مناسب شرایط منطقه در نظر گرفته شوند. آشوکا و گویندان (۱۱) هم با بررسی آميخته‌های حاصل از تلاقی ساده، سه طرفه و چهارطرفه کرم‌ابریشم، اظهار داشتند که آميخته‌های چهارطرفه $122J \times 18NB \times 18NB \times KA$ ($18NB \times NBY \times KA$) برتری معنی‌داری را برای پنج صفت (مقدار پيله تولیدی توسط ۱۰۰۰۰ کرم‌ابریشم، وزن پيله و قشر پيله، درصد قشر پيله، طول الیاف پيله و دنیر) دارند و می‌توانند سطح تولیدات کشاورزان را افزایش معنی‌داری دهند. بوهر و همکاران (۱۲) عملکرد دوازده آميخته مختلف را مورد بررسی قرار دادند، عملکرد متوسط هیبریدها برای وزن پيله، وزن قشر پيله به ترتیب $1/83$ و $0/38$ گرم بود. این تحقیق نشان داد که هیبرید $SKAU-R-1$ با عملکرد $2/09$ و $0/45$ گرم (به ترتیب برای صفات وزن پيله و وزن قشر پيله) برای پرورش در مناطق گرم قابل توصیه است. در تحقیق دیگری در ایران مشخص شد که از نظر وزن پيله بهترین هیبرید 32×31 با وزن $1/794$ گرم و کمترین وزن پيله را هیبرید 154×153 با وزن $1/555$ گرم دارد و از لحاظ وزن قشر پيله هیبرید 32×31 با وزن $0/4327$ گرم بیشترین قشر پيله و کمترین عملکرد را هیبرید $Qiu feng \times Baiyu$ و 154×153 به ترتیب با $0/3567$ و $0/3493$ گرم داشتند (۶).

در یک آزمایش ویشگاهی صدیق و همکاران (۱۳) عملکرد ده آميخته حاصل از تلاقی پنج گروه بومی کرم‌ابریشم ایران شامل گروه‌های خراسانی (صورتی، پرتقالی و لیمویی)، پرتقالی، گیلان و بغدادی را با لاین‌های اصلاح‌شده 107 و 110 مقایسه کردند. نتایج نشان داد که صفت تعداد پيله خوب در آميخته‌های $107 \times$ پرتقالی

پرورش برابر جداول استاندارد (۱۸) انجام شد. برگ مورد استفاده برای پرورش از درختان توت اصلاح شده کن موچی توستان اداره توسعه نوغانداری تربت حیدریه تهیه شد. لاروهای هر هیبرید تا پایان سن سوم لاروی به صورت گروهی پرورش یافتند. در ابتدای سن چهارم، بصورت تصادفی از هر هیبرید ۴۰۰ لارو انتخاب شد و سپس لاروهای هر هیبرید به چهار گروه ۱۰۰ تایی تفکیک شدند. صفات مورد اندازه گیری شامل تعداد لارو زنده، تعداد شفیره زنده مانده، درصد ماندگاری شفیره، وزن پیل، وزن قشر پیل و درصد قشر پیل بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۰۰ لارو در هر تکرار انجام شد و داده ها توسط نرم افزار SAS 9.2 با استفاده از رویه مدل های خطی عمومی (GLM) تجزیه شدند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

مشخصات کلی

رنگ پوسته تخم نوغان در هیبریدهای 31×32 ، 103×104 و هیبرید چینی زرد رنگ و در سایر هیبریدها (153×154 ، 154×151 و 151×154) سفید رنگ بود. برای سایر صفات مورد مقایسه که مربوط به طول دوره لاروی در سنین ۱ تا ۵ و طول دوره خواب و تغذیه لاروی در سنین ۱ تا ۵ برای ۶ هیبرید ژاپنی مشابه بودند، ولی هیبرید چینی دارای طول دوره تغذیه لاروی سن ۱، طول دوره تغذیه کرم جوان کمتر از هیبریدهای دیگر است، اما برای صفات طول دوره خواب لارو سن ۳، طول دوره خواب کرم جوان، طول دوره تغذیه لارو سن ۴، طول دوره تغذیه لارو سن ۵، طول دوره تغذیه کرم بالغ، طول دوره کرم بالغ، طول دوره تغذیه لاروی، طول کل دوره لاروی بیشتر از سایر هیبریدها است.

نتایج تجزیه آماری و مقایسه میانگین ها بین تیمارهای مختلف و برای صفات مختلف پیل و قشر ابریشم در جداول ۱ تا ۴ ارائه گردیده است.

صفات اندازه گیری شده

خصوصیات لاروی و پیل تولیدی

تعداد لارو زنده پیل نرفته در هیبرید 154×151 بیشترین مقدار و برای هیبرید 153×154 کمترین مقدار بود از طرف دیگر تعداد پیل تولیدی نیز به ترتیب برای هیبرید 154×151 با $88/67$ عدد کمترین و برای هیبرید 153×154 با $97/67$ عدد بیشترین مقدار بود ولی به طور کلی تفاوت معنی داری برای این دو صفت در بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱).

نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می دهد که بین تیمارها از نظر

تعداد پیل خوب تفاوت معنی داری نیست هر چند بیشترین تعداد پیل خوب مربوط به هیبرید 103×104 با ۹۳ پیل و کمترین تعداد پیل خوب را هیبرید 151×154 با ۸۰ پیل خوب به ازای صد لارو بود. مقایسه بین هفت هیبرید مورد تحقیق، تفاوت معنی دار برای تعداد پیل در لیتر از پیل های خوب را نشان داد به نحوی که هیبرید چینی نسبت به هیبریدهای ایرانی بیشترین تعداد پیل خوب در لیتر را داشت در حالی که بین تیمارهای ایرانی تفاوت معنی داری وجود نداشت. (جدول ۱). بیشترین تعداد پیل ضعیف را در هیبرید 154×153 با $5/67$ عدد و کمترین تعداد پیل ضعیف مربوط به هیبرید 153×154 با $2/67$ عدد بود. تفاوت بین هیبریدها از نظر تعداد پیل ضعیف معنی دار نبود (جدول ۱). همچنین تعداد پیل های دبل در بین هفت هیبرید مورد مطالعه تفاوت معنی داری نداشت، اگرچه تعداد پیل های دبل برای تیمار 151×154 با $3/51$ بیشترین مقدار و برای هیبرید چینی و هیبرید 154×153 با ۱ پیل دبل کمترین مقدار بود.

صفت وزن کل پیل تولیدی حاصل از در بین هفت هیبرید ابریشم مختلف تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۲) ولی هیبرید 154×151 بیشترین و هیبرید چینی کمترین وزن تولید پیل را نشان دادند. مقایسه بین عملکرد هیبریدهای مورد آزمایش برای صفت وزن پیل خوب تولیدی نتایج نشان داد (جدول ۲) که بین هیبریدهای مختلف تفاوت معنی داری از نظر وزن پیل خوب تولیدی وجود دارد ($P < 0.05$). بیشترین وزن پیل خوب تولیدی مربوط به تیمار 32×31 با $147/86$ گرم و کمترین مقدار مربوط به هیبریدهای 151×154 و چینی به ترتیب با $121/61$ و $121/66$ گرم بود.

نتایج مقایسه میانگین ها که در جدول ۲ آمده است، نشان می دهد که کرم های ابریشم هیبرید 104×103 بیشترین میانگین وزن پیل های دبل را در مقایسه با سایر هیبریدها دارد هر چند تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

با توجه به نتایج ارائه شده برای میانگین وزن یک پیل خوب در جدول ۲ مشاهده می شود برای این صفت بین هیبریدهای مورد مقایسه تفاوت معنی دار وجود دارد به نحوی که بیشترین میانگین وزن یک پیل خوب مربوط به هیبرید 32×31 و کمترین وزن را هم پیل های هیبرید چینی داشتند.

در حالی که میانگین وزن یک پیل خوب با شفیره نر در بین هیبریدها تفاوت معنی دار نداشت (جدول ۲) اما میانگین یک پیل خوب با شفیره ماده در بین تیمارها دارای تفاوت معنی داری بود و بیشترین میانگین وزن یک پیل خوب با شفیره ماده مربوط به تیمارهای 151×154 و هیبرید 32×31 به ترتیب با $1/68$ و $1/63$ گرم بود و کمترین میانگین در هیبرید چینی با مقدار $1/46$ گرم مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۱- مقایسه میانگین برای صفات تعداد لارو پيله نرفته، پيله توليدي، پيله خوب، پيله خوب در ليتر، پيله ضعيف و پيله دوبل در هفت هيبريد کرم ابريشم

Table 1- Compare means for number of larvae non cocoon, cocoon production, good cocoon, good cocoon in litter, weak cocoon and double cocoon traits in seven silkworm hybrids

هيبريد Hybrid	تعداد لاروهای پيله نرفته Number of non cocooning larvae	تعداد پيله‌های توليدي Number of cocoon production	تعداد پيله‌های خوب Number of good cocoons	تعداد پيله در ليتر از پيله خوب Number of good cocoon in litter	تعداد پيله‌های ضعيف Number of weak cocoons	تعداد پيله‌های دوبل Number of double cocoons
154×153	2	98	89.33	106 ^b	5.67	1
32×31	2.67	97.33	90.33	99 ^b	3.33	3.21
104×103	2.33	97.67	93	108 ^b	3	2.08
151×154	11.32	88.67	80	105 ^b	5	3.51
154×151	2.66	97.67	90.33	102 ^b	3.33	1.73
153×154	2.66	97.33	91.33	110 ^b	2.67	1.15
Chines	5.66	94.33	88	125 ^a	4.33	1
میانگین Mean	4.19	95.71	88.90	107.86	3.90	2.90
MSE	5.91	5.74	5.12	5.44	0.11	0.08

میانگین‌های هر ستون یا حروف غیرمشتک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).
Means within same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

بین تیمارهای مختلف در حشرات نر و همچنین در حشرات ماده وجود ندارد.

با توجه به نتایج جدول ۳ میانگین درصد قشر ابریشمی یک پيله خوب در بین تیمارهای موردبررسی تفاوت معنی‌داری نداشت، هرچند هيبريد ۱۵۳×۱۵۴ با ۲۵/۶۶ درصد دارای بیشترین درصد قشر ابریشمی در مقایسه با سایر هيبريدها بود. نتایج مربوط به مقایسه میانگین درصد قشر ابریشمی در پيله‌های نر و ماده نیز تفاوت معنی‌داری بین هفت هيبريد مورد آزمایش نشان‌نداد (جدول ۳). اگرچه بین حشرات نر بیشترین و کمترین درصد قشر ابریشمی به ترتیب مربوط به هيبريد ۱۰۴×۱۰۳ با ۲۶/۰۸ درصد و هيبريد ۱۵۳×۱۵۴ با ۲۴/۰۷ درصد بود و در حشرات ماده بیشتر درصد قشر ابریشمی مربوط به هيبريد ۱۵۳×۱۵۴ با ۲۴/۵۴ درصد بود.

