



Contents

Ruminant Nutrition Interaction effect of soy oil and alfalfa hay in starter diet of Holstein dairy calves on performance, growth indices, ruminal fermentation and blood metabolites	333
Abazar Karimi, Younes Alijoo, Mahdi Kazemi-Bonchenari, Mmehdi Mirzaei and Hassan Sadri	
Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> bacteria isolated from rumen	348
Hojat Imani Moghadam, Samaneh Ghasemi, Saeid Sobhanirad and Mehdi Behgar	
Poultry Nutrition Effect of mummy powder and <i>Pulicaria gnaphalodes</i> extract on growth performance, immune system and intestine morphology of broiler chickens	367
Faezeh Ahmadzadeh, Seyyed Javad Hosseini-Vashan, Nazar Afzali and Ali AllahRessani	
Determination of Metabolizable Energy of Corn Processed at Different Temperatures and Effect of their Inclusion in Mash Diets with and without Enzyme Supplementation on Growth Performance and Small Intestine Morphology of Broiler Chickens During 1-24 days	387
Mohsen Teymouri, Ahmad Hassanabadi, Hassan Nasiri-Moghaddam and Abolghasem Golian	
The effects of <i>in ovo</i> injection of synbiotic on hatchability, chick quality, blood indices and performance of newly hatched chicks of Japanese Quail	403
Shadieh Asaadi, Mohsen Daneshyar and Younes Alijoo	
Evaluation of performance, nutrients digestibility, and immune system responses in broiler chickens fed on wheat-based diet supplemented with different levels of vitamin A	415
Soghra Hatami, Mohammad Reza Akbari and Fariborz Khajali	
Comparing Effect of Lysine-HCl and Biolys-Sulfate on Broiler Chickens Performance, Immune Response, Blood Metabolites and Bone parameters	427
Hadis Heydari, Ali Khatibjoo, Farshid Fattahnia, Mohammad Akbari-Gharaei and Hassan Shirzadi	
Genetic and Breeding Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics	439
Mahsa Zabetian, Mohammadreza Nassiri, Ali Javadmanesh and Shahrokh ghovati	
Estimation of genetic and phenotypic parameters of logistic growth curve and their inter-relationship in Zandi Sheep	450
Saeid Neysi, Hedayatollah Roshanfekr, Jamal Fayazi and Morteza Mamouei	
Comparison of principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of principal component (DAPC) methods for analysis of population structure in Akhal-Take, Arabian and Caspian horse breeds using genomic data	461
Nasrin Babaei, Abbas Rafat, Mohammad Hossein Moradi and Mohammad Reza Feizi Derakhshi	
Rejuvenation and Multiple-Trait Selection in the Five Chinese-Shape of Parental Silkworms	473
Moineddin Mavvaipoor, Seyed Ziaeddin Mirhoseini, Seyed Hossein Hosseini Moghaddam, Shahla Nematollahian, Farjad Rafiee, Navid Ghavi Hossein-Zadeh and Yuosof Kheirkhah	

عنوان مقالات

تغذیه نشخوارکنندگان

بررسی اثر متقابل روغن سویا و علوفه پونجه در جیره استارت گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بر عملکرد، چ فراسنجه‌های رشد، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی

۳۲۱

اباذر کریمی، یونس علی‌جو، مهدی کاظمی بن‌چناری، مهدی میرزایی و حسن صدری

سطوح مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در تکنیک تولید گازو تأثیرات ضد میکروبی

آنها بر باکتری پیتواستریتو-کوکوس انتریبوس (*Peptostreptococcus anaerobius*) جداسازی شده از شکمبه

۳۳۵

حجت ایمانی مقدم، سمانه قاسمی، سعید سبحانی راد و مهدی بهگر

تغذیه طیور

اثر پودر مومیایی و عصاره علف همیشه بر عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده باریک جوجه گوشتی

۳۵۱

فاخره احمدزاده، سید جواد حسینی و اشان، نظر افشلی و علی اله رسائی

تعیین انرژی قابل متابولیسم ذرت فرآوری شده در دماهای مختلف و اثر آن در جیره‌های با و بدون مکمل آنزیمی

بر عملکرد رشد و مورفولوژی روده کوچک جوجه‌های گوشتی در دوره ۲۴-۱ روزگی

۳۶۹

محسن تیموری، احمد حسن آبادی، حسن نصیری مقدم و ابوالقاسم گلیان

اثرات تزریق داخل تخم سین‌بیوتیک بر درصد جوجه درآوری، کیفیت جوجه، فراسنجه‌های خونی و عملکردی

جوجه‌های تازه تفریخ شده بلدرچین ژاپنی

۳۸۹

شادیه اسعادی، محسن دانشیار و یونس علی‌جو

اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین A به جیره‌های پر پایه گندم بر عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و پاسخ ایمنی

جوجه‌های گوشتی

۴۰۵

صغری حاتم، محمدرضا اکبری و فریبرز خواجهلی

مقایسه تأثیر لیزین هیدروکلراید و بایولیزینولات بر عملکرد، پاسخ ایمنی، فراسنجه‌های خونی و

استخوانی جوجه‌های گوشتی

۴۱۷

حدیث حیدری، علی خطیب‌جو، فرشید فتح‌نیا، محمد اکبری‌قرانی و حسن شیرزادی

ژنتیک و اصلاح

تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نوترکیب ریپونوکلئاز پاتکراس گوسفند

۴۲۹

مهسا ضابطیان، محمدرضا نصیری، علی جوادمنش و شاهرخ قوتی

بر آورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی منحنی رشد لجستیک و همبستگی مولفه‌ها در گوسفند زندی

۴۴۱

سعید نبی، هدایت اله روشنفکر، جمال فیاضی و مرتضی ممویی

مقایسه روش‌های تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) در بررسی ساختار

جمعیتی نژادهای اسب آخال‌تکه، عرب و کاسپین با استفاده از اطلاعات ژنومی

۴۵۳

نسرین بابایی، سید عباس رافت، محمدحسین مرادی و محمدرضا فیضی درختی

نوترکیبی و انتخاب چند صفتی در پنج والد ژاپنی - شکل کرم ابریشم

۴۶۳

معین الدین مواج پور، سید ضیاءالدین میرحسینی، سید حسین حسینی مقدم، شهاب نعمت اللهبیان، فرجاد رفیعی، نوید قوی حسین زاده و یوسف خیرخواه

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 ۱۳ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۰

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر حسن نصیری مقدم

سرمدبیر: 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

اسامی ارزیابان جلد ۱۳ شماره ۳ (پاییز ۱۴۰۰) نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران (به ترتیب الفبا)

مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس	دکتر محمد جواد آگاه
دانشگاه آزاد اسلامی گلبهار	دکتر مهدی الهی ترشیزی
دانشگاه گنبد کاووس	دکتر جواد بیات کوهسار
دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان	دکتر محمدتقی بیگی نصیری
دانشگاه بیرجند	دکتر سید محمد حسینی
دانشگاه تبریز	دکتر علی حسین خانی
دانشگاه اراک	دکتر امیرحسین خلت آبادی فراهانی
دانشگاه ارومیه	دکتر محسن دانشیار
دانشگاه فردوسی مشهد	دکتر محمد هادی سخاوتی
دانشگاه محقق اردبیلی	دکتر جمال سیف دواتی
دانشگاه فردوسی مشهد	دکتر محمد مهدی شریعتی
دانشگاه تبریز	دکتر محمدرضا شیخلو
دانشگاه تبریز	دکتر مجید علیایی
دانشگاه ارومیه	دکتر یونس علی علیجو
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور	دکتر امیرحسین علیزاده قمصری
دانشگاه لرستان	دکتر علی فروهر مهر
دانشگاه گیلان	دکتر شاهرخ قوتی رودسری
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور	دکتر هوشنگ لطف الهیان
دانشگاه شهید باهنر کرمان	دکتر محمدرضا محمد آبادی
دانشگاه گنبد کاووس	دکتر فرید مسلمی پور
دانشگاه آزاد اسلامی - واحد مراغه	دکتر علی نوبخت
دانشگاه ایلام	دکتر صیفعلی ورمقانی
دانشگاه فردوسی مشهد	دکتر رضا ولی زاده

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

تغذیه نشخوار کنندگان	صفحه
بررسی اثر متقابل روغن سویا و علوفه یونجه در جیره استارتو گوساله های شیر خوار هلشتاین بر عملکرد، فراسنجه های رشد، تخمیر شکمبه ای و متابولیت های خونی	۳۲۱
اباذر کریمی، یونس علی جو، مهدی کاظمی بن چناری، مهدی میرزایی و حسن صدری	
سطوح مختلف اسانس های میخک و مرزه بر فراسنجه های تخمیری در تکنیک تولید گاز و تأثیرات ضد میکروبی آنها بر باکتری پیتواسترپتو کوکوس انروبیوس (<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>) جداسازی شده از شکمبه حجت ایمانی مقدم، سمانه قاسمی، سعید سبحانی راد و مهدی بهگر	۳۳۵
تغذیه طیور	
اثر بودر مومیایی و عصاره علف هیضه بر عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده باریک جوجه گوشتی	۳۵۱
فاظه احمدزاده، سید جواد حسینی واشان، نظر افضلی و علی اله رسانی	
تعیین انرژی قابل متابولیسم ذرت فرآوری شده در دماهای مختلف و اثر آن در جیره های با و بدون مکمل آنزیمی بر عملکرد رشد و مورفولوژی روده کوچک جوجه های گوشتی در دوره ۲۴ - ۱ روزگی	۳۶۹
محسن تیموری، احمد حسن آبادی، حسن نصیری مقدم و ابوالقاسم گلیان	
اثرات تزریق داخل تخم سین بیوتیک بر درصد جوجه درآوری، کیفیت جوجه، فراسنجه های خونی و عملکردی جوجه های تازه تفریخ شده بلدرچین ژاپنی	۳۸۹
شادیه اسعدی، محسن دانشیار و یونس علی جو	
اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین A به جیره های بر پایه گندم بر عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و پاسخ ایمنی جوجه های گوشتی	۴۰۵
صغری حاتمی، محمدرضا اکبری و فریرز خواجلی	
مقایسه تأثیر لیزین هیدروکلراید و بایولیز سولفات بر عملکرد، پاسخ ایمنی، فراسنجه های خونی و استخوانی جوجه های گوشتی	۴۱۷
حدیث حیدری، علی خطیب جو، فرشید فتاح نیا، محمد اکبری قرائی و حسن شیرزادی	
ژنتیک و اصلاح	
تولید و بررسی ویژگی های آنزیم نوترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند	۴۲۹
مهسا ضابطیان، محمدرضا نصیری، علی جوادمنش و شاهرخ قوتی	
برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی منحنی رشد لجستیک و همبستگی مولفه ها در گوسفند زندی	۴۴۱
سعید نیسی، هدایت اله روشنفکر، جمال فیاضی و مرتضی ممویی	
مقایسه روش های تجزیه مؤلفه های اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه های اصلی (DAPC) در بررسی ساختار جمعیتی	۴۵۳
نژادهای اسب آخال تکه، عرب و کاسپین با استفاده از اطلاعات ژنومی	
نسرین بابائی، سید عباس رافت، محمدحسین مرادی و محمدرضا فیضی درختی	
نوترکیبی و انتخاب چند صفتی در پنج والد ژاپنی - شکل کرم ابریشم	۴۶۳
معین الدین مواج پور، سید ضیاء الدین میر حسینی، سید حسین حسینی مقدم، شهلا نعمت اللهیان، فرجاد رفیعی، نوید قوی حسین زاده و یوسف خیرخواه	

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)

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.

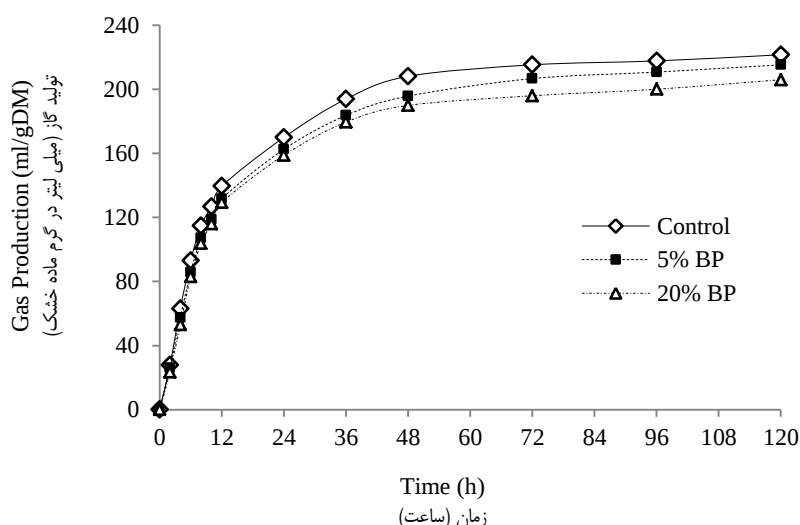
²Blood urea nitrogen

³Aspartate Aminotransferase

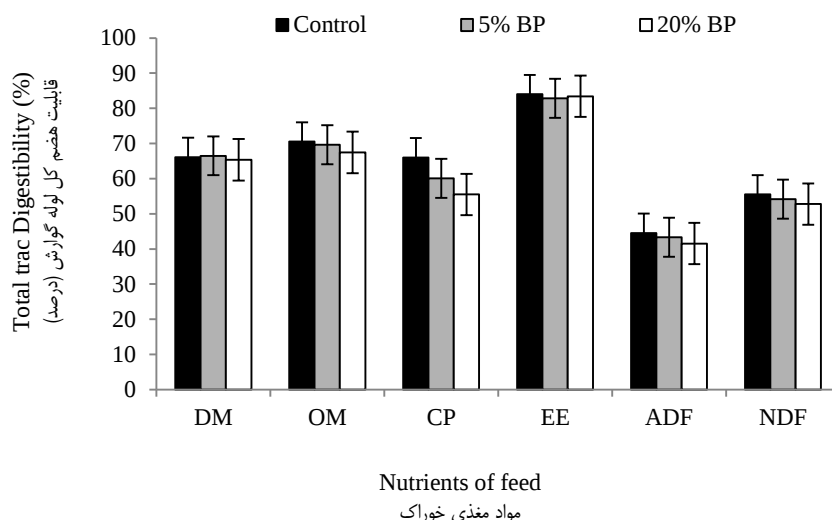
⁴Alanine Aminotransferase

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 در مورد 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 مسوول 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

بررسی اثر متقابل روغن سویا و علوفه یونجه در جیره استارتر گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بر عملکرد، فراسنجه‌های رشد، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی

اباذر کریمی^۱، یونس علی‌جو^{۲*}، مهدی کاظمی بن چناری^۳، مهدی میرزایی^۴، حسن صدری^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۳

کریمی، ا.، ی. علی‌جو، م. کاظمی بن چناری، م. میرزایی، و ح. صدری. ۱۴۰۰. بررسی اثر متقابل روغن سویا و علوفه یونجه در جیره استارتر گوساله‌های شیرخوار هلشتاین بر عملکرد، فراسنجه‌های رشد، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۲۱-۳۳۴.

چکیده

جهت بررسی اثرات افزودن روغن سویا در جیره‌های استارتر بدون علوفه و حاوی علوفه بر عملکرد، صفات رشد، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیت‌های خونی تعداد ۴۰ رأس گوساله شیرخوار هلشتاین با میانگین سنی ۳ روز و میانگین وزنی $39 \pm 2/2$ کیلوگرم در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۱۰ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) خوراک آغازین بدون یونجه و روغن سویا (شاهد)؛ (۲) خوراک آغازین حاوی ۱۵ درصد یونجه؛ (۳) خوراک آغازین حاوی ۳ درصد روغن سویا؛ (۴) خوراک آغازین حاوی ۳ درصد روغن سویا و ۱۵ درصد یونجه. مدت آزمایش ۶۳ روز بود. خوراک آغازین مصرفی روزانه اندازه‌گیری شد. وزن کشتی گوساله‌ها، فاکتورهای رشد، فراسنجه‌های خونی، تعیین pH و فراسنجه‌های شکمبه انجام شد. با افزودن روغن سویا و یونجه در جیره گوساله‌ها خوراک آغازین مصرفی کاهش پیدا کرد و کم‌ترین وزن از شیرگیری مربوط به این تیمار بود و همچنین ارتفاع جدوگاه و هیپ در این تیمار کاهش یافت. مصرف روغن سویا و یونجه سبب کاهش کل اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای شد (به ترتیب برابر ۹۳/۱، ۸۹/۹، ۹۰/۴ و ۷۸/۲ میلی مول در لیتر برای تیمارهای ۱ تا ۴ بود). استفاده از یونجه سبب کاهش غلظت پروپیونات و بوتیرات در شکمبه شده ولی سطح استات را افزایش داد. اثر متقابل یونجه و روغن سویا غلظت گلوکز، پروتئین کل سرم را کاهش و غلظت کلسترول سرم خون را افزایش داد. استفاده از یونجه سبب افزایش غلظت اوره خون و کاهش غلظت بتا‌هیدروکسی بوتیرات شد. با توجه به نتایج این آزمایش، استفاده از روغن سویا به همراه یونجه به دلیل کاهش عملکرد رشد، تاثیر منفی بر تخمیر شکمبه‌ای و فراسنجه‌های خونی توصیه نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تخمیر شکمبه‌ای، روغن سویا، سطح علوفه، گوساله‌های شیرخوار.