کل تخم گذاشته شده توسط یک پروانه، تعداد تخم لقاح نرفته و درصد تفریخ

با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفات کل تخم

نتایج میانگین وزن شفیره نر در نمودار ۱۵ آمده است. مطابق نتایج ارائه شده بیشترین میانگین وزن شفیره نر مربوط به هيبريد ۱۵۳×۱۵۴ و کمترین میانگین وزن مربوط به هيبريد چینی بود، اگرچه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میانگین وزن شفیره ماده بین هيبريدهای مورد آزمایش تفاوت معنی‌دار نشان‌داد ($P < 0.05$). به طوری که بیشترین میانگین وزن شفیره ماده در هيبريد ۱۵۱×۱۵۴ با ۱/۳۱ گرم بود، در حالی که کمترین میانگین وزن شفیره ماده در هيبريد چینی با ۱/۱۵ گرم مشاهده شد.

صفات وزن و درصد قشر پيله

همان گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، برای میانگین وزن قشر در یک پيله خوب بین تیمارهای مختلف مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود داشت، هيبريد ۳۲×۳۱ با میانگین وزن قشر ۰/۳۹ گرم بیشترین مقدار و هيبريد ۱۵۱×۱۵۴ و هيبريد چینی به ترتیب با ۰/۳۱ و ۰/۲۹ گرم کمترین میانگین وزن قشر را نشان‌دادند ($P < 0.05$). نتایج ارائه شده نشان‌داد که تفاوت معنی‌داری بین قشر پيله

گذاشته شده توسط یک پروانه بین هیبریدهای مورد آزمایش، تفاوت - معنی دار وجود داشت، به نحوی که بیشترین تخم گذاشته شده توسط یک پروانه مربوط به هیبرید ۳۲×۳۱ با ۶۰۴/۶۷ عدد بود ($P<0.05$). همان گونه که در جدول ۴ مشاهده می شود بین هفت هیبرید مورد بررسی تفاوت معنی داری برای صفت درصد تفریخ وجود داشت،

اگرچه هیبرید چینی و هیبریدهای ۱۵۴×۱۵۱، ۱۰۴×۱۰۳ و ۳۲×۳۱ حدود ۹۸ درصد تفریخ را نشان دادند در حالی که درصد تفریخ در هیبریدهای ۱۵۴×۱۵۳، ۱۵۱×۱۵۴ و ۱۵۳×۱۵۴ حدود ۹۷ درصد بود .

جدول ۲- میانگین (استباه معیار) برای صفات مختلف وزن پیله و وزن شفیره در هفت هیبرید کرم ابریشم
Table 2- Means (standard error) for different traits of cocoon weight and pupa weight in seven silkworm hybrids

هیبرید Hybrid	وزن کل پیله تولیدی Weight of total cocoon production (g)	وزن پیله خوب تولیدی Weight of good cocoon (g)	میانگین وزن یک پیله خوب تولیدی Mean weight of a good cocoon (g)	میانگین وزن یک پیله دوبر تولیدی Mean weight of a double cocoon (g)	میانگین وزن یک پیله خوب با شفیره نر Mean weight of a good cocoon with male pupa (g)	میانگین وزن یک پیله خوب با شفیره ماده Mean weight of a good cocoon with female pupa (g)	میانگین وزن یک شفیره ماده Mean weight of a female pupa (g)	میانگین وزن یک شفیره نر Mean weight of a male pupa (g)
154×153	140.82 (4.70)	125.72 ^{ab} (5.15)	1.41 ^{bc} (0.03)	2.06 (0.01)	1.23 (0.04)	1.55 ^{ab} (0.09)	1.23 ^{ab} (0.06)	1.08 (0.02)
32×31	156.30 (7.62)	147.86 ^a (8.69)	1.64 ^a (0.04)	2.01 (0.01)	1.34 (0.06)	1.63 ^a (0.07)	1.27 ^{ab} (0.10)	1.13 (0.06)
104×103	148.66 (6.34)	139.99 ^{ab} (5.50)	1.51 ^{ab} (0.07)	2.95 (0.21)	1.30 (0.05)	1.59 ^{ab} (0.03)	1.25 ^{ab} (0.02)	1.10 (0.02)
151×154	144.01 (7.02)	121.61 ^b (7.70)	1.38 ^{bc} (0.25)	2.85 (0.03)	1.31 (0.08)	1.68 ^a (0.02)	1.31 ^a (0.06)	1.15 (0.05)
154×151	185.19 (8.80)	127.33 ^{ab} (0.92)	1.41 ^{bc} (0.05)	2.45 (0.07)	1.25 (0.07)	1.54 ^{ab} (0.02)	1.21 ^{ab} (0.05)	1.07 (0.04)
153×154	142.69 (5.81)	129.62 ^{ab} (4.81)	1.42 ^{bc} (0.08)	2.92 (0.09)	1.36 (0.09)	1.60 ^{ab} (0.09)	1.20 ^{ab} (0.07)	1.11 (0.09)
چینی Chines	121.66 (6.29)	121.66 ^b (4.29)	1.26 ^c (0.07)	2.67 (0.04)	1.21 (0.02)	1.46 ^b (0.05)	1.15 ^b (0.05)	1.03 (0.03)
میانگین Mean	148.44 (4.78)	130.54 (1.92)	1.43 (0.02)	2.58 (0.05)	1.29 (0.08)	1.58 (0.05)	1.23 (0.06)	1.10 (0.05)