مقدمه

می‌تواند بر آینده تلیسه جایگزین و تولید شیر تاثیر داشته باشد (۲۳). استفاده از چربی‌ها به دلیل کاهش گرد و غبار جیره، افزایش انرژی جیره و قابلیت کاهش تولید متان در تخمیر شکمبه‌ای در نشخوارکنندگان مد نظر قرار گرفته است (۴۵ و ۱۵). در سال‌های اخیر محققین بیان کردند یکی از مهم‌ترین ترکیبات مواد مغذی در جیره گوساله‌های شیرخوار که سبب افزایش مصرف خوراک و توسعه

رشد و توسعه شکمبه فرآیندی پیچیده بوده که به میزان بالایی تحت تاثیر تدابیر تغذیه‌ای قرار می‌گیرد. (۹ و ۲۰). ویژگی‌های جیره استارتر و اقلام مواد مغذی همچون چربی، پروتئین و علوفه ارتباط زیادی با رشد مناسب شکمبه و از شیرگیری موفق دارد که در نهایت

۵- دانشیار بخش علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

(*) نویسنده مسئول: Email.alijoo@urmia.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.v13i3.86191

۱، ۲- دانشجوی دکتری تغذیه نشخوارکنندگان و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳، ۴- دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

تاکستان استان قزوین انجام گرفت. بدین منظور از ۴۰ راس گوساله هلشتاین ماده تازه متولد شده با میانگین سنی ۳ روز و میانگین وزنی ۳۹ کیلوگرم (انحراف معیار ۲/۲ کیلوگرم) با ۴ تیمار و ۱۰ تکرار به طور کاملاً تصادفی در قالب طرح فاکتوریل (۲×۲) استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) خوراک آغازین بدون مکمل روغن و یونجه (شاهد)؛ ۲) خوراک آغازین با ۱۵ درصد یونجه؛ ۳) خوراک آغازین با ۳ درصد مکمل روغن سویا؛ ۴) خوراک آغازین با ۳ درصد مکمل روغن به همراه ۱۵ درصد یونجه بودند. گوساله‌ها در ۲۴ ساعت اول پس از تولد، از مادران خود جدا شده و ضدعفونی ناف با محلول تتوئید انجام گرفت و پس از وزن کشی به باکس‌های انفرادی منتقل شدند. سپس ۴ لیتر آغوز در دو نوبت و در ۸ ساعت اولیه تولد تغذیه شد از روز سوم با ثبت داده‌های رشد و وزن گوساله‌ها آزمایش شروع گردید. شیردهی گوساله‌ها روزانه در دو نوبت (ساعت ۸ صبح و ساعت ۱۶) انجام شد. برنامه شیردهی گوساله‌ها در همه تیمارها یکسان بود و حجم شیر مصرفی تا پایان دوره برای گوساله‌ها مشابه بود. جیره آغازین از روز اول آزمایش به صورت آزاد در اختیار گوساله قرار گرفت تا بر اساس اشتها مصرف گردد. آب آشامیدنی نیز همراه با استارتر از همان روز سوم به صورت مصرف آزاد در اختیار گوساله‌ها قرار گرفت و تنها یک ساعت قبل تا یک ساعت پس از شیردهی از دسترسی گوساله‌ها به آب جلوگیری شد. تغذیه گوساله‌ها از شیر در طی ۱۴ روز اول به مقدار ۴ لیتر، از ۱۵ الی ۶۰ روزگی به مقدار ۷ لیتر و از ۶۰ الی ۶۳ روزگی به مقدار ۳ لیتر بود و در روز ۶۳ قطع شیر گردیدند که با قطع شیر آزمایش نیز به پایان رسید. جیره‌های آزمایشی و ترکیب شیمیایی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای انجام تجزیه شیمیایی نمونه‌های خوراک، ابتدا نمونه‌ها به قطعات ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. سپس خاکستر، ماده خشک، پروتئین خام و چربی خام با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (۶). برای اندازه‌گیری خاکستر، پروتئین خام و چربی خام نمونه‌های خوراک به ترتیب از دستگاه‌های کوره الکتریکی، کلدال و سوکسله استفاده شد. مقدار ماده خشک جیره‌ها با استفاده از آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. دیواره سلولی با دستگاه فایبرتک و با روش ون‌سوست و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد (۴۸). مقدار کربوهیدرات‌های غیرالیافی نمونه‌ها بر اساس فرمول پیشنهاد شده (۴۳) محاسبه شد.

در طول ۶۰ روز دوره آزمایشی، جیره‌های غذایی پس از توزین روزانه در اختیار گوساله‌ها قرار گرفت. برای تعیین میزان مصرف خوراک، قبل از ریختن خوراک وعده صبح، باقیمانده خوراک روز قبل جمع‌آوری و ثبت شدند. گوساله‌ها هر ده روز یکبار وزن کشی شدند به گونه‌ای که تا پایان آزمایش ۶ بار توزین با فواصل ده روز یک بار صورت گرفته بود.

فاکتورهای رشد شامل دور سینه، عرض هیپ، ارتفاع هیپ، ارتفاع جدوگاه، طول بدن و قد به وسیله متر استاندارد در زمان ورود به طرح و در زمان آخر دوره پرورشی که برابر روز از شیرگیری بود اندازه‌گیری

شکمبه در پیش از شیرگیری می‌شود، چربی‌ها می‌باشند (۹ و ۲۷). در مطالعات انجام شده توسط هیل و همکاران (۲۶)، کدخدایی و همکاران (۳۳) و کاظمی بن‌چناری و همکاران (۳۴) مشخص شده است که استفاده از چربی در جیره گوساله‌های شیرخوار سبب افزایش بهبود بازدهی گردیده است. همچنین دوریو و همکاران (۱۸) بیان کردند که استفاده از چربی به جای نشاسته در جیره گوساله‌ها افزون بر افزایش سطح انرژی سبب کاهش تولید متان توسط میکروب‌های شکمبه‌ای، افزایش عملکرد رشد و بهبود بازده انرژی می‌شود. اما در مطالعات دیگر کاهش مصرف خوراک را با استفاده از چربی در گوساله‌ها مشاهده کرده‌اند (۳۷ و ۵۰). در هر حال به نظر می‌رسد سطح چربی مصرفی، منبع آن و نسبت اسیدهای چرب غالب بر عملکرد گوساله‌های شیرخوار تاثیر داشته است. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در زمینه مصرف منابع چربی در جیره گوساله‌های شیرخوار اثرات متقابل مصرف آن با مواد مغذی دیگر کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

در سال‌های اخیر محققین گزارش کردند که استفاده از علوفه در جیره گوساله‌های شیرخوار سبب بهبود عملکرد شکمبه‌ای و عملکرد رشد (۳۱ و ۴۰)، تحریک نشخوار (۲۲) و کاهش رفتارهای غیرتغذیه‌ای (۴۴) شده است. هرچند استفاده از سطوح زیاد علوفه در جیره گوساله‌های شیرخوار سبب توسعه ضعیف شکمبه (۴۹)، پر شدن دستگاه گوارش، کاهش مصرف خوراک و نهایتاً کاهش رشد گوساله‌های شیرخوار خواهد شد (۲۱).

با توجه به اینکه چربی (به ویژه چربی‌های غیر اشباع) با ایجاد پوشش فیزیکی روی الیاف مانع دسترسی و اتصال میکروارگانیسم‌های هاضم شکمبه‌ای می‌شوند (۸، ۱۱ و ۱۶)، لذا هضم الیاف کاهش یافته و متعاقباً مصرف خوراک نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. البته گاهی خلاف این مطلب نیز بیان شده است (۱۹ و ۳۲). گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد کاهش هضم شکمبه‌ای الیاف که با مصرف چربی‌های غیراشباع اتفاق می‌افتد منجر به کاهش اسید استیک، متان و افزایش اسید پروپیونیک می‌شود که می‌توان با افزایش الیاف یا علوفه این مشکل را کاهش داد (۱۱ و ۱۶). همچنین گاهی فرض بر این بوده است که در خوراک‌های آغازین حاوی علوفه که نسبت انرژی به‌ازای هر واحد از خوراک کاهش می‌یابد، ممکن است مصرف روغن با سطح انرژی بالاتر بتواند افت غلظت انرژی را کاهش دهد (۷). لذا با توجه به این فرضیات متناقض و همچنین با توجه به مطالعات محدود در رابطه با اثر متقابل بین چربی مصرفی و سطح منبع الیاف در گوساله‌های شیرخوار، آزمایشی با بررسی اثرات روغن سویا در جیره‌های استارتر با و بدون علوفه بر عملکرد، فراسنجه‌های رشد، تخمیر شکمبه‌ای و متابولیتهای خونی در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گاوداری صنعتی آوین دشت واقع در شهرستان

جدول ۱- مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (براساس گرم در کیلوگرم)
Table 1- Ingredients of experimental diets and chemical composition (g/kg DM)

اجزاء جیره Components of diet	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimentaldiets ¹			
	NSO-NAH	NSO-AH	SO-NAH	SO-AH
دانه جو آسیاب شده Barley grain ground	150	150	150	150
دانه ذرت آسیاب شده Corn grain ground	465	335	435	305
کنجاله سویا Soybean meal	330	310	330	310
روغن سویا Soy oil	0	0	30	30
مکمل معدنی و ویتامینه ^۲ Min-vit supplement ²	20	20	20	20
کربنات کلسیم Calcium carbonate	15	15	15	15
بی کربنات سدیم Sodium bicarbonate	10	10	10	10
نمک salt	5	5	5	5
اکسید منیزیم Magnesium oxide	5	5	5	5
یونجه خرد شده Alfalfa hay (chopped)	0	150	0	150
ترکیبات شیمیایی Chemical components				
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری بر کیلوگرم) Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.01	2.98	3.06	3.03
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	22.5	22.5	22.5	22.5
چربی خام (درصد) Crude fat (%)	2.88	2.85	5.89	5.84
الیاف غیر قابل حل در شوینده خنثی (درصد) NDF (%)	14.29	22.21	14.62	23.65
کربوهیدرات‌های غیر الیافی (درصد) NFC (%)	43.2	52.1	45.8	54.9
کلسیم (درصد) Calcium (%)	0.9	0.9	0.9	0.9
فسفر (درصد) Phosphorus (%)	0.4	0.4	0.4	0.4

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: NSO-NAH؛ جیره استارتر بدون روغن سویا و بدون یونجه؛ NSO-AH؛ جیره استارتر بدون روغن سویا و با یونجه؛ SO-NAH؛ جیره استارتر با روغن سویا و بدون یونجه؛ SO-AH؛ جیره استارتر با روغن سویا و یونجه.

^۲ هر کیلوگرم مکمل دارای ۱۸۰ گرم کلسیم، ۹۰ گرم فسفر، ۲۱ گرم سدیم، ۱۹ گرم منیزیم، ۳ گرم آهن، ۳ گرم روی، ۲ گرم منگنز، ۳۰۰ میلی گرم مس، ۱۰۰ میلی گرم کبالت، ۱۰۰ میلی گرم ید، ۱۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین E.

¹ Treatments including; (1) no soybean oil supplementation with no forage included in the starter (NSBO- NAH); (2) no soybean oil supplementation with alfalfa hay included in the starter (NSBO- AH); (3) soybean oil supplemented with no forage included in the starter (SBO- NAH); (4) soybean oil supplemented with alfalfa hay included in the starter (SBO-AH).

² Every kilogram of supplement contained: 180 g of Ca, 90 g of p, 21 g of Na, 19 g of Mg, 3 g of Fe, 3 g of Zn, 2 g of Mn, 300 mg of Cu, 100 mg of Co, 100 mg of I, 1 mg of Se, 500,000 IU of vitamin A, 100,000 IU of vitamin D and 100mg of vitamin E.

سویا و علوفه یونجه قرار گرفت به طوری که گوساله‌هایی که روغن سویا به همراه علوفه یونجه دریافت کرده بودند کمترین میزان مصرف خوراک را در مقایسه با سایر گروه‌ها داشتند ($P < 0.05$). بررسی افزایش وزن روزانه نیز نشان داد که تیمار SO-AH سبب تمایل به کاهش در افزایش وزن روزانه نسبت به تیمارهای دیگر داشته است که سبب شده است وزن از شیرگیری به صورت معنی‌داری در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر کاهش یابد.

در مطالعه هیل و همکاران (۲۶) با افزودن روغن کتان و کانولا در جایگزین شیر گوساله‌ها میزان مصرف خوراک مصرفی افزایش یافت. بانینگ و همکاران (۱۳) گزارش نمودند که استفاده از ۵ درصد چربی در جیره استارتر گوساله‌ها تاثیری بر میزان مصرف خوراک آغازین و افزایش وزن روزانه ایجاد نکرد. کفری و همکاران (۱۴) گزارش کردند اضافه کردن ۳/۵ درصد چربی در جیره آغازین گوساله‌ها سبب کاهش مصرف خوراک شد. همچنین در گزارش دیگری استفاده از سطح ۱۰ درصد چربی در جیره گوساله‌ها میزان مصرف خوراک نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. هیل و همکاران (۲۶) نشان دادند که افزودن روغن سویا به جیره گوساله‌های قبل از شیرگیری و بعد از شیرگیری سبب کاهش مصرف خوراک گردید. در مطالعه حاضر کمترین مصرف خوراک آغازین مربوط به گوساله‌هایی بوده است که ترکیب روغن سویا و علوفه یونجه در جیره استارتر مصرف کرده‌اند، می‌توان بیان داشت رابطه متقابل بین این دو توانسته تاثیر منفی بر اشتتهای گوساله‌های شیرخوار داشته باشد. اسیدهای چرب غیر اشباع ممکن است از طریق کاهش اندازه میل غذایی و یا افزایش فاصله بین وعده غذایی، میزان خوراک مصرفی را کاهش دهد (۲۴).

در این آزمایش با افزودن روغن سویا میزان مصرف خوراک نسبت به تیمار بدون مکمل روغن سویا از لحاظ عددی افزایش یافت. به نظر می‌رسد که عدم وجود سطح بالای الیاف در این تیمار سبب بهبود مصرف خوراک در تیمار حاوی روغن گردیده است. بر خلاف مطالب ذکر شده مشخص شده است که استفاده از مکمل‌های چربی سبب افزایش انرژی به‌ازای هر واحد خوراک مصرفی می‌شود و در قبل از شیرگیری این افزایش انرژی سبب بهبود افزایش وزن گوساله‌ها در قبل از شیرگیری می‌شود که این پاسخ‌ها مربوط به نوع چربی مصرفی نیز می‌باشد (۳). در هر حال گزارش شده است که استفاده از روغن ماهی به دلیل کاهش خوراک مصرفی، افزایش وزن روزانه کاهش یافته است. آلن (۴) بیان کرده است که افزودن مکمل چربی در جیره دام سبب آزاد سازی بیشتر هورمون کوله سیستوکینین می‌شود که این هورمون یک اثر کاهنده اشتها روی کبد داشته و مصرف خوراک را کاهش می‌دهد. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، جهانی مقدم و همکاران (۳۱) گزارش کردند که استفاده ۱۰ درصد علوفه یونجه به صورت خرد شده و پلت در کنسانتره گوساله‌ها مصرف خوراک آغازین و عملکرد تحت تاثیر قرار نگرفت. رشد پرزهای شکمبه تحت تاثیر

برای تعیین فراسنجه‌های تخمیر شکمبه ای در روز ۴۰ آزمایش نمونه مایع شکمبه از گوساله‌ها با استفاده از پمپ خلا و از طریق لوله مری در حدود ۴ ساعت پس از ریختن وعده خوراک صبح گرفته شد. سطح pH مایع شکمبه با استفاده از pH متر مدل Hanna Instruments, Villafranca, ساخت کشور ایتالیا اندازه‌گیری شد.

سپس با استفاده از پارچه صافی دو لایه ضخیم مایع شکمبه صاف گردید و ۵ سی سی مایع شکمبه به همراه ۱ سی سی اسید متافسفربیک در لوله فالکون ریخته شد و فریز گردید. بعد از یخ‌گشایی نمونه‌ها که حدود سه ماه بعد از نمونه‌گیری بود، غلظت کل اسیدهای چرب فرار و به تفکیک آن‌ها شامل استات، بوتیرات، پروپیونات و همچنین مجموع اسیدهای چرب فرار شاخه‌دار (BCVFA) که شامل والرات و ایزوالرات بود توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل model CP-9002, Chrompack, Delft, ساخت کشور هلند انجام گرفت.

برای تعیین فراسنجه‌های خونی (گلوکز، پروتئین کل، آلومین، بتاهدروکسی‌بوتیرات، تری‌گلیسرید، نیتروژن اوره‌ای خون، کلاسترول آلائین آمینوترانسفراز و آسپاراتات آمینوترانسفراز) در روز ۴۲ آزمایشی، ۴ ساعت بعد از خوراک‌دهی وعده صبح از سیاهرگ و داج خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خون پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده (با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه) و پس از جداسازی سرم، نمونه‌های سرم تا زمان اندازه‌گیری، در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی با استفاده از دستگاه‌های تجاری شرکت پارس آزمون و با روش طیف‌سنجی نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند.

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS (2003) و رویه Mixed انجام شد. قابل ذکر است که برخی از داده‌ها که در واحد زمان اندازه‌گیری نشده بودند (مانند نمونه خون و مایع شکمبه) با رویه GLM مورد آنالیز آماری انجام گرفتند. معادله مدل آماری مورد استفاده:

$$Y_{ijk} = \mu + SO_i + F_j + W_k + (SO \times W)_{ik} + (F \times W)_{jk} + (SO \times F)_{ij} + (SO \times F \times W)_{ijk} + \beta(X_i - \bar{X}) + e_{ijk}$$

که در آن Y_{ijk} : مقدار هر مشاهده، SO_i : اثر سطح روغن (با سطح صفر و ۳ درصد)، F_j : اثر سطح یونجه مصرفی (با سطح صفر و ۱۵ درصد) و W_k : اثر زمان نمونه‌گیری بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش LSMEANS صورت گرفت و سطح احتمال ۵ درصد به عنوان سطح معنی‌داری منظور گردید.