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

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

جدول ۳- میانگین (اشتباه معیار) برای صفات تولیدی وزن و درصد قشر ابریشمی در هفت هیبرید کرم ابریشم
Table 3- Means (standard error) for weight and percent of cocoon shell traits in seven silkworm hybrids

هیبرید Hybrid	میانگین وزن قشر یک پيله خوب good of Mean shell cocoon weight (g)	میانگین وزن قشر در نرها Mean weight of a shell in male (g)	میانگین وزن قشر در ماده‌ها Mean weight of a shell in female (g)	درصد قشر ابریشم در یک پيله خوب Percent of cocoon shell in a good cocoon (g)	درصد قشر ابریشم در نرها Percent of cocoon shell of males (%)	درصد قشر ابریشم در ماده‌ها Percent of cocoon shell of females (%)
153×154	0.32 ^{bc} (0.01)	0.30 (0.03)	0.32 (0.04)	22.33 (0.29)	24.07 (0.19)	20.59 (0.70)
31×32	0.39 ^a (0.02)	0.35 (0.03)	0.36 (0.03)	24.03 (0.85)	25.81 (0.76)	22.24 (0.03)
103×104	0.36 ^{ab} (0.02)	0.34 (0.02)	0.34 (0.04)	23.59 (0.45)	26.08 (0.97)	21.10 (0.27)
154×151	0.31 ^c (0.04)	0.32 (0.03)	0.36 (0.05)	22.84 (0.31)	24.26 (0.48)	21.41 (0.91)
151×154	0.33 ^{bc} (0.03)	0.32 (0.03)	0.32 (0.06)	23.13 (0.74)	25.51 (0.40)	20.76 (0.43)
154×153	0.32 ^{bc} (0.01)	0.35 (0.01)	0.39 (0.04)	25.10 (0.82)	25.66 (0.69)	24.54 (0.81)
چینی Chines	0.29 ^c (0.01)	0.31 (0.03)	0.31 (0.02)	23.27 (0.06)	25.35 (0.98)	21.19 (0.14)
میانگین Mean	0.33 (0.08)	0.33 (0.09)	0.34 (0.13)	23.47 (0.06)	25.25 (0.06)	21.69 (0.11)

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$).
 Means within same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

جدول ۴- میانگین (اشتباه معیار) صفات تعداد تخم گذاشته‌شده توسط هر حشره و درصد تفریخ تخم‌های تولیدی در هفت هیبرید کرم ابریشم
Table 4- Means (standard error) for number of eggs by one insect and percent of hatched eggs production traits in seven silkworm hybrids

هیبرید Hybrid	۱۵۴ × ۱۵۳	۳۲ × ۳۱	۱۰۴ × ۱۰۳	۱۵۱ × ۱۵۴	۱۵۴ × ۱۵۱	۱۵۳ × ۱۵۴	چینی Chines	میانگین Mean
صفات Traits	154×153	32×31	104×103	151×154	154×151	153×154		
تعداد تخم گذاشته‌شده Number of eggs	521.67 ^b (16.86)	604.67 ^a (11.50)	452.67 ^{ab} (18.00)	537.33 ^b (17.50)	563.00 ^{ab} (20.11)	512.33 ^b (26.88)	514.00 ^b (14.73)	542.23 (6.40)
% تخم تفریخ شده % hatched eggs	0.97 (0.01)	0.98 (0.01)	0.98 (0.01)	0.97 (0.01)	0.98 (0.01)	0.97 (0.01)	0.98 (0.01)	0.976 (0.01)

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$).
 Means within same column with different superscripts differ ($P<0.05$).

در برخی تحقیقات در داخل (۱۹) و خارج کشور (۱۵) به مقایسه توان تولید هیبریدهای مختلف کرم ابریشم، پرداخته شده است. ویدوناما و همکاران (۱۰) در مطالعه‌ای پنج ترکیب آمیخته کرم ابریشم دونسلی × چندنسلی را به همراه واریته آمیخته رایج PM × NB1D2 برای اثرات تجمعی روی صفات طول دوره لاروی، نسبت مؤثر پرورش (مقدار پيله توليدي به ازای ۱۰۴ لارو) برحسب تعداد، نسبت مؤثر پرورش برحسب وزن، وزن پيله، وزن قشر پيله و نسبت ابریشم به منظور شناسایی مناسب‌ترین ترکیب آمیخته برای منطقه ایندراپرادش هندوستان را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بر اساس شاخص ارزیابی (IE)، آمیخته‌های BL24 (NB4D2(EI=65.61) × و BL26 (4D2(EI=50.21) × می‌توان به عنوان ترکیبات آمیخته مناسبی برای شرایط منطقه در نظر گرفت. مندل و مورتی (۱۵) در تحقیقی برای یافتن بهترین هیبرید کرم ابریشم که مقاوم به دما و رطوبت بالا باشد، اعلام کردند که هیبرید حاصل از تلاقی‌های SK3 × BHR2 و O3 × D6(p) برای پرورش در مناطق گرم و مرطوب مناسب است و سایر هیبریدهای مورد آزمایش تنها می‌تواند در فصل‌های خاصی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج ارائه شده در مورد ویژگی‌های پيله‌ها، هیبریدهای ۱۵۱ × ۱۵۴ و هیبرید چینی بیشترین تعداد لارو زنده پيله نرفته دارند (به ترتیب ۱۱/۳۲ و ۵/۶۶ درصد) از طرفی همین هیبریدها کمترین تعداد پيله خوب را دارا هستند. همچنین این دو هیبرید و هیبرید ۱۵۴ × ۱۵۳ بیشترین تعداد پيله ضعیف را داشتند. کمترین وزن ۱۰ پيله خوب نیز مربوط به هیبریدهای چینی و ۱۵۱ × ۱۵۴ به ترتیب با ۱۲۱/۶۶ و ۱۲۱/۶۱ گرم بود. از طرف دیگر چهار هیبرید دیگر شامل ۳۲ × ۳۱، ۱۰۴ × ۱۰۳، ۱۵۱ × ۱۵۴ و ۱۵۳ × ۱۵۴ از نظر صفات ذکر شده در وضع مناسب‌تری قرار دارند. در میان هیبریدها می‌توان اشاره کرد که هیبرید چینی پایین‌ترین پيله‌های توليدي را (۱۲۱/۶۶) دارد. هیبرید ۳۲ × ۳۱ با توليد پيله‌هایی به وزن ۱/۵۶ گرم دارای بالاترین وزن برای پيله‌های خوب است. عبداللهیان و همکاران (۱۹) گزارش دادند که در بین هیبریدهای مورد مقایسه آن‌ها هیبرید ۱۰۴ × ۱۰۳ و سپس هیبریدهای ۱۵۱ × ۱۵۴ و ۱۵۴ × ۱۵۳ کمترین مقدار درصد پيله‌های خوب و هیبریدهای خارجی بیشترین مقدار را برای این صفت داشتند. در تحقیق ساتنهالی و همکاران (۲۰) مشخص شد که در بین هفت نژاد خالص کرم ابریشم و آمیخته‌های F1 آن‌ها هیبرید Saiish18 × NB7 بالاترین وزن پيله و وزن قشر پيله را داشتند. در یک تحقیق دیگر روی هیبریدهای داخلی و خارجی در صفت توليد پيله ده هزار لارو مشخص شد که هیبرید خارجی Baiyu × Qiufeng، بیشترین عملکرد و هیبرید داخلی ۱۰۴ × ۱۰۳ نسبت به تمامی هیبریدها، عملکرد

پایینی داشت. همچنین در بین هیبریدهای خارجی دیگر، هیبرید Jinyong × Haoyue و سپس هیبریدهای Baiyu × Qiufeng و 4531 × Lianghui × 932 × Furong به ترتیب بیشترین عملکرد را داشتند. ولی اختلافشان با دیگر هیبریدهای داخلی معنی دار نبود. همچنین این تحقیق نشان داد که در بین هیبریدهای داخلی، هیبریدهای ۳۱ × ۳۲، ۱۵۴ × ۱۵۳ و ۳۲ × ۳۱ بیشترین عملکرد را داشتند (۱۹). از نظر وزن پيله هیبرید ۳۱ × ۳۲ بیشترین عملکرد و سپس هیبریدهای ۳۱ × ۳۲، ۱۰۴ × ۱۰۳، ۱۰۴ × ۱۰۳ و Jinyong × Haoyue به ترتیب عملکرد بالایی داشتند و بقیه هیبریدها اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (۱۹). از نظر وزن شفیره‌ها در تمام هیبریدها وزن شفیره ماده بیشتر از وزن شفیره نر است و در بین هیبریدها نیز هیبرید چینی کمترین وزن شفیره نر و شفیره ماده را دارد در حالی که بیشترین وزن شفیره نر در هیبرید ۱۵۳ × ۱۵۴ و برای شفیره ماده مربوط به هیبرید ۱۵۴ × ۱۵۱ است.

از نظر وزن قشر پيله و درصد قشر ابریشمی در پيله‌ها در جنس ماده بیشترین میانگین در هیبرید ۱۵۳ × ۱۵۴ مشاهده شد در حالی که در جنس نر بیشترین میانگین وزن قشر پيله مربوط به هیبریدهای ۱۵۳ × ۱۵۴ و ۳۲ × ۳۱ و همچنین بیشترین درصد قشر ابریشمی مربوط به هیبرید ۱۰۴ × ۱۰۳ بود. در تحقیق عبداللهیان و همکاران (۱۹) مشخص شد در بین هیبریدهای ایرانی و خارجی مورد مطالعه هیبرید خارجی Jinyong × Haoyue دارای وزن قشر پيله مناسبی بودند. همچنین هیبرید ۳۱ × ۳۲ بیشترین عملکرد را داشتند.

بیشترین میانگین وزن قشر یک پيله خوب مربوط به هیبرید ۳۲ × ۳۱ (۰/۳۹ گرم) و کمترین آن مربوط به هیبریدهای چینی و ۱۵۱ × ۱۵۴ (به ترتیب با ۰/۲۹ و ۰/۳۱ گرم) بود. در حالی که بیشترین میانگین درصد قشر ابریشمی یک پيله خوب مربوط به هیبرید ۱۵۳ × ۱۵۴ با ۲۵/۱۰٪ بود که این به دلیل داشتن شفیره‌های نسبتاً کم وزن است.

از نظر تخم‌گذاری پروانه‌های هیبرید ۳۲ × ۳۱ با ۶۰۴ تخم توليدي، بیشترین مقدار تخم گذاشته شده را داشتند. در مقابل تعداد تخم لقاح نشده در هیبرید چینی کمترین مقدار و در هیبرید ۱۰۴ × ۱۰۳ بیشترین مقدار بود. همچنین درصد تفریح در سه هیبرید ۱۵۳ × ۱۵۴، ۱۵۱ × ۱۵۴ و ۱۵۴ × ۱۵۳ کمترین مقدار را داشتند. در یک بررسی کرم‌های ابریشم نشان داد که تخم‌گذاری نژادهای مورد مطالعه از حداقل ۴۷۷ تخم برای نژاد BNR10 تا بالاترین میزان ۵۳۰ تخم در نژاد BRN3 متفاوت بود. همچنین در بین هیبریدها بیشترین تخم‌گذاری مربوط به هیبرید BNR1 × BNR6 (۵۳۲ تخم به ازاء هر پروانه) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که هیبریدها نسبت به نژادهای خالص کرم ابریشم دارای میزان تخم‌گذاری بالاتری هستند (۲۱).