نتایج و بحث

مصرف استارتر، افزایش وزن روزانه، و بازدهی

نتایج مربوط به استفاده از روغن سویا در جیره‌های آغازین با و بدون علوفه بر عملکرد رشد گوساله‌های شیرخوار در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان مصرف خوراک آغازین تحت تاثیر اثر متقابل روغن

اسیدهای چرب فرار از جمله بوتیرات و پروپیونات بوده و افزودن علوفه به دلیل تولید استات سبب کاهش توسعه پرزهای شکمبه خواهد شد. تغذیه خوراک های کنسانتره ای در داخل شکمبه تخمیر شده و رشد بافت مخاطی، خصوصاً پرزهای که سطح داخلی اپیتلیوم شکمبه - نگاری را می پوشانند تحریک می نماید. (۵،۳۹)

با توجه به اینکه کمترین خوراک مصرفی مربوط به گوساله های بوده است که ترکیب روغن سویا و علوفه یونجه در خوراک آغازین مصرف کرده اند، می توان بیان داشت رابطه متقابل بین این دو توانسته تاثیر منفی بر اشتها ی گوساله های شیرخوار داشته باشد.

در این رابطه هریستوف و همکاران (۳۰) بیان کردند با کاهش درجه اشباع بودن و افزایش تعداد باند های دوگانه در اسیدهای چرب از میزان قابلیت هضم الیاف و انرژی دریافتی برای میکروارگانیسم های شکمبه کاسته شده و کاهش مصرف خوراک را به دنبال خواهد داشت در این مطالعه نیز مشاهده می شود گوساله های که روغن سویا به همراه علوفه یونجه دریافت کرده بودند کمترین میزان مصرف خوراک را نسبت به سایر گروه داشتند. با کاهش مصرف خوراک در این تیمار افزایش وزن روزانه نیز تمایل به کاهش نشان داد و وزن گوساله های

که روغن سویا به همراه یونجه مصرف کرده بودند در زمان از شیرگیری کمترین مقدار بود که حدود ۱۰ درصد کاهش در وزن از شیرگیری در این تیمار نسبت به تیمارهای دیگر رخ داد. به نظر می رسد اثر پوشاندگی الیاف توسط روغن می تواند تاثیر منفی بر قابلیت هضم مواد مغذی داشته باشد و سبب می گردد که تخمیر به خوبی انجام نگردد (۳۵). قربانی و همکاران (۲۵) نشان دادند که استفاده از روغن سویا در جیره گوساله ها در ۳ هفته اول سبب افزایش اسکور مدفوع گردید که در نهایت سبب کاهش قابلیت هضم مواد مغذی و به دنبال آن کاهش رشد در گوساله های شیرخوار شد. با اینکه پاسخ های متفاوتی مانند پاسخ منفی (۲۵) و یا پاسخ های مثبت (۲۹) و (۳۴) در زمان استفاده از منابع مختلف چربی در گوساله های شیرخوار مشاهده شده است، اما مطالعه حاضر به وضوح نشان داد در صورتی که روغن سویا مصرف شده به همراه علوفه یونجه استفاده شده باشد وزن از شیرگیری را کاهش خواهد داد. گزارش شده است که تغذیه بیش از حد منابع اسیدهای چرب غیر اشباع (روغن سویا) اثرات سمی روی میکروب های شکمبه دارند که می تواند سبب کاهش هضم خوراک شوند که در نهایت وزن شیرگیری کاهش می یابد (۳۵).

جدول ۲ - اثر تیمارهای آزمایشی روی استارتر مصرفی، میانگین افزایش وزن روزانه و بازده خوراک گوساله های شیرخوار هلشتاین

Table 2-Least square means for starter intake, ADG and feed efficiency in dairy calves fed soy oil with different dietary starter forage level (0 vs. 15%, DM basis) (n = 10 calves per treatment).

متغیرها parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets ¹				SEM	P-value		
	NSO		SO			SO	AH	SO*AH
	NAH	AH	NAH	AH				
استارتر مصرفی، گرم در روز Starter intake, g/d	532 ^{ab}	636 ^a	612 ^a	494 ^c	56.96	0.58	0.90	0.05
شیر مصرفی، گرم/ ماده خشک/روز Milk intake, g/DM/d	651	649	650	651	22.42	0.95	0.98	0.99
ماده خشک مصرفی (شیر+استارتر)، گرم در روز Total DMI, (milk + starter), g/d	1183	1287	1263	1146	60.27	0.60	0.91	0.06
میانگین افزایش وزن روزانه، گرم در روز Average daily gain, g/d	640	607	675	554	34.19	0.80	0.02	0.08
وزن بدن، کیلوگرم Body weight, kg								
آغازین Initial	40.0	40.5	39.8	39.2	0.80	0.36	0.90	0.50
از شیرگیری weaning	78.4 ^a	76.9 ^{ab}	80.4 ^a	72.7 ^b	1.88	0.48	0.01	0.05
بازده خوراک ^۲ Feed efficiency ²	0.57	0.51	0.58	0.50	0.03	0.90	0.03	0.71

^{a,b}میانگین های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0.05).

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: NSO-NAH: جیره استارتر بدون روغن سویا و بدون یونجه؛ NSO-AH: جیره استارتر بدون روغن سویا و با یونجه؛ SO-NAH: جیره استارتر با روغن سویا و بدون یونجه؛ SO-AH: جیره استارتر با روغن سویا و یونجه.

^۲ کیلوگرم افزایش وزن بدن بر کیلوگرم کل ماده خشک مصرفی.

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

¹Treatments including; (1) no soybean oil supplementation with no forage included in the starter (NSBO- NAH); (2) no soybean oil supplementation with alfalfa hay included in the starter (NSBO- AH); (3) soybean oil supplemented with no forage included in the starter (SBO- NAH); (4) soybean oil supplemented with alfalfa hay included in the starter (SBO-AH).

²Kilogram of body weight gain /kg of total dry matter intake.

فراسنجه‌های رشد

نتایج مربوط به استفاده از روغن سویا در جیره‌های آغازین با و یا بدون علوفه بر فرا سنجه‌های رشد گوساله‌های شیرخوار در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد اثر متقابل بین روغن سویا و علوفه یونجه نتوانست صفات مربوط دور سینه، طول بدن، دور شکم و عرض هیپ را تحت تاثیر قرار دهد ($P>0.05$). اما در مقابل ارتفاع جدوگاه در زمانی که روغن سویا و یونجه به صورت همزمان مصرف گردیده بود در زمان از شیرگیری کاهش نشان داد ($P<0.02$). همچنین نتایج مربوط به ارتفاع هیپ نیز نشان داد که مصرف روغن سویا و علوفه یونجه هر دو سبب کاهش ارتفاع هیپ در زمان از شیرگیری گردیدند ($P<0.01$). با توجه به اینکه وزن از شیرگیری در گوساله‌های تغذیه شده با ترکیبی از روغن سویا و علوفه یونجه کاهش پیدا کرده بود، به نظر می‌رسد با توجه به همبستگی مثبت بین وزن و رشد کاهش ارتفاع جدوگاه نیز در راستای این کاهش وزن می‌باشد. تاثیر منفی علوفه یونجه و روغن به تنهایی بر ارتفاع هیپ در مطالعه حاضر نیز مشخص گردیده است. خان و همکاران (۳۶) گزارش کردند که استفاده از ۱۵ درصد علوفه در جیره گوساله‌های شیرخوار تاثیر بر رشد اسکلتی گوساله‌ها ایجاد نکرد. همچنین اسعدی و همکاران (۱) نشان دادند که استفاده از علوفه یونجه در جیره گوساله‌ها تاثیر معنی‌داری را بر عملکرد رشد استخوانی نداشت. میرزایی و همکاران (۴۰) با بررسی اثرات یونجه پودر شده در جیره گوساله‌های شیرخوار بیان کردند که دور سینه، عمق بدن، طول بدن، ارتفاع ران، عرض ران و ارتفاع جدوگاه در زمان از شیرگیری و پایان دوره تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت.

احمدیان و همکاران (۲) با بررسی اثرات مکمل چربی در گوساله‌های شیرخوار بیان کردند که افزودن چربی به جیره سبب افزایش طول بدن و عرض سینه شد. همچنین هیل و همکاران (۲۶) بیان کردند که عرض کپل گوساله‌های تغذیه شده با جایگزین شیر مکمل شده با چربی نسبت به گوساله‌های تغذیه شده با جایگزین شیر بدون مکمل چربی تمایل به افزایش داشت. اما قاسمی و همکاران (۲۴) با بررسی اثرات مکمل‌های چربی متفاوت در گوساله‌های شیرخوار گزارش کردند که طول بدن، عرض و ارتفاع کپل و ارتفاع جدوگاه تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفته است. استفاده از منبع اسید چرب امگا-۳ در گوساله‌های شیرخوار سبب افزایش برخی از فرا سنجه‌های رشد گردید (۳۴). فصیحی و همکاران (۲۲) گزارش کردند گوساله‌های مصرف کننده دانه سویای اکستروود شده (غنی از امگا-۶) در مقایسه با گوساله‌های مصرف کننده دانه کتان اکستروود شده (غنی از امگا-۳) افزایش دور شکم بیش‌تری داشتند. به نظر می‌رسد تاثیر منفی یا مثبت منابع چربی و یا علوفه بر فراسنجه‌های

رشد بیش‌تر از طریق تغییر در سطح خوراک مصرفی می‌باشد و معمولاً در آزمایش‌هایی که سطح خوراک مصرفی کاهش یافته باشد فراسنجه‌های رشد نیز کاهش یافته است.

تخمیر شکمبه‌ای

نتایج مربوط به تخمیر شکمبه‌ای در جدول ۴ ارائه گردیده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که pH مایع شکمبه تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. از طرف دیگر کل اسیدهای چرب فرار در تیماری که روغن سویا به همراه یونجه مصرف گردیده بود کاهش نشان داد ($P=0.05$) و از طرف دیگر تیماری که در آن روغن و علوفه استفاده نشده بود بیش‌ترین مقدار اسید چرب فرار را داشت. با توجه به اینکه سطح مصرف خوراک در جیره استارتر حاوی روغن سویا و علوفه یونجه کم‌ترین بود سوبسترای لازم برای تخمیر میکروبی کاهش یافته و در نتیجه محصول اصلی تخمیر که اسیدهای چرب فرار هستند کاهش نشان داد. پیش‌تر نیز مشخص شده است که ماده آلی هضم شده در شکمبه عامل اصلی موثر بر سطح اسیدهای چرب فرار می‌باشد (۱۷). تاثیر منفی چربی بر تخمیر شکمبه‌ای پیش‌تر به خوبی مشخص شده است (۳۸ و ۱۰). اما نتایج حاضر نشان می‌دهد تاثیر منفی چربی بر تخمیر در حضور منبع علوفه‌ای و سطح الیاف بالا بیشتر خواهد بود. این مطلب ممکن است به این دلیل باشد که با ایجاد اثر پوشاندگی چربی بر الیاف دسترسی میکروب‌ها به مواد مغذی منبع الیافی کاهش یافته و در نهایت ماده آلی قابل هضم در شکمبه کاهش خواهد یافت (۱۷ و ۳۷). کاهش سطح اسیدهای چرب فرار که تا حدود ۷۰ درصد انرژی کل دام را تامین کند (۱۲) می‌تواند سبب کاهش رشد دام گردد. از طرفی به نظر می‌رسد جدای از غلظت کل اسیدهای چرب فرار، نسبت اسیدهای چرب فرار نیز تحت تاثیر مصرف علوفه و روغن نیز قرار گرفته است. به گونه‌ای که سطح استات تولید شده در شکمبه با مصرف الیاف افزایش نشان داد و بر خلاف آن سطح پروپیونات و بوتیرات کاهش پیدا کرد. به‌طور کلی محصول اصلی حاصل از تخمیر الیاف استات است و در مطالعه پیشین نیز سطح بوتیرات در جیره‌هایی که علوفه در نشخوارکنندگان در حال رشد استفاده شده است کاهش یافته است (۴۶). از طرف دیگر با توجه به مشخص شدن انرژی‌زایی بیش‌تر بوتیرات و پروپیونات نسبت به استات (۵)، افزایش مصرف علوفه بازدهی مصرف خوراک را نیز کاهش دهد (۳۹) که در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید (جدول ۲). سطح پروپیونات مایع شکمبه نیز با مصرف روغن کاهش یافته است. با توجه به اینکه با استفاده از روغن در جیره به اجبار بخشی از منابع غله کاهش می‌یابد و از طرف دیگر نیز پروپیونات در جیره استارتر غالباً محصول تخمیر نشاسته موجود در غلات می‌باشد (۴۲).

جدول ۳ - اثر تیمارهای آزمایشی روی عملکرد رشدی گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

Table 3-Least square means for growth parameters in dairy calves fed soy oil with different dietary starter forage level (0 vs. 15%, DM basis) (n = 10 calves per treatment).

متغیرها parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimentaldiets ¹				SEM	P-value		
	NSO		SO			SO	AH	SO*AH
	NAH	AH	NAH	AH				
دور سینه، سانتی‌متر Heart girth, cm								
آغازین Initial	80.7	81.9	80.4	80.6	0.85	0.41	0.47	0.60
از شیرگیری weaning	102.6	103.5	102.2	100.4	1.12	0.12	0.69	0.23
طول بدن، سانتی‌متر Body length, cm								
آغازین Initial	48.9	48.5	49.6	48.5	0.68	0.60	0.27	0.60
از شیرگیری weaning	62.5	62.6	62.8	61.4	1.32	0.76	0.60	0.61
عمق بدن، سانتی‌متر Body barrel, cm								
آغازین Initial	80.2	81.5	80.4	79.0	0.89	0.20	0.95	0.14
از شیرگیری weaning	115.5	116.3	115.9	114.8	1.76	0.88	0.93	0.71
ارتفاع جدوگاه، سانتی‌متر Wither height, cm								
آغازین Initial	81.2	81.7	80.9	82.6	0.81	0.71	0.46	0.18
از شیرگیری weaning	98.0 ^a	96.6 ^{ab}	98.6 ^a	93.5 ^b	0.86	0.12	<0.01	0.02
ارتفاع هیپ، سانتی‌متر Hip height, cm								
آغازین Initial	79.3	80.8	80.9	80.1	0.80	0.57	0.66	0.19
از شیرگیری weaning	97.0	96.0	95.6	92.4	0.68	<0.01	<0.01	0.12
عرض هیپ، سانتی‌متر Hip width, cm								
آغازین Initial	15.3	15.2	15.2	14.6	0.24	0.16	0.16	0.31
از شیرگیری weaning	20.6	20.8	20.8	19.9	0.60	0.56	0.57	0.36

^{a,b}میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0.05).

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل؛ NSO-NAH: جیره استارتر بدون روغن سویا و بدون یونجه؛ NSO-AH: جیره استارتر بدون روغن سویا و با یونجه؛ SO-NAH: جیره استارتر با روغن سویا و بدون یونجه؛ SO-AH: جیره استارتر با روغن سویا و یونجه.

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

¹Treatments including: (1) no soybean oil supplementation with no forage included in the starter (NSBO- NAH); (2) no soybean oil supplementation with alfalfa hay included in the starter (NSBO- AH); (3) soybean oil supplemented with no forage included in the starter (SBO- NAH); (4) soybean oil supplemented with alfalfa hay included in the starter (SBO-AH).

بنابراین به نظر می‌رسد مصرف روغن و کاهش وجود نشاسته در جیره های حاوی روغن سبب کاهش پروپونات گردیده است. نتایج

نظر بیوانرژتیک تخمیر شکمبه‌ای مصرف هیچ کدام از منابع روغن و یونجه مناسب تخمیر شکمبه‌ای در مطالعه حاضر نبوده است و مصرف همزمان آن‌ها نیز بیش‌ترین تاثیر منفی را بر تخمیر شکمبه‌ای به همراه داشته است.

پژوهش حاضر نشان می‌دهد مصرف روغن سویا و یونجه علاوه بر اثر متقابل شان که باعث کاهش تولید سطح کل اسیدهای چرب فرار در مایع شکمبه می‌شوند اما از طرف دیگر تاثیر انفرادی بر نسبت اسیدهای چرب فرار نیز داشته‌اند و تخمیر را تحت تاثیر قرار داده‌اند. به‌طور خلاصه می‌توان در مورد تخمیر شکمبه‌ای بیان کرد که از نقطه

جدول ۴ - اثر تیمارهای آزمایشی روی متابولیسم شکمبه‌ای گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

Table 4-Least square means for ruminal metabolism in dairy calves fed soy oil with different dietary starter forage level (0 vs. 15%, DM basis) (n = 10 calves per treatment).

متغیرها parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimentaldiets ¹				SEM	P-value		
	NSO		SO			SO	AH	SO*AH
	NAH	AH	NAH	AH				
pH شکمبه Ruminal pH	5.50	5.74	5.51	5.55	0.08	0.28	0.11	0.29
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، میلی‌مول در ۱۰۰ Short chain fatty acids, mmol/100	93.1 ^a	89.9 ^{ab}	90.4 ^{ab}	78.2 ^b	2.63	0.01	<0.01	0.05
استات Acetate (A)	45.1	51.4	48.8	54.3	1.36	0.06	<0.01	0.79
پروپیونات Propionate (P)	35.6	31.6	30.7	29.3	1.07	<0.01	0.02	0.26
نسبت استات به پروپیونات Acetate: Propionate	1.27	1.65	1.60	1.87	0.09	0.01	<0.01	0.60
بوتیرات Butyrate	13.6	11.4	15.9	11.1	1.01	0.36	<0.01	0.22
اسیدهای چرب فرار زنجیر منشعب BCVFA ²	5.64	5.50	4.54	5.16	0.55	0.21	0.67	0.50

^{a,b} میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: NSO-NAH: جیره استارتر بدون روغن سویا و بدون یونجه؛ NSO-AH: جیره استارتر بدون روغن سویا و با یونجه؛ SO-NAH: جیره استارتر با روغن سویا و بدون یونجه؛ SO-AH: جیره استارتر با روغن سویا و یونجه.

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

¹ Treatments including: (1) no soybean oil supplementation with no forage included in the starter (NSBO- NAH); (2) no soybean oil supplementation with alfalfa hay included in the starter (NSBO- AH); (3) soybean oil supplemented with no forage included in the starter (SBO- NAH); (4) soybean oil supplemented with alfalfa hay included in the starter (SBO-AH).

² Branched Chain Volatile Fatty Acids.

فراسنجه‌های خونی

نتایج مربوط به استفاده از روغن سویا در جیره‌های آغازین گوساله‌های شیرخوار حاوی علوفه یونجه و یا بدون آن بر فراسنجه‌های خونی گوساله‌های شیرخوار در جدول ۵ نمایش داده شده است. عامل متقابل یونجه و روغن سویا غلظت گلوکز سرم را تحت تاثیر قرار دادند به طوری که گوساله‌های دریافت‌کننده روغن سویا و علوفه یونجه کم‌ترین میزان را نسبت به سایر تیمارها در قبل از شیرگیری داشتند (P<۰/۰۲).

پاسخ‌های متفاوتی در زمینه مصرف چربی و علوفه بر سطح گلوکز خون در گوساله‌های شیرخوار گزارش شده است. تری و همکاران

(۴۷) گزارش کردند که استفاده از علوفه یونجه در جیره گوساله ساله تاثیر معنی‌داری را در غلظت خونی گلوکز ایجاد نکرد. هیل و همکاران (۲۸) نشان دادند اثر اسیدهای چرب بر رشد گوساله‌ها در دوره‌ی بعد از شیرگیری باعث کاهش گلوکز شد که در حقیقت دلیل این مطلب کاهش مصرف خوراک آغازین بوده است. معمولاً در آزمایش‌هایی که چربی مکمل شده سبب کاهش مقدار خوراک مصرفی گردیده باشد در نهایت غلظت گلوکز خون که نشان‌دهنده سطح انرژی بدن می‌باشد نیز کاهش یافته است؛ اما از طرف دیگر قاسمی و همکاران (۲۴) نشان دادند که افزایش سطح چربی می‌تواند غلظت قند خون را افزایش دهد. کاهش سطح گلوکز خون در جیره‌ای که روغن سویا و علوفه یونجه با هم استفاده شده است مرتبط با کاهش مصرف خوراک آغازین می‌باشد.

نتایج نشان داد فراسنجه‌های خونی از قبیل تری گلیسرید، آلبومین و آنزیم‌های کبدی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند که نشان دهنده عدم تاثیر گذاری جیره‌های آزمایشی بر سلامت کبد بود. نتایج مربوط به غلظت اوره خون نشان داد که استفاده از یونجه سبب افزایش غلظت خونی آن شده است ($P < 0.03$). برخلاف این مطلب، دان‌شور و همکاران (۱۸) گزارش کردند که استفاده از علوفه یونجه در گوساله‌های شیرخوار تاثیر معنی‌داری را در غلظت خونی نیتروژن اوره‌ای ایجاد نکرد. با توجه به اینکه تامین مواد آلی قابل هضم برای کنسانتره بیش‌تر از منابع علوفه‌ای می‌باشد (۴۴). به نظر می‌رسد استفاده از این سطح علوفه نتوانسته از طریق بهبود تامین مواد آلی برای هضم در شکمبه سبب کاهش سطح نیتروژن اوره‌ای شکمبه‌ای و به دنبال آن خون گردد و با توجه به یافته‌های پیشین افزایش سطح نیتروژن اوره‌ای خون در نشخوارکنندگان همراه با کاهش بازدهی نیز خواهد بود (۳۸).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر مصرف روغن سویا و علوفه یونجه به تنهایی تاثیر منفی بر تخمیر شکمبه‌ای و ارتفاع هیپ داشتند. از طرف دیگر مصرف همزمان روغن سویا (به میزان ۳ در صد) و علوفه یونجه (به میزان ۱۵ درصد) سبب کاهش مصرف استارت‌ر، کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمبه، غلظت کمتر گلوکز خون، وزن از شیرگیری کمتر، و کاهش ارتفاع جدوگاه گردید. با توجه به شرایط آزمایش حاضر به نظر می‌رسد در صورت تمایل به استفاده از روغن سویا و یا علوفه یونجه در دوره شیرخوارگی گوساله‌ها، استفاده هم‌زمان این دو قابل توصیه نمی‌باشد. براساس شرایط آزمایش حاضر، فرضیه افزایش غلظت انرژی جیره توسط مصرف روغن به منظور جبران سطح انرژی کمتر خوراک‌های آغازین حاوی علوفه یونجه، صحیح نمی‌باشد و تاثیر منفی بر عملکرد رشد و تخمیر شکمبه‌ای در گوساله‌های شیرخوار خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است که مراتب قدردانی اعلام می‌شود. همچنین از آقای دکتر امید میرزایی، خانم مهندس افشار، آقای مهندس مولایی، و آقای مهندس عربی به دلیل کمک‌های انجام شده در طول آزمایش قدردانی می‌گردد. از مسئولین محترم گاوداری صنعتی آوین دشت و پرسنل زحمتکش این فارم نهایت قدردانی به جهت حمایت‌های همه جانبه در طول انجام این پژوهش ارجح می‌گردد.

گلوکز به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم انرژی در بدن می‌باشد که در زمان افت خوراک مصرفی به صورت منفی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. از طرف دیگر کاهش پروپیونات تولیدشده در شکمبه توسط روغن و یونجه می‌تواند بر کاهش گلوکز خون موثر باشد زیرا مهم‌ترین پیش‌ساز گلوکز در نشخوارکنندگان پروپیونات می‌باشد (۱۲).

شاخص دیگر سطح انرژی در بدن و سطح توسعه شکمبه در نشخوارکنندگان جوان غلظت خونی بتا‌هیدروکسی بوتیرات می‌باشد که با مصرف یونجه کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.02$). اما تحت تاثیر اثر متقابل بین علوفه و مصرف روغن قرار نگرفت. خان و همکاران (۳۶) مشخص کردند که میزان غلظت خونی بتا‌هیدروکسی بوتیرات شاخصی از توسعه متابولیسمی دیواره شکمبه می‌باشد که تابعیت زیادی از جیره دوره شیرخوارگی خواهد داشت و پیامدهای آن به دوره‌های بعد نیز منتقل خواهد شد. به نظر می‌رسد افت سطح بتا‌هیدروکسی بوتیرات در خون گوساله‌هایی که با علوفه تغذیه شده‌اند مرتبط با سطح پایین‌تر بوتیرات در مایع شکمبه بوده و نشان‌دهنده بازدهی کمتر در این تیمار می‌باشد. استفاده از علوفه در دوره شیرخوارگی گوساله‌ها اثرات منفی (۳۸ و ۴۲) و یا اثرات مثبت (۱۱) به همراه داشته است. به نظر می‌رسد سطح علوفه مصرفی، اندازه قطعات علوفه، زمان شروع مصرف در دوره شیرخوارگی و حتی اثر متقابل با مواد مغذی دیگر نیز در پاسخ نشخوارکنندگان جوان به علوفه تاثیر گذار باشد (۴۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عامل روغن سویا سبب افزایش غلظت کلسترول سرم خون گردید ($P < 0.05$). منابع متفاوت اسیدهای چرب متابولیسم‌های متفاوتی در کبد دام خواهند داشت و متابولیت‌های مختلفی نیز تولید می‌کنند. یافته‌های پیشین نیز نشان داده بود که مصرف روغن سویا سبب افزایش سطح کلسترول خون شده بود که نشان دهنده این است که منبع امگا-۶ تامین شده از روغن سویا پتانسیل افزایش کلسترول را نیز دارد. براساس منابع منتشر شده مشخص شده است که کبد نشخوارکنندگان جوان قابلیت تبدیل منابع امگا-۶ به کلسترول و همچنین غالباً HDL نیز خواهند داشت که از طریق تامین پیش‌سازهای تولید کلسترول این فعالیت صورت خواهد گرفت (۲۴). همچنین غلظت سرمی پروتئین کل توسط روغن سویا کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). کاهش سطح پروتئین سرم در جیره حاوی روغن سویا به دلیل نقل و انتقال چربی خون می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده از پروتئین به صورت آلفا و بتا لیپوپروتئین برای انتقال چربی باشد و به همین دلیل سطح کل پروتئین خون کاهش یافته که در مطالعه پیشین در گوساله‌های شیرخوار نیز رخ داده است (۳۴). اما برخلاف این مطلب، بالو و دپتر (۹) بیان کردند مکمل‌های مختلف چربی تأثیری روی پروتئین خون ندارند که ممکن است مربوط به ترکیب اسیدهای چرب و یا سطح چربی مصرف شده در آزمایش باشد.

جدول ۵ - اثر تیمارهای آزمایشی روی متابولیت‌های خونی و آنزیم‌های کبدی گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

Table 5-Least square means for blood metabolites and liver enzymes in dairy calves fed soy oil with different dietary starter forage level (0 vs. 15%, DM basis) (n = 10 calves per treatment).

متغیرها parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimentaldiets ^۱				SEM	P-value		
	NSO		SO			SO	AH	SO*AH
	NAH	AH	NAH	AH				
گلوکز، میلی‌گرم در دسی لیتر Glucose, mg/dl	101.0 ^a	103.4 ^a	110.7 ^a	96.8 ^b	3.46	0.65	0.11	0.02
بتا‌هیدروکسی بوتیریک اسید، میلی‌مول در لیتر BHB, mmol/l	0.15	0.10	0.13	0.08	0.02	0.29	0.02	0.97
کلسترول، میلی‌گرم در دسی لیتر Cholesterol, mg/dl	94.4	108.5	118.75	112.2	7.36	0.06	0.60	0.17
تری‌گلیسرید، میلی‌گرم در دسی لیتر Triglyceride, mg/dl	30.0	32.1	22.7	28.8	4.69	0.27	0.38	0.67
کل پروتئین، میلی‌گرم در لیتر Total protein, mg/l	6.50	6.34	6.22	6.31	0.07	0.05	0.63	0.11
آلبومین، میلی‌گرم در لیتر Albumin, mg/l	3.91	3.84	3.68	3.84	0.23	0.62	0.85	0.63
نیتروژن اوره خون BUN, mg/dl	20.8	24.5	21.0	25.2	1.81	0.81	0.03	0.87
آسپاراتات آمینوترانسفراز، واحد بین المللی در لیتر AST, IU/l	41.5	36.0	44.7	53.4	6.13	0.10	0.80	0.25
آلانین آمینوترانسفراز، واحد بین المللی در لیتر ALT, IU/l	5.42	5.14	7.14	5.15	0.99	0.39	0.26	0.38

^{a,b}میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0.05).^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: NSO-NAH: جیره استارتر بدون روغن سویا و بدون یونجه؛ NSO-AH: جیره استارتر بدون روغن سویا و با یونجه؛ SO-NAH: جیره استارتر با روغن سویا و بدون یونجه؛ SO-AH: جیره استارتر با روغن سویا و یونجه.^{a,b}Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).¹Treatments including; (1) no soybean oil supplementation with no forage included in the starter (NSBO- NAH); (2) no soybean oil supplementation with alfalfa hay included in the starter (NSBO- AH); (3) soybean oil supplemented with no forage included in the starter (SBO- NAH); (4) soybean oil supplemented with alfalfa hay included in the starter (SBO-AH).

منابع

- Asadi, M. R., A. D. Forouzandeh, and P. Shakeri. 2017. Effect of alfalfa and sodium bicarbonate on starter diet of Holstein dairy calves. *Animal Science Journal*, 30(114): 247-256. (in Persian).
- Ahmadian, A., F. Fattahnia, G. Taasoli, M. Akbari-Gharai, and M. Kazemi-Bonchenari. 2018. Effect of fat supplementation (Ca-salts) in starter diets differed in rumen undegradable protein levels on performance, growth and blood metabolites of Holstein calves. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 49 (1):133-143. (In Persian).
- Azad Shahraki, M., M. Khorvash, and E. Ghasemi. 2016. Effects of Varied Fat Supplements in Starter Diet on Rumen Parameters, Intake and Performance of Holstein dairy Calves. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Isfahan University of Technology. (In Persian).
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1598-1624.
- Annisson, E. F., and D. G. Armstrong. 1970. Volatile fatty acid metabolism and energy supply. In: *Physiology and digestion and metabolism in ruminants*. Edited by A.T. Phillipson. Newcastle upon Tyne. UK: Oriel, p 422- 437.
- AOAC International. 2000. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 17th ed. Published by AOAC. Int., Gaithersburg, MD.
- Arjmandi, M. M., and A. TeimouriYansari. 2012. Effects of alfalfa particle size and soybean oil on Intake, digestibility, chewing activity and performance of early lactating Holstein cows. *Iranian Journal of Animal Science*

- Research, 3: 138-149. (In Persian).
8. Baldwin, R. L., V. K. R. McLeod, and J. L. Klotz. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*, 87:55-65.
9. Ballou, M., and E. DePeters. 2008. Supplementing milk replacer with omega-3 fatty acids from fish oil on immunocompetence and health of Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 91:3488-3500.
10. Bateman, H.G., and T.C. Jenkins. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, 81: 2451-2458.
11. Beiranvand, H., G. R. Ghorbani, M. Khorvash, and M. Kazemi-Bonchenari. 2014. Forage and sugar in dairy calves' starter diet and their interaction on performance, weaning age and rumen fermentation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98:439-445.
12. Bergman, E. N. 1990: Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70:567-590.
13. Bunting, L., J. Fernandez, R. Fornea, T. White, M. Froetschel, J. Stone, and K. Ingawa. 1996. Seasonal effects of supplemental fat or undegradable protein on the growth and metabolism of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 79:1611-1620.
14. Caffrey, P., C. Miller, P. Brophy, and D. Kelleher. 1988. The effects of method of processing of starters, tallow inclusion and roughage supplementation on the performance of early-weaned calves. *Animal Feed Science and Technology*, 19:231-246.
15. Chalupa, W. 1991. The role of dietary fat in the productivity and health of dairy cows. In : *Large Animal Clinical Nutrition*. (Eds) Naylor J. M. and S.L. Ralston. Mosby year book. pp: 304-315.
16. Clark, J. H., T. H. Klusmeyer, and M. R. Cameron. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75:2304-2323.
17. Doreau, M., and A. Ferlay. 1994. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45:379-396.
18. Doreau, M., and A. Ferlay. 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen. A review. *Livestock Production Science*, 43:97-110.
19. Doreau, M., F. Legay, and D. Bauchart. 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 74:2233.
20. Drackley, J. K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. *Veterinary Clinician North American Food Animal Practice*, 24(1):55-86.
21. EbnAli, A., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, A. H. Mahdavi, M. Malekkhahi, M. Mirzaei, A. Pezeshki, and M. H. Ghaffari. 2016. Effects of forage offering method on performance, rumen fermentation, nutrient digestibility and nutritional behaviour in Holstein dairy calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 100 (5):820-827.
22. Fasihi, H. 2013. Investigating the Interaction of starter Omega-6 to Omega-3 Ratio with Different Levels of Vitamin E and Selenium on Performance and Immunological Responses of Holstein Calves. MSc in Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology. (in Persian)
23. Gelsinger, S. L., A. L. Heinrichs, and C. M. Jones. 2016. A meta-analysis of the effects of preweaned calf nutrition and growth on first-lactation performance. *Journal of Dairy Science*, 99:6206-6214.
24. Ghasemi, E., M. Azad-Shahraki, and M. Khorvash. 2017. Effect of different fat supplements on performance of dairy calves during cold season. *Journal of Dairy Science*, 100:1-10.
25. Ghorbani, H., M. Kazemi-Bonchenari, M. HosseinYazdi, and E. Mahjoubi. 2020. Effects of various fat delivery methods in starter diet on growth performance, nutrients digestibility and blood metabolites of Holstein dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, In Press. 262:114429.
26. Hill, T. M., H. G. Bateman, J. M. Aldrich, and R. L. Schlotterbeck. 2011. Impact of various fatty acids on dairy calf performance. *Professional Animal Scientist*, 27:167-175.
27. Hill, T. M., H. G. Bateman, J. M. Aldrich, J. D. Quigley, and R. L. Schlotterbeck. 2015. Inclusion of tallow and soybean oil to calf starters fed to dairy calves from birth to four months of age on calf performance and digestion. *Journal of Dairy Science*, 98:4882-4888.
28. Hill, T., H. Bateman, J. Aldrich, and R. Schlotterbeck. 2009. Effects of fat concentration of a high-protein milk replacer on calf performance. *Journal of Dairy Science*, 92:5147-5153.
29. Hill, T., H. Bateman, J. Aldrich, and R. Schlotterbeck. 2010. Effect of milk replacer program on digestion of nutrients in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 93:1105-1115.
30. Hristov, A., M. Ivan, and T. McAllister. 2004. In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet. *Journal of Animal Science*, 82:2693-2704.
31. Jahani-Moghadam, M., E. Mahjoubi, M. HosseinYazdi, F. C. Cardoso, and J. K. Drackley. 2015. Effects of alfalfa hay and its physical form (chopped versus pelleted) on performance of Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 98:4055-4061.