نتیجه گیری کلی

میانگین وزن قشر در یک پيله خوب، میانگین وزن یک پيله خوب تولیدی و وزن پيله تولیدی به طور معنی داری دارای برتری عملکرد بود ($P < 0.05$). لذا برای منطقه تربت حیدریه این هیبرید ایرانی توصیه می شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تربت حیدریه می باشد که بدینوسیله تشکر و قدردانی می گردد.

با توجه به نتایج به دست آمده از پرورش شش هیبرید ایرانی و یک هیبرید چینی در شهرستان تربت حیدریه می توان گفت که هیبریدهای ایرانی نسبت به هیبرید وارداتی چینی عملکرد بالاتری دارند که با توجه انجام انتخاب و سازگاری این هیبریدها با شرایط ایران به نظر منطقی می آید و لذا واردات هرگونه جدید از تخم نوغان بدون آزمایش عملکرد آن ها می بایست خودداری شود. همچنین در بین هیبریدهای ایرانی اگرچه در بسیاری از صفات تفاوت معنی داری مشاهده نشد، ولی هیبرید 32×31 برای صفات تعداد تخم گذاشته شده توسط یک پروانه،

منابع

- 1-Seidavi, A. R., S. Z. Mirhosseini, A. R. Bizhannia, and M. Ghanipoor. 2007. Investigation on selection efficiency for some quantitative cocoon characters at 3P lines and it's correlation with reproduction and resistance against diseases parameters of hybrids (F1) silkworm. Iranian Biology, 20(3): 262-268. (In Persian).
- 2- Mirhosseini S. Z., M. Ghanipoor, A. Shadparvar, and K. Etebari. 2005. Selection indices for cocoon traits in six commercial silkworm (*Bombyx mori*) lines. Philippine Agriculture Science, 88:328-336. (In Persian).
- 3-Zhao, Y., K. Chen, and S. He. 2007. Key principles for breeding spring and autumn silkworm varieties: From our experience of breeding 873×874. Caspian Journal of Environmental Science, 5(1): 57-61.
- 4-Mirhoseini, S. Z., A. R. Seidavi, M. Ghanipoor, and K. Etebari, 2004. Estimation of general and specific combining ability and heterosis in new varieties of silkworms. *Bombyx Mori* L. Journal of Biological Sciences, 4(6): 725-730. (In Persian).
- 5-Keramatto, H., A. M. Gharah Bash, J. Bayat Kohsar, and M. Keramatto. 2017. Comparison of size and diameter of Iranian and foreign silkworm cocoon (*Bombyx mori*) in Minoodasht town. Page 46 in Proc. Iranian National Conference of Silkworm, Guilan University, Rasht. (In Persian).
- 6-Keramatto, H., A.M. Gharah Bash, J. Bayat Kohsar, and Keramatto, M. 2017. Comparison of weight and shell of Iranian and foreign silkworm cocoon (*Bombyx mori*) in Minoodasht town. . Page 62 in Proc. Iranian National Conference of Silkworm, Guilan University, Rasht. (In Persian).
- 7-Hossini Moghadam, S.H., N. Emam Gomeh, and A. Gerami. 2000. An evaluation of genetic parameters of economic traits in four varieties of silkworm (*Bombyx mori*). Iranian Journal of Agricultural Science, 31(4): 767-772. (In Persian).
- 8-Ghanipoor, M., S. Z. Mirhosseini, A. Shadparvar, A. Seidavi, and A. Bizhannia. 2008. Comprision of different multi-trait selection strategies for genetic improvement of economic in six Iranian commercial lines of the silkworm, *Bombyx mori* (Lep.:Bpmbycidae). Letter of Insectology Society, 27(2): 1-16.
- 9-Ghanipoor, M. 2002. Determination of index selection for three commercial varieties of Iranian silkworm. Thesis of Master of Science, Department of Animal Science, Guilan University. (In Persian).
- 9-Hosseini Moghadam, S.H., S. Z. Mirhosseini, M. Ghanipoor, and A. R. Seidavi. 2011. Study of some of nutritional indices silkworm commercial hybrids in five instar larva. Iranian Journal of Animal Science Research, 3(3): 311-323. (In Persian).
- 10- Vidyunmala, S., B. N. Murphy, and N. S. Reddy. 1998. Evaluation of new mulberry silkworm *Bombyx mori* L. hybrids (multivoltine×bivoltine) through multiple trait evaluation indexes. Journal of Entomological Research, 22(1): 49-53.
- 11-Ashoka, J., R. Govindan, R. N. Raju, and S. G. Rayar. 1989. Performance of some bivoltine silkworm breeds and hybrids for larval traits. Environment and Ecology, 7 (2): 354-357.
- 12- Buhroo, Z. I., M. A. Malik, N. A. Ganai, A. S. Kamili, and B. A. Bhat. 2016. Evaluation of some silkworm *Bombyx mori* L. genotypes for cocoon associated traits during different Seasons. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 3(10): 225-231
- 13-Vishgahi Sedigh, S., A. R. Bizhannia, S. Z. Mirhosseini, and A. R. Seidavi. 2007. Evaluation of hybrids performance of five Iranian native silkworm (Lepidoptera, Bombicidae, *Bombyx. mori* L.) with two improved breeds. Journal of Agriculture Science, 13(4): 897-903.(nPersia in) .