32. Jenkins, T. C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76:3851-3863.
33. Kadkhoday, A., A. Riasi, M. Alikhani, M. Dehghan-Banadaky, and R. Kowsar. 2017. Effects of fat sources and dietary C18:2 to C18:3 fatty acids ratio on growth performance, ruminal fermentation and some blood components of Holstein calves. *Livestock Science*, 1871-1413(17).
34. Kazemi-Bonchenari, M., M. Dehghan-Banadaky, F. Fattahnia, A. Saleh-Bahmanpour, M. Jahani-Moghadam, and M. Mirzaei. 2020. Effects of linseed oil and rumen-undegradable protein: rumen-degradable protein ratio on performance of Holstein dairy calves. *British Journal of Nutrition*, 123:1247-1257.
35. Kazemi-Bonchenari, M., M. Mirzaei, M. Jahani-Moghadam, A. Soltani, E. Mahjoubi, and R. A. Patton. 2016. Interactions between levels of heat-treated soybean meal and prilled fat on growth, rumen fermentation, and blood metabolites of Holstein calves. *Journal of Animal Science*, 94:4267-4275.
36. Khan, M. A., D. M. Weary, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2011. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *Journal of Dairy Science*, 94:3547-3553.
37. Kohn, R. A., M. M. Dinneen, and E. Russek-Cohen. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *Journal of Animal Science*, 83:79-889.
38. Kuehn, C., D. Otterby, J. Linn, W. Olson, H. Chester-Jones, G. Marx, and J. Barmore. 1994. The effect of dietary energy concentration on calf performance. *Journal of Dairy Science*, 77: 2621-2629.
39. Leibholz, J. 1975. Ground roughage in the diet of the early-weaned calf. *Animal Production*, 20: 93-100.
40. Mirzaei, M., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Kazemi-Bonchenari, A. Riasi, A. Nabipour, and J. J. Van Den Borne. 2015. Effects of supplementation level and particle size of alfalfa hay on growth characteristics and rumen development in dairy calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 99(3):553-64.
41. Mirzaei, M., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Kazemi-Bonchenari, and M. H. Ghaffari. 2017. Growth performance, feeding behavior, and selected blood metabolites of Holstein dairy calves fed restricted amounts of milk: No interactions between sources of finely ground grain and forage provision. *Journal of Dairy Science*, 100:1086-1094.
42. Nocek, J. E., and E. M. Kesler. 1980. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *Journal of Dairy Science*, 63:249-254.
43. NRC (National Research Council). 2005. Mineral tolerance of animals, 2nd revised edition. The National Academy of Sciences Press, Washington DC, USA.
44. Phillips, C. J. C. 2004. The Effects of Forage Provision and Group Size on the Behavior of Calves. *Journal of dairy science*, 87(5):1380-1388.
45. Soliva, C. R., L. Meile, A. Cies'lak, M. Kreuzer, and A. Machmüller. 2004. Rumen simulation technique study on the interaction of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. *British Journal of Nutrition*, 92:689-700.
46. Tamate, H., A. D. McGilliard, N. L. Jacobson, and R. Getty. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science*, 45:408-420.
47. Terré, M., E. Pedrals, A. Dalmau, and A. Bach. 2013. What do preweaned and weaned calves need in the diet: a high fiber content or a forage source? *Journal of Dairy Science*, 96(8):5217-25.
48. Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharide in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.
49. Warner, R. G. 1991. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant: a historical perspective. Pp.1-12. *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers (USA)*.
50. Zinn, R. 1989. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for steers: Feedlot cattle growth and performance. *Journal of Animal Science*, 67(4):1029-1037.



Interaction effect of soy oil and alfalfa hay in starter diet of Holstein dairy calves on performance, growth indices, ruminal fermentation and blood metabolites

Abazar Karimi¹, Younes Alijoo^{2*}, Mahdi Kazemi-Bonchenari³, Mmahdi Mirzaei⁴, Hassan Sadri⁵

Submitted: 29-03-2020

Accepted: 24-10-2020

Karimi, A., Y. Alijoo, M. Kazemi-Bonchenari, m. Mirzaei and H.Sadri. 2021. Interaction effect of soy oil and alfalfa hay in starter diet of Holstein dairy calves on performance, growth indices, ruminal fermentation and blood metabolites. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):321-334.

Introduction Rumen growth and development is a complex process that is highly influenced by nutritional status. The characteristics of a starter diet and nutrients such as fat, protein and forage are closely linked to proper rumen growth and successful weaning, which can ultimately affect the future of alternative heifers and milk production. Consumption of fat sources due to reduced dietary dust, increased dietary energy and reduced ability to produce methane in ruminal fermentation in ruminants has been favored. Research has been shown that the use of fat in the diet of dairy calves has increased efficiency. However, the level of fat consumed, its source, and individual fatty acid ratios appear to impact the performance of dairy calves as well. Regardless the dietary fat inclusion and energy status, researchers have reported that the use of forage in the diets of dairy calves has improved ruminal function and growth function, stimulated rumination and reduced non-nutritional behaviors. However, the use of high levels of forage in dairy calves will lead to poor rumen development, gastrointestinal filling, reduced feed intake, and ultimately reduced growth in dairy calves. Due to the fact that fats could cover on the dietary fiber and prevent the access and binding of microorganisms in the digestive tract, the digestion of fiber is reduced and consequently the consumption of food is also affected. Therefore, due to these contradictory assumptions and also due to limited studies on the interaction between fat consumption and fiber source level in dairy calves, an experiment examining the effects of soybean oil (SO) on starter diets with or without alfalfa hay inclusion (AH) on performance, body Growth, ruminal fermentation, and blood metabolites were performed in Holstein dairy calves.

Materials and Methods The present study was conducted in Avin-Dasht Industrial Livestock located in Takestan city of Qazvin province. For this purpose, 40 newborn Holstein calves with an average age of 3 days and an average weight of 39 ± 2.2 kg with 4 experimental diets (10 repeat/ each) were used completely randomly as a 2×2 factorial design. Experimental diets include: 1) No SO supplementation with no AH (NSO-NAH); 2) No SO supplementation with 15% AH inclusion (NSO-AH); 3) SO supplementation with no AH (SO-NAH); 4) SO supplementation with 15% AH inclusion (SO-AH). The milking plane for calves and the volume of milk consumed by the end of the period were similar for calves in all treatments. Study was initiated from d-3 of age, weaned on d 63 and calves had free access to starter diet and water throughout the study. During the experiment, to determine the daily feed intake, before the fresh starter offering, the feed residual was collected and recorded. The chemical composition of the food treatments was measured. Growth factors were measured at the time of entry into the experiment and at weaning day as last day of the experiment. The calves were weighed on 10-d intervals until the end of the experiment (d -60). Growth parameters were evaluated on initial day and on the final day of the experiment. Rumen samples were taken was taken and the

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.

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

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran.

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

5- Associate Professor, Department of Clinical science, faculty Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran.

(* Corresponding author email: y.alijoo@urmia.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.v13i3.86191

concentration of volatile fatty acids was determined using a gas chromatography. The blood metabolites and liver enzymes concentrations were measured using commercial kits of Pars Azmoun Company and by calorimetry method with spectrophotometer. Data were analyzed using SAS statistical software and MIXED procedure with main effect of SO, and AH, and their interaction. The significance was considered at $P < 0.05$, and tendency was considered when P value was between 0.05 and 0.10 in the current study.

Results and Discussion The results of the present study showed that starter intake was influenced with the interaction effect between SO and AH, and the lowest starter diet intake was for SO-AH diet ($P < 0.05$). The average daily gain was tended to be lower in SO-AH diet and hence the least BW was observed for this treatment at weaning time ($P < 0.05$). Results show that heart girth, body length, body barrel, hip width did not differ among treatments. However, wither height was reduced in calves fed SO when it was along with AH. Both SO and AH inclusion in starter diet reduced hip height in the current study. The total short chain fatty acid concentration was reduced in SO-AH treatment compared with others. Feeding forage reduced propionate and butyrate but increased acetate concentration in ruminal fluid. The lowest blood glucose concentration was found in dairy calves fed SO-AH treatment in the current study ($P = 0.03$). The blood concentrations of total protein were reduced, but cholesterol was increased in SO supplemented calves. The concentration of blood urea nitrogen was increased when calves fed AH in starter diet ($P = 0.03$). However, in contrast, the beta-hydroxybutyrate concentration in the blood of calves fed alfalfa hay was reduced ($P = 0.02$).

Conclusion The experiment results indicated that supplementation of SO and AH separately in the starter diet of dairy calves had a negative effect on ruminal fermentation and hip height. By supplementing SO, an increase in serum cholesterol was observed, but it reduced the total protein in the serum. The results of blood urea concentration showed that the inclusion of AH increased its concentration; however, with respect to the beta-hydroxybutyrate concentration, it was reduced by AH inclusion in starter diet. The results showed that concurrent feeding of SO (3%) and AH (15%) in the starter diet of pre-weaning dairy calves, decreased the concentration of volatile fatty acids in rumen, blood glucose, weaning BW and wither height. Due to the current experimental conditions, the concurrent feeding of SO with AH is not recommended due to the negative effects of their interaction on growth performance, ruminal fermentation and as well as on some blood metabolites during pre-weaning period.

Keywords: Dairy calves, Forage level, Ruminal fermentation, Soy oil.



مقاله علمی - پژوهشی

سطوح مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در تکنیک تولید گاز و تأثیرات ضد میکروبی آنها بر باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروبیوس (*Peptostreptococcus* *anaerobius*) جداسازی شده از شکمبه

حجت ایمانی مقدم^۱، سمانه قاسمی^۲، سعید سبحانی راد^{۳*}، مهدی بهگر^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۴

ایمانی مقدم، ح.، س. قاسمی، س. سبحانی راد، و م. بهگر. ۱۴۰۰. سطوح مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در تکنیک تولید گاز و تأثیرات ضد میکروبی آنها بر باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروبیوس (*Peptostreptococcus anaerobius*) جداسازی شده از شکمبه. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۳۵-۳۴۹.

چکیده

به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف اسانس‌های میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون تنی، دو آزمایش تولید گاز و کشت میکروبی طراحی گردید. تکنیک تولید گاز در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×۳ شامل اسانس‌های مرزه و میخک هر کدام ۳ سطح (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم) طراحی شد. مقدار تولید گاز در طی ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ اندازه‌گیری شد. سطوح بالای اسانس میخک در ساعات ابتدایی تخمیر باعث افزایش معنی‌دار گاز تولیدی گردید. در مقابل اسانس میخک در ساعات ۲۴-۸ تولید گاز را کاهش داد. در آزمایش میکروبی، سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک (۲۵۰، ۴۰ و ۳۵ میکرولیتر برای هر اسانس بصورت جداگانه) و همچنین سطوح ترکیبی اسانس‌های مزبور (۹ تیمار حاوی سطوح ترکیبی) و یک گروه شاهد (استریوماپسین) مورد مقایسه قرار گرفتند. بعد از انجام کشت باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروبیوس در محیط کشت و تقابل آن با اسانس‌های مرزه و میخک مشاهده گردید تمامی تیمارهای حاوی اسانس (ساده و ترکیبی) نسبت به شاهد، تیمارهای حاوی اسانس مرزه نسبت به شاهد و سطوح ترکیبی اسانس‌های مزبور نسبت به سطوح ساده اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد این باکتری داشته‌است. به طور کلی نتایج مرحله اول آزمایش نشان داد که استفاده از اسانس میخک باعث کاهش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شد، اما اسانس مرزه بر مقدار تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار اسیدهای چرب فرار تأثیر نداشت. نتایج حاصل از آزمایشات کشت میکروبی نیز نشان داد اسانس‌های مرزه و میخک اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروبیوس داشته و در نتیجه تولید آمونیاک توسط این باکتری کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: اسانس مرزه، اسانس میخک، اسیدهای چرب فرار، پیتواستریپتوکوکوس انثروبیوس، تولید گاز.

مقدمه

میکروارگانیزم‌های می‌شود. به هر حال، این همزیستی همراه با اتلاف انرژی به صورت متان و اتلاف پروتئین به صورت آمونیاک است (۷). در این راستا، متخصصین تغذیه نشخوارکنندگان به دنبال راهی جهت

همزیستی بین میکروارگانیزم‌های شکمبه و حیوان سبب ایجاد شرایط و محیط مناسب تخمیر خوراک و محصولات میکروبی توسط

۴- استادیار پژوهش‌شده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران.

(*) نویسنده مسئول: Email: sobhanirad@gmail.com

DOI: 10.22067/ijasr.v13i3.73987

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۲- استادیار دپارتمان کشاورزی، دانشکده فنی و کشاورزی شهریار، دانشگاه فنی و حرفه ای استان تهران، تهران، ایران.

۳- استادیار گروه علوم کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

روی منابع دیگر کربوهیدرات رشدی در حد صفر و یا خیلی کم دارد (۱۳).

در میان اسانس‌های گیاهی موثر بر متابولیسم میکروب‌های شکمبه و کاهش شدید غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه، اسانس‌های میخک و مرزه نیز عنوان شده‌اند (۵). اثرات ضد پروتوزوایی عصاره میخک در مطالعات برون تنی با آزمایش تولید گاز اثبات شده است (۱۰). در این خصوص گزارش شده است که عصاره میخک با کاهش فعالیت پپتیدولیتیکی در شکمبه بر متابولیسم نیتروژن تاثیرگذار است (۵). همچنین اثرات عصاره میخک بر تخمیر شکمبه‌ای و کاهش اسیدهای چرب آزاد و نیتروژن آمونیاکی گزارش شده است (۷). گونل و همکاران (۱۸) نیز بیان کرده‌اند اوژنول (Eugenol) ترکیبی فنولی است که بخش عمده ترکیبات موثر میخک را تشکیل می‌دهد و اثرات ضد میکروبی وسیعی بر باکتریهای گرم مثبت و منفی دارد (۱۸). در خصوص اثرات اسانس مرزه، طلاطیه و همکاران (۳۸) اثر این اسانس بر تخمیر شکمبه‌ای در بزها و کاهش نیتروژن آمونیاکی را گزارش نموده‌اند. حدود یک یا دو درصد گیاه مرزه را اسانس این گیاه تشکیل می‌دهد، از مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس می‌توان از کارواکرول (۳۰ تا ۴۰ درصد)، تیمول (۲۰ تا ۳۰ درصد) و ترکیبات فنلی دیگر نام برد (۲۷).

مطالعات اندکی در مورد اثرات اسانس میخک و به خصوص اسانس مرزه بر خصوصیات هضمی اقلام خوراکی در داخل کشور انجام شده است. همچنین در خصوص اثرات متقابل اسانس‌های مرزه و میخک در آزمایشات برون تنی، مطالعه‌ای توسط نگارندگان یافت نشد. بنابراین هدف از انجام این آزمایشات تأثیر افزودن سطوح مختلف دو اسانس میخک و مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری و اثرات ضد میکروبی آنها بر باکتری پیتواستریپتوکوکوس انتروبیوس در آزمایش تولید گاز بود.

مواد و روش‌ها

۱- اسانس‌گیری نمونه‌های گیاهی به روش کلونجر^۱:

دو گیاه میخک و مرزه پس از شناسایی در آزمایشگاه علوم زراعی دانشگاه آزاد مشهد مجتمع بین‌المللی گلپهار بوسیله دستگاه کلونجر (شرکت فودس آلمان) اسانس‌گیری انجام شد. به منظور اسانس‌گیری، ابتدا نمونه خشک و سپس برای افزایش سطح تماس، آسیاب شد. پودر آسیاب شده در بالن ژوژه ریخته شد و پس از آن تا دو سوم حجم بالن با آب مقطر پر شد. سپس بالن ژوژه‌های حاوی مواد به دستگاه اسانس‌گیری کلونجر متصل شدند.

بهبود راندمان انرژی و پروتئین در شکمبه از طریق تغییر در محیط شکمبه می‌باشند (۶). استفاده از افزودنی‌هایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در کاهش اتلاف انرژی و پروتئین در شکمبه موفق بوده‌اند (۷)، اما در سال‌های اخیر نگرانی‌های عمومی در رابطه با استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها و انتقال آن‌ها از دام به انسان، افزایش یافته است. همچنین ممنوعیت استفاده از آنها در اتحادیه اروپا از سال ۲۰۰۶ باعث کاهش استفاده از آنها شده است. به همین دلیل دانشمندان به دنبال استفاده از مواد جایگزین جهت تغییر در تخمیر شکمبه هستند که می‌توان به پروبیوتیک‌ها، مخمرها، اسیدهای آلی، عصاره و اسانس‌های گیاهی اشاره کرد (۶).