- 14-Amini, H., J. J. J. Sendi, H. Hosseini Moghadam, H. Ghafouri, and M. Sharifi. 2014. Comprative study on biochemical indices of silkworm (*Bombyx mori*) hybrids for their thermal stress. *Plant Pest Research*, 4(4): 71-81.
- 15-Mandal, K., and S. M. Moorthy. 2016. Analysis of phenotypic stability for yield components in bivoltine silkworm hybrids. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1): 378-385.
- 16- Seetharamulu, J., S. V. Seshagi, H. Lakshmi, and P. J. Raju. 2017. APC1 x APJ1- A promising bivoltine silkworm(*Bombyx mori*) hybrid for costal region. *International Journal of Applied Research*, 2(6): 750-753.
- 17-Seydavi. A., M. R. Gholami, and M. R. Biabani. 2003. Resistance Evaluation of Pure Lines of Silkworm *Bombyx mori* L. against the Pathogen of White Muscardine Disease *Beauveria bassiana*. *J Iranianjournal of Agriculture Science*, 34(۳): 701-710. (In Persian).
- 18- Ito, T. 1987. Silkworm nutrition in the silkworm an important laboratory tool. Tazima, Y. (ed), pp.121-157, Ko. LTD., Tokyo
- 19- Nematolahian, S., A. Torfeh, M. A. Mavajpoor, S. H. Hosseini moghadam, and A. R. Seidvavi. 2016. Study of production performance of different indigenious and foreigner silkworm hybrids. *Animal Biological Environmental*, 8(1): 85-94. (In Persian).
- 20-Satenahalli, S. B., R. Govindan, and J. V. Goud. 1988. Variation in some polygenic traits of silkworm breeds and their F1 hybrids. *Environment and Ecoligy*, 6(4): 855-857.
- 21-Lakshmi, L.V., P. Sujathamma, and S. Sivaprasad. 2014. Studies on the manifestation of hybrid vigour and combining ability in bivoltine hybrid of mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. tolerant to BMNPV. *Research Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 1(2):44-53.



Performance of Seven Silkworm Varieties in Torbat Heydarieh

M. Alipanah^{1*} - Z. Abedian² - A. Nasiri² – F. Sarjamei²

Submitted: 16-09-2018

Accepted: 11-11-2019

Introduction: City of Torbat Heydarieh in the northeast of Iran is one of the most important region in rearing silkworm in country. In Iran, two types of silkworm are used for rearing, mostly hybrids produced in center of Iran silkworm research, also in some regions some of imported hybrids using for rearing. Understanding the resistance and sensitivity of these hybrids is essential for choosing the best hybrid in each region and for understanding their genetic capabilities to apply future breeding hybrid. In addition, considering the conditions in the traditional and industrial field of silkworm breeding, which is suffering from many contamination and morality reasons, the selection of resistant strains and hybrids is important for preventing a severe drop in production.

The goals of many of previous experiments were to identify the proper hybrid for each region. Results of studies in Iran showed that Iranian hybrids as 103 x 104, 104 x 103, 31 x 32 and 154 x 151 are proper for rearing in some region in Iran.

Seven Iranian commercial silkworm hybrids were hatched and reared during the spring 2016 in center of silkworm development of Torbat Heydarieh. Propose of the study was compare of performance for silkworm hybrids.

Materials and Methods : The field survey was conducted for determination of performance in six Iranian silkworm hybrids namely 154 x 153, 32 x 31, 104 x 103, 151 x 154, 154 x 151, 153 x 154 and one Chinese hybrid. Study was carried out by feeding on the mulberry variety Kenmuchi. For the propose one box of disease-free laying of each hybrid was obtained from Iran Sericulture Research Center (ISRC) and the eggs were rearing in the center of sericulture development of Torbat Heydarieh under standard conditions of 25°C with RH of 80 and photoperiod of 16L:8D. After hatching, silkworm larvae fed base on standard rearing conditions. The larvae were fed with the healthy leaves of Kenmuchi mulberry tree. After finishing of rearing stages, the produced cocoons were collected. Some of recorded traits were including: number of live larva, number of live pupa, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell percent, color of cocoon shell and duration of larva period. Results according by CRD were analysis using procedure of GLM in SAS 9.2.

Results and Discussion: While Iranian Hybrids in this study were similar for many of quality trait, Chinese hybrid was different in most of the traits. Chinese hybrid has longer molt period for 3th instar, young larvae and longer nutritional period for 4th instar, 5th instar and adult larvae, also the hybrid has longer larvae period in compare with Iranian hybrids.

Results of analysis showed that Chinese hybrid had most number of good cocoons in litter ($P < 0.05$) due to mean good cocoon weight in this hybrid was lowest in compare with hybrids .

Results showed that Chinese hybrid had the lowest good cocoon weight and good cocoon mean ($P < 0.05$). Mean weight of a good cocoon with female pupa in 32 x 31 and 151 x 154 hybrids was more than other hybrids, meanwhile Chines hybrid showed lowest weight ($P < 0.05$). Male pupa in different hybrids had similar weight, but female pupa in 151 x 154 hybrid and Chines hybrid showed the most and the least weight, respectively. In other hand, 32 x 31 had a higher performance for these traits. Chines hybrid and 151 x 154 hybrid showed lowest mean of cocoon shell weight meanwhile, for the trait 32 x 31 had most performance. Number of egg laying in 32 x 31 hybrids was higher in compare with other hybrids. For other traits did not observe difference between studied hybrids although, for example 151 x 154 and Chines hybrid had the least number of cocoon production and number of good cocoon. Other studies identified that using directly of imported hybrids for rearing in different region of Iran will not lead to good results.

1- Associated Professor, Plant production Department, University of Torbat Heydarieh

2 -Centre of Sericulture of Khorasan Razavi Province, Torbat Heydarieh

(*- Corresponding Author Email: m.alipanah@torbath.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v12i3.75418

Conclusion: According to the results, Chinese hybrid had the lowest value for rearing in Torbat Heydarieh region due to the hybrid has the lowest mean of good cocoon and weight of shell cocoon. Although Iranian hybrids in most of traits had similar performance but this study indicates that 32×31 is better for cocoon production in Torbat Heydarieh Region.

Keywords: Cocoon, Hybrid, Larvae, Performance, Sericulture, Silkworm.

Contents

Ruminant Nutrition

Introducing a linear model for estimating forage sorghum metabolizable energy by using fiber components	275
--	------------

Hossein Gholami and Mohammad Babaei

Effect of aflatoxin B1 and aluminosilicate toxin adsorbents on the parameters of gas production, fermentation and ruminal digestion <i>in vitro</i>	288
--	------------

Mohsen Mojtahedi , Mohsen Danesh Mesgaran, Majid Hayati-Ashtiani, Seyed Alireza Vakili and Seyed Morteza Vaghar Seyedin

Chemical composition and ruminal dry matter and protein degradation parameters of canola meal treated by microwave irradiation	304
---	------------

Sayyed Roohollah Ebrahimi, Mahmoudabad, Ali Nikkhah and Ali Asghar Sadeghi

Effect of different levels of probiotics and organic acid supplements on performance, skeletal growth, nutrition activity and blood and immune metabolites in Holstein calves	321
--	------------

Mehdi Jamali, Farzad Mirzaei Aghjeh gheslagh, Jamal Seifdavati, Bahman Navidshad, Reza Seyedsharifi and Roghaye Valizadeh Yonjalli

Poultry Nutrition

Effect of selenium nanoparticles on performance, antioxidant status, blood parameters and oxidative stability of eggs in laying hens	334
---	------------

Amir Hossein Shafiei, Mokhtar Fathi and Timour Tanha

Effect of selenium with vitamin E on production performance, immune response and blood metabolites of laying Japanese quail	348
--	------------

Hossein Ahmadian, Zabehollah Nemati, amir Karimi, Rashid Safari, Mohammad Reza Sheeikhloo and Maghsoud Besharati

Genetic and Breeding

Designing of Protein Structural of Ranpirnase Based on Bovine Pancreatic Ribonuclease with Using Molecular Dynamic and Static Simulation	359
---	------------

Hamid Ariannejad, Mohammadreza Nassiri, Ali Javadmanesh, Shahrokh Ghovvati, Hesam Dehghani and Ahmad Asoodeh

Genetic analysis of production traits in Iranian Holstein cows considering genetic grouping	371
--	------------

Yahya Khaleghi fard, Mohammad Rokouei, Ahmad Moghimi Esfand Abadi and Hadi Faraji-Arough

Bioinformatics Analysis of Human Milk Protein and Bioactive Peptides alpha s-1 casein Effect on Inhibiting ACE Enzyme and Its Comparison In Different Mammalian Species	384
--	------------

Hojatallah Yami1, Mojtaba Tahmoorespur and Marjan Azghandi

Effect of Different Levels of Methionine on Immune Function and IFN-γ Gene Expression in Broilers Chickens	397
---	------------

Hamidreza Seyedabadi, Khadijeh Nasiri, Zahra Roudbari, Seyyad Abdollah Hosseini and Abolfazl Akbari

Other

Performance of seven silkworm varieties in Torbat Heydarieh	408
--	------------

Masoud Alipanah, Zabihoallah Abedian, Abdolaazim Nasiri and Farid Sarjamei

« Scientific Journal »
Iranian Journal of Animal Science Research

Vol. 12

No. 3

Fall 2020

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad (F.U.M.)

Responsible Manager: H. Nassiri Moghaddam (Prof.)

Editor-in-Chief: R. Valizadeh (Prof.)

Editorial Board:

R. Valizadeh	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Danesh Mesgaran	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
G.R. Ghorbani	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Esfahan Technology University
S.M. Tabatabaee	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Bo Ali-Sina University of Hamedan
M. Chaji	Ruminant Nutrition	(Asso. Prof.)	Agricultural Science and Natural Resources University Of Khuzestan
H. Nassiri-Moghaddam	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
A. Golian	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
J. Pour-Reza	Poultry Nutrition	(Prof.)	Esfahan Technology University
F. Boldaji	Poultry Nutrition	(Prof.)	Gorgan Agricultural and Natural Resources University
A. Hassanabadi	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
B. Dastar	Poultry Nutrition	(Prof.)	Gorgan Agricultural and Natural Resources University
J. Zamiri	Animal Physiology	(Prof.)	Shiraz University
N. Pirani	Genetics & breeding	(Asso. Prof.)	Shahre kord University
M.R. Nassiri	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Tahmoorepour	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
S. Zerehdaran	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Sargolzaei	Genetics	(Asso. Prof.)	University of Guelph, Canada

Printed by: Ferdowsi University of Mashhad, Press.

Address: P.O. Box 91775-1163, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Phone: +98-51-38804656

Fax: +98-51-38787430

E-Mail: ijasr@ferdowsi.um.ac.ir

Web Site: <https://ijasr.um.ac.ir>