دامنه و سیعی از ترکیبات آلی توسط گیاهان تولید می‌شوند که به نظر می‌رسد تأثیر مستقیمی بر رشد آنها ندارد (۱). این ترکیبات معمولاً مسئول بو، رنگ و طعم در گیاهان هستند و به عنوان ناقل‌های شیمیایی بین گیاه و محیط عمل می‌کنند و اغلب فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها دارند (۱۵). فعالیت اسانس‌های گیاهی بر علیه باکتری‌ها، پروتوزوآها و قارچ‌ها به اثبات رسیده است، اما طرز عمل آنها دقیقاً روشن نیست (۴، ۱۲ و ۱۵). چندین فرضیه جهت توصیف ویژگی‌های ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی بیان شده است. فرضیه ای که بیش از همه مورد پذیرش قرار گرفته است اثر متقابل اسانس‌های گیاهی بر غشای سلول‌های باکتریایی است. تجمع اسانس‌های گیاهی بین زنجیره‌ها یا اسیدهای چرب موجب تغییرات ساختاری در غشای سلولی شده و موجب افزایش بی‌ثباتی و سیالیت غشا می‌گردد (۱۷). همچنین اسانس‌های گیاهی ممکن است باکتری‌های تولید کننده آمونیاک^۱ زیاد مانند کلاستریدیوم استیکلندی^۲

و پیتواستریپتوکوکوس انتروبیوس^۳ در شکمبه را مهار نمایند. باکتری‌های تولید کننده آمونیاک زیاد به تعداد بالا در شکمبه وجود ندارند اما دارای فعالیت‌های دی‌آمیناسیون خیلی شدیدی می‌باشند و آمونیاک زیادی در شکمبه تولید می‌کنند (۳۲، ۳۶ و ۳۹). بنابراین کاهش باکتری‌های تولید کننده آمونیاک بالا می‌تواند موجب کاهش دی‌آمیناسیون اسیدهای آمینه، کاهش غلظت آمونیاک و افزایش بازده استفاده از پروتئین در شکمبه گردد (۳۹). باکتری پیتواستریپتوکوکوس انتروبیوس به صورت یک کوکسی غیرمتحرک گرم مثبت، که معمولاً به شکل منفرد یا دوتایی است دیده می‌شود، بی‌هوازی بوده و ۱ تا ۱/۲ میکرولیتر قطر دارد. این ارگانیزم پکتین را به سرعت تخمیر می‌کند و بعنوان محصولات نهایی اصلی اسیداستیک و هیدروژن تولید می‌نماید. مقادیر کمی اسید فرمیک در اثر تخمیر پکتین نیز تولید می‌شود. همچنین مشاهده شده است این باکتری به جز رشد خیلی آهسته و کمی که بر روی گلوکز، سلوبیوز، مالتوز و سوکروز دارد، بر

3- *Peptostreptococcus anaerobius*

4- *Clevenger*

1- Hayper Producing Bacteria

2- *Clostridium sticklandii*

پروتئین خام $0.0815 \pm$ + تولید گاز $0.072222 \pm$ + $24/91$ = (در صد)
 ماده آلی قابل هضم (معادله ۱)
 $0.0002859 \pm$ + پروتئین خام $0.0057 \pm$ + تولید گاز
 $0.1357 \pm$ (MJ/kg DM) انرژی متابولیسمی (معادله ۲)
 $0.00425 \pm$ - گاز تولیدی $0.0222 \pm$ = (میلی مول به ازای ۲۰۰
 میلی گرم ماده خشک) اسیدهای چرب فرار (معادله ۳)

تهیه باکتریهای خالص شکمبه ای

برای فراهم کردن باکتری‌های شکمبه، بعد از گرفتن مایع شکمبه و صاف کردن آن، در ۱۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده، سوپرناتانت آن را جدا کرده و سپس با استفاده از قارچ کش‌ها (بنومیل، ۱۰ میلی گرم در لیتر و نیستاتین، ۲۰۰ واحد در هر میلی لیتر)، قارچ‌های بی‌هوازی شسته شدند. محلول بدست آمده به عنوان محیط حاوی باکتری‌های خالص شکمبه استفاده شد (۲۲ و ۴۰).

مراحل جداسازی باکتری پیتواسترپتوکوکوس انثروبیوس از محتویات شکمبه

به منظور جداسازی باکتری پیتواسترپتوکوکوس انثروبیوس از باکتری‌های خالص شکمبه ای، در محیط کشت بایل آسکولین آزاید آگار^۱ (BAAA) ابتدا کشت اولیه در محیط کشت محلول و مغذی که دارای ترکیبات مناسب شامل تریپتیکاز، پکتنین، دولسیتول و لاکتات می‌باشد صورت گرفت که پس از طی شدن زمان انکوباتور گذاری در محیط کشت مورد نظر (BAAA) کلنی‌هایی به رنگ قهوه‌ای به قطر ۱ الی ۲ میلی متر ایجاد شد. با بررسی کلنی‌ها و رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی می‌توان تاییدی بر باکتری مورد نظر که همان پیتواسترپتوکوکوس انثروبیوس است، داشت (۱۴ و ۳۰).

انجام کشت چند خطی^۲

هدف از انجام این کشت رسیدن به کلنی‌های تک و خالص شده باکتری مورد نظر می‌باشد که در طی سه مرحله به صورت موازی و زیگزاگی کشت می‌شوند، به این صورت که ابتدا سوزن آنس را برای اینکه استریل یا ضد عفونی شود روی شعله چراغ گرفته و کلنی مورد نظر را برداشته و در نهایت به شکلی کشت انجام می‌شود که در قسمت‌های دوم و حداکثر سوم کشت با کلنی‌های خالص رو به رو گردیم. برای در اختیار داشتن محیط کشت مورد نظری که در آن باکتری پیتواسترپتوکوکوس انثروبیوس به خوبی رشد کرده باشد و انجام آزمایش مقابله با اسانس، مجدداً در محیط‌های کشت جامد و مناسب، محیط کشت مایع و نیمه مغذی و مناسب استفاده شد و سپس

به منظور آغاز کار منبع حرارت روشن شده و زمان شروع آزمایش ثبت شد. اسانس به دلیل ترکیبات خود معمولاً دارای چگالی کمتر از آب است، به همین خاطر روی آب قرار می‌گیرد. در پایان عملیات اسانس گیری، شیرخروجی دستگاه کلونجر باز شد و اسانس در ظرف مخصوص خود ریخته شد.

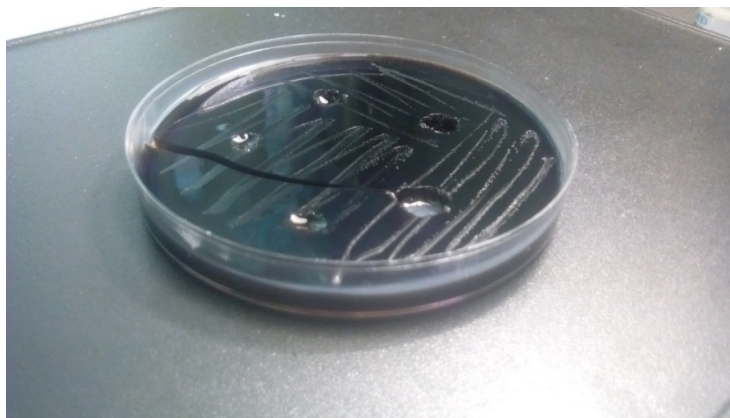
آماده سازی نمونه‌ها و تیمارهای آزمایشی: برای انجام

آزمایش تولید گاز از مخلوط علف یونجه و دانه جو (نسبت ۱:۱) و اسانس‌های تهیه شده میخک و مرزه هر کدام با سه سطح (۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم) به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل 3×3 و در مجموع ۹ تیمار استفاده شد. علف یونجه و دانه جو از واحد گاوداری شیری تهیه شده بودند.

تهیه نمونه مایع شکمبه: مایع شکمبه از دو رأس گوسفند (49.5 ± 2.5 کیلوگرم وزن زنده) که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند قبل از وعده‌ی خوراک‌دهی صبح گرفته شد. حیوانات روزانه با یک کیلوگرم یونجه و 0.3 کیلوگرم کنسانتره (شامل دانه جو، کنجاله سویا، سبوس، آهک، نمک و مکمل معدنی و ویتامینه) بر اساس ماده‌ی خشک تغذیه می‌شدند. مایع شکمبه جمع‌آوری شده از گوسفندان به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط و فوراً به وسیله پارچه متقال چهار لایه صاف شد و در فلاسک مخصوص به آزمایشگاه منتقل شد. سپس ظرف محتوی مایع شکمبه در آب گرم 39 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

آزمایش تولید گاز: آزمایش تولید گاز بر اساس روش منک و همکاران (۲۷) انجام شد. مقدار 200 میلی‌گرم از مخلوط یونجه و جو (نسبت ۱:۱) به همراه ۹ تیمار آزمایشی (مقادیر مختلف اسانس میخک و یا مرزه) در سرنگ‌های شیشه‌ای 100 میلی‌لیتری ریخته شد و به آن محیط کشت حاوی مایع شکمبه به میزان 30 میلی‌لیتر اضافه شد و در حمام آب گرم 39 درجه سانتی‌گراد آنکوباسیون شدند. مقدار تولید گاز در طی ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ اندازه‌گیری شد. برای تهیه محیط کشت از مایع شکمبه صاف شده، از پارچه متقال چهار لایه استفاده شد. ترکیب نهایی محیط کشت (500 میلی‌لیتر) به شرح زیر بود: آب مقطر 237 میلی‌لیتر، محلول نمک‌های پر نیاز $118/5$ میلی‌لیتر، محلول بافر $118/5$ میلی‌لیتر، محلول نمک‌های کم نیاز 0.06 میلی‌لیتر، رزوزارین 0.61 میلی‌لیتر، محلول احیاء کننده 25 میلی‌لیتر (شامل $23/8$ میلی‌لیتر آب مقطر، 1 میلی‌لیتر سود 1 نرمال و $142/5$ میلی‌گرم سولفید سدیم). همچنین ماده آلی قابل هضم (معادله ۱) و انرژی متابولیسمی (معادله ۲) بر اساس روش پیشنهادی منک و استینگاس (۲۶) و مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (معادله ۳) در هر سرنگ بر اساس معادله ارائه شده گنجاو و همکاران (۱۶) به صورت زیر تخمین زده شد:

محیطها به مدت حداقل ۱۸ و حداکثر ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و این شرایط برای این ایجاد شد که باکتری‌ها در فاز فعال و مناسب باقی بمانند (شکل ۱). پس از انکوباتور گذاری محیط کشت را به مدت یک هفته در یخچال می‌توان نگهداری کرد (۲۹).



شکل ۱- نمایی از انجام کشت خطی باکتری پیتواستریپتوکوکوس انتریپوس در محیط کشت BAA

Figure 1. A view of the streak method used to treat the bacteria *Peptostreptococcus anaerobius* in the BAA culture

جدول ۱- توضیح تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک استفاده شده در آزمایش دیفیوژن

Table 1- Statement of experimental treatments include different levels of clove and savory essences used in experiment of disk diffusion

تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments	سطوح اسانس (میکرولیتر) Levels of essential oils (μl)		تیمارهای آزمایشی Experimental Treatments	سطوح اسانس (میکرولیتر) Levels of essential oils (μl)	
	مرزه Clove	میخک Savory		مرزه Clove	میخک Savory
T ₁	20	-	T ₉	20	40
T ₂	35	-	T ₁₀	35	20
T ₃	40	-	T ₁₁	35	35
T ₄	-	20	T ₁₂	35	40
T ₅	-	35	T ₁₃	40	20
T ₆	-	40	T ₁₄	40	35
T ₇	20	20	T ₁₅	40	40
T ₈	20	35	T ₁₆	Positive control (streptomycin)	

پس از خاتمه کشت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا باکتری‌ها به رشد خود ادامه دهند یا توسط اسانس‌های مورد نظر از رشد بازمانند. پس از گذشت مدت فوق در حاشیه دیسک‌ها منطقه‌ای ایجاد شد که به آن حداقل غلظت بازدارندگی اسانس یا منطقه تدافعی گفته می‌شود. بنابراین می‌توان به قدرت بازدارندگی اسانس‌ها و فعالیت باکتری‌ها پی برد. هر چه قدر این منطقه تدافعی کمتر یا در حد صفر باشد نشان دهنده قدرت باکتری و مقابله آن با اسانس‌های مرزه و میخک می‌باشد. همچنین از آنتی بیوتیک استرپتومایسین (شاهد مثبت) نیز برای مهار کنندگی باکتری استفاده شد. روش اندازه‌گیری منطقه تدافعی بدین صورت بود

تهیه رقت‌های سریالی از اسانس‌ها و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی^۱

در آزمایش حاضر از روش دیسک دیفیوژن^۲ جهت غربالگری فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های مرزه و میخک استفاده شد، بدین صورت که ابتدا از دو اسانس میخک و مرزه هر کدام با سه رقت ۲۰، ۳۵ و ۴۰ میکرولیتر بر دیسک به روش فاکتوریل استفاده گردید و تیمارهای آزمایشی هر کدام با چهار تکرار مطابق جدول ۱ مورد آزمایش قرار گرفت. روش عمل بدین صورت بود که دیسک‌های تزریق شده توسط اسانس با فاصله معینی روی محیط کشت مورد نظر (BAA) از باکتری پیتواستریپتوکوکوس انتریپوس قرار داده شد.

که با استفاده از کولیس بر حسب میلی متر قطر هاله باکتری مورد نظر اندازه گیری و سپس ثبت شد (۲۹).

جدول ۲- مقدار تولید گاز تجمعی تیمارهای آزمایشی در ساعات مختلف انکوباسیون (میلی لیتر)

Table 2- The amount of cumulative gas production of experimental treatments in different incubation hours (ml)

تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental Treatments ¹	ساعات انکوباسیون Incubation hours								
	2	4	8	16	24	48	72	96	120
مرزه Clove									
0	5.46 ^b	14.33 ^b	43.25	74.58	88.25	106.08	113.67	114.83	116.25
250	7.54 ^{ab}	15.79 ^{ab}	37.75	65.75	76.33	96.25	106.58	107.79	110.63
500	10.67 ^a	19.50 ^a	42.29	67.38	78.63	95.63	107.29	108.54	111.88
SEM ²	1.10	1.40	3.22	4.96	5.73	4.67	4.14	4.13	3.51
میخک Savory									
0	6.83	16.92	48.33 ^a	79.75 ^a	90.58 ^a	107.17	115.83	116.54	118.21
250	8.13	17.04	43.58 ^a	70.38 ^a	80.71 ^a	97.38	106.71	108.38	111.75
500	8.71	15.67	31.50 ^b	57.58 ^b	71.92 ^b	93.42	105.00	106.25	108.79
SEM ³	3.51	4.13	4.14	4.67	5.73	4.96	3.22	1.40	1.10
مرزه×میخک Savory ×Clove									
0×0	9.75	20.50	51.25	81.25	92.25	111.50	121.25	122.00	123.25
250×0	2.88	12.13	52.63	83.38	94.63	113.88	120.38	122.50	123.25
500×0	3.75	10.38	26.88	59.13	77.88	92.88	99.38	100.00	102.25
0×250	1.75	11.13	45.38	80.63	91.38	106.38	114.13	114.75	117.75
250×250	10.00	18.50	36.25	60.75	69.00	88.75	102.75	104.50	107.38
500×250	11.88	17.75	31.63	55.88	68.63	93.63	102.88	104.13	106.75
0×500	9.00	19.13	48.38	77.38	88.13	103.63	112.13	112.88	113.63
250×250	11.50	20.50	42.50	67.00	78.50	89.50	97.00	98.13	104.63
500×500	11.50	18.88	36.00	57.75	69.25	93.75	112.75	114.63	117.38
SEM ³	1.90	2.42	5.59	8.56	9.93	8.09	7.17	7.16	6.08
P value									
مرزه Clove	<0.01	0.04	0.45	0.42	0.31	0.23	0.42	0.42	0.50
میخک Savory	0.48	0.74	<0.01	<0.01	0.09	0.12	0.16	0.20	0.17
مرزه×میخک Savory ×Clove	<0.01	0.01	0.42	0.75	0.81	0.48	0.18	0.14	0.10

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

^۱ تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می‌باشند.

^۲ میانگین خطای استاندارد

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

¹ Experimental treatments based on mg.

² Standard Error of Means

جدول ۳- فراسنجه‌های تولید گاز در تیمارهای آزمایشی

Table 3- Gas production parameters in experimental treatments

تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental Treatments ¹	تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی لیتر به ازای ۰/۲ گرم) b	نرخ تولید گاز (میلی لیتر در ساعت) c
مرزه Clove		
0	116.39	0.06
250	111.53	0.053
500	111.43	0.056
SEM ²	3.69	<0.01
میخک Savory		
0	116.99	0.063
250	110.17	0.057
500	112.20	0.049
SEM ³	3.69	<0.01
مرزه×میخک Savory ×Clove		
0×0	121.97	0.062
250×0	122.88	0.061
500×0	104.33	0.058
0×250	116.33	0.060
250×250	107.75	0.051
500×250	110.51	0.049
0×500	112.67	0.066
250×250	99.89	0.061
500×500	121.74	0.041
SEM ³	6.38	<0.01
P value		
مرزه Clove	0.56	0.57
میخک Savory	0.42	0.13
مرزه×میخک Savory ×Clove	0.69	0.06

a,b میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

^۱ تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می‌باشند.^۲ میانگین خطای استاندارد

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

^۱Experimental treatments based on mg.^۲Standard Error of Means

تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

که:

Y_{ijk} = مشاهده مربوط به سطح i ام فاکتور A و سطح j ام فاکتور B، μ = میانگین کل مشاهدات، A_i = اثر فاکتور i ، B_j = اثر فاکتور j ، AB_{ij} = اثر متقابل فاکتور i در فاکتور j و e_{ijk} = خطای تصادفی.

نتایج

مقدار تولید گاز تیمارهای آزمایشی در ساعات مختلف انکوباسیون

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از تولید گاز (میلی لیتر به ازاء ۰/۲ گرم ماده خشک) به منظور محاسبه ضرایب با استفاده از رویه NLIN در نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) براساس مدل زیر آنالیز شدند.

$$GP = b(1 - e^{-c(t)})$$

که در این معادله GP = حجم گاز تولیدی در زمان t ، b = بخشی که در طول زمان گاز تولید می‌کند (کند تجزیه)، c = نرخ تولید گاز (در ساعت) از بخش b در خوراک‌های کند تخمیر و c = زمان انکوباسیون بر حسب ساعت بود.

در پایان داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ با استفاده از رویه آماری GLM با استفاده از مدل زیر مورد

یا هر یک از اسانس‌ها قرار نگرفت. با وجود این اثرات متقابل دو اسانس بر پتانسیل گاز تولیدی تمایل به کاهش داشت ($P=0/06$). مقدار ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار در جدول ۴ نشان داده شده است. سطوح مختلف اسانس مرزه تأثیری بر مقدار ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و اسیدهای چرب فرار نداشت، اما با افزایش سطح اسانس میخک، مقدار ماده آلی قابل هضم و انرژی متابولیسمی تمایل به کاهش داشت ($P=0/09$).

در جدول ۲ نشان داده شده است. استفاده از سطح اسانس مرزه ۵۰۰ میلی گرم باعث افزایش گاز تولیدی در مقایسه با گروه شاهد در ساعات اولیه (۲ و ۴ ساعت) تخمیر شد ($P<0/05$). اما استفاده از میخک در سطح ۵۰۰ میلی گرم باعث کاهش گاز تجمعی تولیدی در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴ در مقایسه با سطح ۲۵۰ میلی گرم و گروه شاهد شد ($P<0/05$). همچنین اثر متقابل مرزه و میخک در زمان ۲ و ۴ ساعت معنی دار بود و باعث افزایش مقدار گاز تولیدی شد ($P<0/05$). فراسنجه‌های تولید گاز تیمارهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. مقدار تولید گاز (b) و نرخ تولید گاز (c) تحت تأثیر تیمارها

جدول ۴- ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی اسیدهای چرب فرار در تیمارهای آزمایشی

Table 4-Digestible organic matter, Metabolizable energy and Digestible organic matter in experimental treatments

تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental Treatments ¹	ماده آلی قابل هضم Digestible organic matter (%)	انرژی متابولیسمی Metabolizable energy (MJ/kg DM)	اسیدهای چرب فرار Volatile free acids (mmol/200 mg DM)
مرزه Clove			
0	14.29	89.67	2.58
250	12.67	81.06	2.45
500	12.99	82.71	2.48
SEM ²	0.78	4.14	0.08
میخک Savory			
0	14.61	91.35	2.62
250	13.27	84.22	2.48
500	12.08	77.88	2.41
SEM ³	0.78	4.14	0.08
مرزه×میخک Savory ×Clove			
0×0	92.55	14.83	2.73
250×0	94.27	15.16	2.73
500×0	82.17	12.83	2.27
0×250	91.92	14.72	2.61
250×250	75.76	11.68	2.38
500×250	75.49	11.63	2.37
0×500	89.57	14.28	2.52
250×500	82.62	12.97	2.32
500×500	75.94	11.71	2.60
SEM ³	7.17	1.35	0.13
P value			
مرزه Clove	0.13	0.31	0.50
میخک Savory	0.09	0.09	0.17
مرزه×میخک Savory ×Clove	0.81	0.81	0.10

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P<0/05$).

^۱ تیمارهای آزمایشی بر حسب میلی گرم می‌باشند.

^۲ میانگین خطای استاندارد

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

¹ Experimental treatments based on mg.

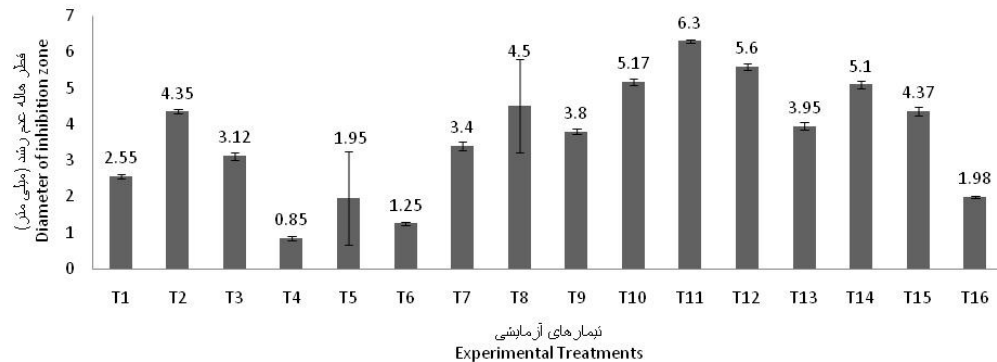
² Standard Error of Means

رشد باکتری پیتو/ستریپتوکوکوس/اثریوس در شکل ۲ نشان داده شده

نتایج حاصل از تأثیر اسانس‌های مرزه و میخک بر قطر هاله عدم

میانگین ۶/۳ سانتی متر و کمترین رشد قطر هاله باکتری مربوط به تیمار ۴ (سطح ۲۰ میکرولیتر اسانس میخک) با میانگین ۰/۸۵ سانتی متر بود ($P < 0/05$). شکل ۳، تصویر تعدادی از هاله عدم رشد باکتری پپتواسترپتوکوکوس انثروبیوس را در غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و میخک نشان می‌دهد.

است. بر اساس نتایج به دست آمده از روش دیسک دیفیوژن مشاهده شد میزان بازدارندگی از رشد باکتری مزبور در تمامی رقت‌های ذکر شده اسانس‌های مرزه و میخک معنی دار می‌باشد ($P < 0/05$). همچنین بالاترین رشد قطر هاله باکتری مربوط به تیمار ۱۱ (سطح ۳۵ میکرو لیتر اسانس میخک + سطح ۳۵ میکرو لیتر اسانس مرزه) با



شکل ۲- تاثیر اسانس‌های مرزه و میخک بر قطر هاله عدم رشد باکتری پپتواسترپتوکوکوس انثروبیوس (T₁-T₁₆، تیمارهای آزمایشی توضیح داده شده در جدول ۱ می‌باشند).

Figure 2- Effect of clove and savory essences on diameter of inhibition zone of *Peptostreptococcus anaerobius* (T₁-T₁₆ are experimental treatments stated in Table 1)



شکل ۳- فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های مرزه و میخک با باکتری پپتواسترپتوکوکوس انثروبیوس در روش کشت چند خطی

Figure 3- Antimicrobial activity of clove and savory essences with *Peptostreptococcus anaerobius* in streak method

انثروبیوس در بین تیمارهای آزمایشی گزارش شده است. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱ تا ۱۵ (سطوح

همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود در مقایسات گروهی میانگین میزان عدم رشد قطر هاله باکتری پپتواسترپتوکوکوس

سانتی متر مشاهده گردید و بنابراین نشان داد این مقایسه معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$). میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۷ تا ۱۵ (سطوح مختلف ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۴/۶۸ در مقایسه با قطر هاله باکتری در تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸ نیز نشان داد این مقایسه معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$). بنابراین اسانس‌های مرزه و میخک در هر دو صورت ساده و ترکیبی قادرند اثرات بازدارندگی معنی داری بر رشد باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروپوس داشته باشد. همچنین نتایج مقایسه گروهی نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای حاوی سطوح ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک (تیمارهای ۷ تا ۱۵) با میانگین ۴/۶۸ سانتی متر نسبت به سطوح ساده مختلف اسانس‌های مرزه و میخک (تیمارهای ۱ تا ۶) با میانگین ۲/۴۳ سانتی متر بیشتر می‌باشد ($P < 0.05$).

مختلف تمام اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۴/۳۸ سانتی متر در مقایسه با تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸ سانتی متر مشاهده گردید که تمامی تیمارهای حاوی اسانس (ساده و ترکیبی) نسبت به شاهد اثر بازدارندگی رشد را در باکتری مزبور افزایش دادند ($P < 0.05$). همچنین میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ (سطوح ساده مختلف اسانس مرزه) با میانگین ۳/۳۴ سانتی متر در مقایسه با میانگین قطر هاله باکتری در تیمارهای ۴، ۵ و ۶ (سطوح ساده مختلف اسانس میخک) با میانگین ۱/۳۵ سانتی متر نیز نشان داد اسانس مرزه نسبت به اسانس میخک غلظت بازدارندگی بیشتری بر رشد باکتری مزبور داشته است ($P < 0.05$). میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در تیمارهای ۱ تا ۶ (سطوح ساده مختلف اسانس‌های مرزه و میخک) با میانگین ۳/۳۴ در مقایسه با قطر هاله باکتری در تیمار ۱۶ (استرپتومایسین) با میانگین ۱/۹۸

جدول ۵ - مقایسات گروهی برای سطوح متفاوت اسانس‌های مرزه و میخک بر قطر هاله عدم رشد باکتری پیتواستریپتوکوکوس انثروپوس

Table 5- Orthogonal comparison for different levels of clove and savory essences on diameter of inhibition zone of *Peptostreptococcus anaerobius*

متغیرها Parameters	P-value
تمام سطوح مختلف اسانس‌های مرزه و میخک با شاهد (استرپتومایسین) All different levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin)	<0.0001
سطوح ساده اسانس مرزه با سطوح ساده اسانس میخک Simple levels of clove essence vs. savory essence	<0.0001
سطوح ساده اسانس مرزه و میخک با شاهد (استرپتومایسین) Simple levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin)	<0.0001
سطوح ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک با شاهد مثبت (استرپتومایسین) Complex levels of clove and savory essences vs. control (streptomycin)	<0.0001
سطوح ساده اسانس‌های مرزه و میخک با سطوح ترکیبی اسانس‌های مرزه و میخک Simple levels of clove and savory essences vs. complex levels of clove and savory essences	<0.0001

بحث

تولید گاز مخلوطی از کاه ارزن و کنسانتره (با نسبت ۸۰ به ۲۰) را کاهش می‌دهد (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر استفاده از دزهای مختلف عصاره‌های گیاهی بر تولید گاز مخلوط ۵۰:۵۰ علف یونجه و کنسانتره مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که عصاره میخک در مقایسه با دیگر اسانس‌های مورد مطالعه توانایی متوسطی از این نظر دارد. در این مطالعه اثر کاهش عصاره میخک بر کاهش گاز تولیدی با افزایش دز خطی بود.

در مطالعه حاضر پتانسیل گاز تولیدی (b) تنها در زمان استفاده همزمان از دو اسانس تمایل به کاهش گاز تولیدی داشت. در گزارشی روفیق و همکاران (۳۴) نشان دادند که استفاده از عصاره میخک به مقدار ۳۰۰ بخش در میلیون تاثیر معنی داری بر ضرایب آزمون تولید گاز جیره مخلوط دارای نسبت ۶۰:۴۰ علوفه به کنسانتره نداشت. گزارشی از تاثیر اسانس مرزه بر ضرایب تولید گاز توسط نگارندگان یافت نشد.

در مطالعه حاضر اگرچه اسانس مرزه در ساعت آغازین تخمیر (۲ و ۴ ساعت) و اسانس میخک در ساعات بعدی تا ۲۴ ساعت باعث کاهش گاز تولیدی شدند، اثر متقابل مرزه و میخک در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت باعث افزایش مقدار گاز تولیدی شد ($P < 0.05$). در مطالعه‌ای (۲۱) اثرات اسانس‌های مختلف بر کاهش گاز تولیدی مخلوط علف یونجه و کنسانتره (با نسبت ۸۰ به ۲۰) را مورد بررسی قرار دادند و علی‌رغم اثر کاهشی تولید گاز توسط دیگر اسانس‌های مورد بررسی، تأثیری از عصاره میخک بر تولید گاز مشاهده نکردند. نتایج مطالعه حاضر این نتایج را تایید می‌کند. نتیجه مشابهی هم توسط گونال و همکاران (۱۸) با استفاده از ۵۰۰ میلی گرم عصاره میخک بر تولید گاز جیره حاوی علف یونجه-سیلاژ ذرت و کنسانتره به نسبت ۵۰:۵۰ گزارش شده است. در مقابل دیگر مطالعات انجام شده با اسانس میخک نشان داده است که استفاده از دزهای افزایشی این اسانس

(کارواکرول) به مقدار ۰/۵ میلی گرم در لیتر از محیط کشت، تأثیری از این ماده بر قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی حاوی همی سلولز علف یونجه، دانه ذرت، کنجاله سویا و جیره مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی مشاهده نکردند.

داده‌های اندکی در خصوص اثرات متقابل استفاده از اسانس‌های گیاهی و همچنین اثرات اسانس مرزه بر فراسنجه‌های تخمیری منتشر شده است. روفیق و همکاران (۳۴) اثرات همپوشانی مثبت بین اسانس میخک و دارچین را در کاهش متان تولیدی در آزمایشات برون تنی نشان دادند.

علت تناقض و تفاوت در نتایج بدست آمده از آزمایشات مختلف در خصوص اثرات اسانس بر تخمیر و تغییر فراسنجه‌های تخمیری می‌تواند به دلایل مختلفی باشد که مهمترین آن روش عصاره‌گیری و نوع جیره آزمایشی (نسبت علوفه به کنسانتره) است. طلا تپه و همکاران (۳۸) نشان دادند که اثر متقابل جیره و اسانس مرزه بر افزایش وزن بزغاله‌های بومی آذربایجان معنی دار است. مائوس و همکاران (۲۳) تأثیر استفاده از اسانس‌های دارچین و سیر را بر روی جیره‌های دارای کنسانتره متوسط و زیاد مقایسه نمودند و نشان دادند که نوع جیره دارای اثر متقابل معنی دار با اسانس‌های بکار رفته بر تولید گاز و نسبت اسیدهای چرب تولیدی دارد. همچنین کاردوزو و همکاران (۸) نشان دادند که مقدار pH محیط کشت حاوی مایع شکمبه در شرایط برون تنی می‌تواند دارای اثر متقابل بر پاسخ حاصل از اسانس‌های گیاهی مورد استفاده داشته باشد.

در آزمایش حاضر، کمترین اثر ضد میکروبی، مربوط به سطح ۲۰ میکرولیتر اسانس میخک و بیشترین اثر ضد میکروبی، مربوط به ترکیب ۳۵ میکرولیتر از هر کدام از اسانس‌های میخک و مرزه بوده است. بنابراین اثر ضد میکروبی اسانس‌های مرزه و میخک با سطح ۳۵ میکرولیتر افزایش یافته است. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات کشت میکروبی باکتری تولید کننده آمونیاک (پیتواس‌تریپتوکوکوس /نئروبیوس) نیز نشان داد تمامی تیمارهای حاوی اسانس (ساده و ترکیبی) نسبت به شاهد، تیمارهای حاوی اسانس مرزه نسبت به شاهد و سطوح ترکیبی اسانس‌های مزبور نسبت به سطوح ساده اثر بازدارندگی بیشتری بر رشد این باکتری داشته است ($P < 0.05$). لذا اثر ممانعت‌کنندگی اسانس‌های مرزه و میخک بر روی این باکتری نشان داد که استفاده از اسانس‌های مرزه و میخک در این تیمارها باعث می‌شود که تولید آمونیاک احتمالاً کاهش یابد.

در تحقیقات نشان داده شده است که اسانس‌ها با کاهش جمعیت باکتری و تک یاخته‌های تولید کننده آمونیاک شکمبه به میزان فراوان سبب کاهش نیتروژن آمونیایی مایع شکمبه می‌شوند (۳۹). کاهش غلظت نیتروژن آمونیایی در جیره‌های حاوی آویشن شیرازی که ترکیباتی مشابه به مرزه و میخک دارد می‌تواند با اثر فعالیت ضد میکروبی این اسانس بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری تولید کننده

در خصوص اثرات متقابل دو اسانس میخک و مرزه گزارشی توسط نگارندگان یافت نشد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد استفاده همزمان از دو اسانس به طور معنی‌داری پتانسیل تولید گاز را کاهش داده و همچنین تمایل به کاهش تولید گاز تجمعی در زمان ۱۲۰ ساعت و تولید اسیدهای چرب فرار داشت. علت کاهش تولید گاز را می‌توان، افزایش قند‌های محلول در واکنش ترکیبی به واسطه افزودن عصاره‌های گیاهی بیان کرد (۲۵). همچنین سایر محققان، اثرات همکوشی یا متضاد ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی مذکور (تیمول و کارواکرول و اوژنول) را موجب تغییر در تأثیر گذاری اسانس و نتایج حاصله بیان کرده‌اند (۴).

در مطالعه حاضر ماده آلی قابل هضم، انرژی متابولیسمی و تولید اسیدهای چرب فرار بر اساس معادلات ارائه شده تخمین زده شد. استفاده از اسانس میخک تمایل به کاهش ماده آلی قابل هضم و انرژی متابولیسمی داشت اما تأثیری بر اسیدهای چرب فرار نداشت. در تضاد با این نتایج، روفیق و همکاران (۳۴) نشان دادند که استفاده از عصاره میخک در غلظت ۳۰۰ بخش در میلیون تأثیری بر انرژی متابولیسمی تخمین زده شده در آزمایش تولید گاز نداشت. در مطالعه حاضر مقدار اسانس مورد استفاده بیشتر از این مقدار بود (تا ۵۰۰ بخش در میلیون).

گونال و همکاران (۱۰) نیز نشان دادند که استفاده از عصاره میخک اگرچه تأثیری بر تولید اسیدهای چرب فرار نداشت با این حال باعث کاهش قابلیت هضم ماده خشک شد. با وجود این پاترا و یو (۳۲) کاهش اسیدهای چرب فرار و قابلیت هضم ماده خشک را با استفاده از اسانس میخک نشان دادند. کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش قابلیت هضم واقعی ماده خشک با استفاده از عصاره میخک در آزمایشات قبلی نیز گزارش شده است (۱۰). در تضاد با نتایج حاضر، کاستیلجنوس و همکاران (۹) نشان دادند که استفاده از عصاره مرزه تا غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر از محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت باعث افزایش تولید اسیدهای چرب جیره حاوی علوفه و کنسانتره با نسبت ۱۰ به ۹۰ شد.

کاهش ناپدید شدن ماده خشک با استفاده از عصاره میخک توسط جهانی عزیزیادی و همکاران (۱۲) گزارش شده بود. با وجود این در مطالعه‌ای روی و همکاران (۳۵) نشان دادند که دزهای بیشتر از ۳۰۰ بخش در میلیون عصاره میخک در جیره‌ای که دارای نسبت برابر کنسانتره و علوفه است باعث کاهش تولید گاز، هضم حقیقی ماده خشک و ماده آلی در آزمایش تولید گاز می‌شود. در تضاد با این نتایج و نتایج مطالعه حاضر، کاستیلجنوس و همکاران (۹) نشان دادند که استفاده از عصاره میخک در جیره‌ای با نسبت کنسانتره به علوفه ۹۰ به ۱۰ باعث افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار به مقدار ۵۲/۳-۳۲/۸ درصد می‌شود.

ریقی و همکاران (۳۳) با بررسی استفاده از ماده موثره مرزه

بر لیتر) غلظت نیتروژن آمونیاکی را شدیداً کاهش دادند ولی این نتیجه در مقادیر متوسط (۳۰۰ میلی گرم در لیتر) کمتر و در مقادیر کمتر (۳ میلی گرم در لیتر) مشاهده نشد.

کاهش غلظت آمونیاک در تیمارهای حاوی برخی از گیاهان دارویی در مقایسه با خوراک پایه ممکن است به دلیل مهار باکتری‌های تجزیه کننده پروتئین توسط مواد موثره موجود در گیاهان دارویی و در نتیجه کاهش تجزیه پروتئین در شکمبه باشد و یا اثر منفی مواد موثره موجود در گیاهان دارویی بر باکتری‌های تولید کننده آمونیاک با توان بالا باشد که موجب کاهش تولید آمونیاک در شکمبه می‌شود. همچنین کاهش پروتوزا و کاهش بلعیده شدن باکتری‌ها توسط آنها نیز می‌تواند از دیگر دلایل کاهش آمونیاک باشد (۵).

نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از اسانس میخک باعث کاهش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شد اما اسانس مرزه تأثیری بر مقدار تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار اسیدهای چرب فرار نداشت. در این مطالعه وجود این اثرات همکوشی استفاده همزمان از دو اسانس مرزه و میخک بر کاهش تولید گاز مشاهده شد و در نتیجه اثرات همکوشی اسانس‌ها در مطالعات باید مورد توجه قرار گیرد. بنابراین برای مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود تأثیر اسانس‌ها به همراه منابع مختلف انرژی همانند پکتین، نشاسته و منابع مختلف پروتئینی در شرایط برون تنی و درون تنی مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین توجه به تغییرات دیگر تولیدات تخمیری همانند نیتروژن آمونیاکی، متان و ترکیب جمعیت میکروبی در این آزمایشات نیز می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد.

مقدار بالای نیتروژن آمونیاکی ارتباط داشته باشد (۲).

در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است که افزودن گیاهان دارویی در شرایط مطلوب، موجب کاهش غلظت آمونیاک موجود در شیرابه شکمبه می‌شود. شرایط مطلوب از این حیث مطرح است که فاکتورهای مانند ترکیب شیمیایی و دوز مصرف ترکیبات فعال می‌تواند بر متابولیسم نیتروژن در شکمبه اثر گذار باشد. ترکیبات موثر متفاوت، آثار متفاوتی بر متابولیسم نیتروژن دارد (۵). طلا تپه و همکاران (۳۸) نیز نشان دادند که افزودن سطح ۲۰۰ میلی گرم اسانس مرزه باعث کاهش معنی داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه بزغالها شد، بطوری که بیشترین مقدار مربوط به سطح ۲۰۰ میلی گرم اسانس مرزه بود. مک اینتاش و همکاران (۲۵) گزارش دادند که مخلوطی از اسانسهای گیاهی می‌تواند رشد سویه‌هایی از باکتری‌هایی که مقدار زیادی نیتروژن آمونیاکی تولید می‌کنند (مانند کلاستریدیوم استیکلانندی و پیتواسترپتوکوکوس انثروبیوس) را محدود کرده، در حالی که همزمان تأثیری بر رشد برخی دیگر از باکتری‌های این دسته نظیر کلاستریدیوم آمینوفیلوم ایجاد نمی‌کنند. انتقال اسیدهای آمینه به درون سلول باکتری از طریق نیروی محرک پروتون- سدیم صورت می‌گیرد (۱۱) یکی از سازو کارهای پیشنهاد شده برای عمل کارواکرول و تیمول، آسیب به غشاء سلول باکتری و اختلال در کارکرد نیروی محرک پروتون-سدیم^۱ می‌باشد که باعث از بین رفتن باکتری‌های تولید کننده آمونیاک می‌شود (۴). باسکویت و همکاران (۵) نشان داده‌اند که برخی از اسانس‌ها (اسانس رازیانه، روغن کادتی، اسانس فلفل سبز، اسانس دارچین، اسانس دارچین، اسانس میخک، اسانس مرزه، اسانس پونه، اسانس شوید، اسانس سیر، اسانس زنجبیل و روغن درخت چای) و ترکیبات اصلی آنها (انتول، سیلیکات، کارواکرول، تیمول، اوژینول و کاروون) در مقادیر بالا (۳۰۰ میلی گرم

منابع

1. Akhtar, M. S., B. Degaga, and T. Azam. 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review, *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2 (1): 1-7.
2. Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister, and K.A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145:209-228.
3. Bromand, M. A., M. Sharifi, Gh. Irajani, F. Shahcheraghi, B. Valizadeh, M. Rahbar, F. Fllah, F. RashedMarandi, and M. Sarimi. 2012. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seda, Tehran, Iran (In Persian).
4. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
5. Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761-771.
6. Calsamiglia, S., L. Castillejos, and M. Busquet. 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. Pages 129-167 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham University

- Press, Nottingham, UK.
7. Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90:2580–2595.
8. Cardozo, P.W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83:2572–2579.
9. Castillejos, L., S. Calsamiglia, J. Martín-Tereso, and H. TerWijlen. 2008. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*, 145:259-270.
10. Chandrasekharaiah, M., A. Thulasi, and L. Jose. 2015. Effect of Supplementation of Different Essential Oils on in-Vitro Methanogenesis, Fermentation and Digestibility of Finger millet straw based Diet in Rumen Liquor of Crossbred Cattle. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6 (2): 480-486.
11. Chen, G., C. J. Sniffen, and J. B. Russell. 1987. Concentration and estimated flow of peptides from the rumen of dairy cattle: Effects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *Journal of Dairy Science*. 70:983–992.
12. Dorman, H J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
13. Dehority, B.A. 2003. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
14. Eschenlauer, S.C. P., N. Mckain, N. D. Walker, N. R. McEwan, C. J. Newbold, and R. J. Wallace . 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen .*Applied Environmental Microbiology*, 68: 4925-4931.
15. Gershenzon, J., and R. Croteau. 1991. Terpenoids. Pages 165–219 in *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Vol. 1. G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic Press, San Diego, CA.
16. Getachew, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *Journal of Agricultural Science*, 139(3): 341-352.
17. Griffin, S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham, and D.N. Leach. 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 322-332.
18. Günal, M., B. Pinski, and A. A. AbuGhazaleh. 2017. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under in vitro conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 16(3): 500-506.
19. Halimi Shabestari, A., R. Salamat doustnobar, and N. Maheri-Sis. 2011. Evaluation Effects of Clove Methanol Extract on Methane Production in the in vitro Condition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (12): 1154-1157.
20. Hart, K. J., D. R. Yanez-Ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, and C. J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 8-35.
21. Jahani-Azizabadi, H., M. DaneshMesgaran, A. R. Vakili, and K. Rezayazdi. 2014. Effect of some plant essential oils on *in vitro* ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16: 1543-1554.
22. Lee, S. S., J. K. Ha, and K. J. Cheng. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3807 – 3813.
23. Macheboeuf, D., D.P.Morgavi, Y.Papon, J.L.Mousset, M.Arturo-Schaan. 2008. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 335–350.
24. Mateos, I., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, C. Kemal, and M. D. Carro. 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate in vitro ruminal fermentation and methane production. *Animal Production Science*, 53: 299-307.
25. McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:5011–5014.
26. Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28(3): 7-55.
27. Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal of Agricultural Science*, 92: 217–222.
28. Momeni, T. K., and N. Shahrokhi. 1998. Essential oils and their therapeutic actions. Tehran University Press (In Persian).

29. Moree, L.V., J. L. Johnson, and W. E. C. Moree. 1986. Genus *Peptococcus* Kluyver and Van Neil 1936, 400AL , pages 1082-1083, and Genus *Peptostreptococcus* Kluyver and Van Neil , pages 1083-1092 in Bergey's manual of systematic bacteriology. P. H. Sneath, N. S. Mair, E. M. Sharpe, and J G. Holt, ed. The Williams & Williams CO., Baltiore.
30. Paster, B. J., J. B. Russell, C. M. J. Yang, J. M. Chow, C. R. Woese, and R. Tanner. 1993. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. International Journal Systematic Bacteriology, 43:107-110.
31. Patra, A. K. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(5): 416-428.
32. Patra, A.K., and Z. Yu. 2012. Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. Applied Environmental Microbiology, 78: 4271-4280.
33. Righi, F., M. Simoni, A. Foskolos, V. Beretti, A. Sabbioni, and A. Quarantelli. 2017. In vitro ruminal dry matter and neutral detergent fiber digestibility of common feedstuffs as affected by the addition of essential oils and their active compounds. Journal of Animal and Feed Sciences, 26: 204-212.
34. Rofiq, M. N., S. Martono, M. Görgülü, and M. Boga. 2012. Combination Effect of Clove and Cinnamon Oil on in Vitro Rumen Gas and Methane Production. Proceeding of the 2nd International Seminar on Animal Industry, Jakarta, 431-437.
35. Roy, D., S. K. Tomar, S. K. Sirohi, V. Kumar, and M. Kumar. 2014. Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation in vitro using buffalo rumen liquor. Veterinary World, 7: 213-218.
36. Russell, J. B., H. J. Strobel, and G. Chen. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. Applied and Environmental Microbiology, 54: 872-877.
37. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
38. Talatapeh, A., P. Farhoomand, Y. A. Alijoo, M. Ghaderzadeh, and E. Norouzi. 2013. Effects of Summer Savory essential oil with two types of diets on performance, rumen fermentation and blood parameters of West Azerbaijan native kids. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi), 102: 71-80 (In Persian).
39. Wallace, R. J., N. R. McEwan, F. M. McIntosh, B. Teferedegne, and C. J. Newbold. 2002. Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 10: 1458-1468.
40. Zhang, Y., W. Gao, and Q. Meng. 2007. Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fiber particle size. Archives of Animal Nutrition, 61(2): 114-125.



Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on *Peptostreptococcus anaerobius* bacteria isolated from rumen

Hojat Imani Moghadam¹, Samaneh Ghasemi², Saeid Sobhanirad^{3*}, Mehdi Behgar⁴

Submitted: 27-06-2018

Accepted: 04-11-2020

Imani Moghadam, H., S. Ghasemi, S. Sobhanirad, and M. Behgar. 2021. Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on *Peptostreptococcus anaerobius* bacteria isolated from rumen. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3): 335-349.

Introduction Since the legislation of European Union has prohibited the use of growth-promoting antibiotics such as monensin, scientists have been interested in alternatives to manipulate rumen fermentation. The use of growth-promoting antibiotics in animal feeds is banned in Europe due to potential risks such as the spread of antibiotic resistance genes or the contamination of milk or meat with antibiotic residues. Recently, essential oils have been increasingly evaluated to replace or facilitate reductions in the use of antibiotics. The most effects of plant essential oils, especially cloves and savory oils, are their antioxidant effects and their effects on the metabolism of ruminal microbes. The antiprotozoal effects of clove extract have been proven in the studies in vitro by gas production technique. Few studies have been done on the effects of clove oil, especially the savory oil, on the digestive properties in the country. Also, no study was found on the interactions of these essential oils in the experiments in vitro. Thus, the aim of this study was investigated to evaluate the effects of clove and savory oils on gas production and in vitro fermentation process and estimation of gas production parameters of feedstuffs (alfalfa hay and barley grain).

Materials and Methods Experimental treatments were included control (basal feeds without additive), basal feeds supplemented with three levels of clove oil (0, 250, 500 mg) and three levels of savory oil (0, 250, 500 mg) per kg of DM in a rumen culture. Ruminal fluid was collected from two fistulated sheep (49.5±2.5 kg). All samples isolated from the rumen were withdrawn 2 h after the morning ration had been consumed. Collected rumen contents were strained through four layers of cheesecloth and brought immediately to the laboratory. Gas production technique was used to detect the fermentation parameters of the treatments. About 200 mg of basal diet (alfalfa hay and barley grain, 1:1, with clove and savory oils) were incubated in 100ml glass syringes and 30ml of incubation liquid were added and were incubated in 39 C° water bath. The gas production was measured in 2, 4, 6, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120h. Three parallel syringes of each treatment were prepared in this experiment in a completely randomized design in a factorial arrangement. They were used to measure the gas production parameters (fermentable fraction (b) and rate (c) of gas production) cumulative gas production, organic digestibility and metabolizable energy of treatments until 120 h. In the present study, digestible organic matter, metabolizable energy, and production of volatile fatty acids were estimated based on the presented equations. In the second experiment, *Peptostreptococcus anaerobic* was isolated from the ruminal fluid, cultured in the medium of BAAA (Bile EsculinAzideAgar), and evaluated by different levels of cloves and fennel essences in a randomized complete design with sixteen treatments and three replicates using Duncan test at level 0.05. Experimental levels in this experiment including: 20, 35 and 40 µl of cloves essence, 20, 35 and 40

1- M.Sc. Graduate, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2- Assistant professor, Department of Agriculture, Faculty of Shahryar, Tehran branch, Technical and Vocational University, Tehran

3- Assistant professor, Department of Agricultural Science, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

4- Associated professor, Nuclear Science & Technology Research Institute, Karaj, Iran.

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

DOI: 10.22067/ijasr.v13i3.73987

μl of fennel essence, 20 μl of fennel essence + 20 μl of cloves essence, 20 μl of fennel essence + 35 μl of cloves essence, 20 μl of fennel essence + 40 μl of cloves essence, 35 μl of fennel essence + 20 μl of cloves essence, 35 μl of fennel essence + 350 μl of cloves essence, 35 μl of fennel essence + 40 μl of cloves essence, 40 μl of fennel essence + 20 μl of cloves essence, 40 μl of fennel essence + 35 μl of cloves essence, 40 μl of fennel essence + 40 μl of cloves essence, control. Statistical analysis of data was performed by SAS statistical software (9.1 version). Duncan's multiple test range was conducted in level 5%.

Results and Discussion High levels of savory oil were increased gas production in the first hours ($p < 0.05$), but clove oil was reduced gas production in 8-24 hours ($p < 0.05$). Although, few data have been published on the interaction effects of the use of the essential oils, as well as on the effects of savory oil on fermentation parameters. The amount of gas production (b) tend to be decreased ($P = 0.06$) due to the simultaneous use of savory and clove oils. Different levels of savory oil had no effect on estimated organic matter digestibility, metabolizable energy, and volatile fatty acids. But, with increasing the levels of clove oil, the amount of estimated organic matter digestibility, metabolizable energy tend to be decreased ($P = 0.09$). In the microbial experiment, after incubation of peptostreptococcus anaerobic in medium of Bile AesculinAzide Agar and adding different levels of cloves and fennel essences was observed that all levels of treatments were significant ($P < 0.05$); the highest growth of bacteria was related to treatment 11 (35 μl of fennel essence + 350 μl of cloves essence). This result showed ammonia-producing bacteria known peptostreptococcus anaerobic is inhibiting by different levels of clove and savory essences and finally resulting in the decrease of rumen fluid Ammonia nitrogen.

Conclusion According to our results we can conclude that using savory oil improves ruminal fermentation in vitro and with increasing the levels of savory oil, the amount of gas production, the organic matter digestibility, the metabolizable energy and volatile fatty acids concentration were decreased. Also in this study, were shown the co-effects of simultaneous use of savory and clove oils on the reduction of gas production. Therefore the effects of essential oils should be considered. For further studies, it is suggested that the effect of essential oils along with various sources of energy, such as pectin, starch, and various protein sources, should be studied in vitro and in vivo. Also, consideration of other changes in fermentation products such as ammonia nitrogen, methane and the composition of the microbial population in these experiments can also be of particular importance.

Key words: clove oil, savory oil, gas production, volatile fatty acid, Peptostreptococcus anaerobic.



مقاله علمی - پژوهشی

اثر پودر مومیایی و عصاره علف هیضه بر عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده باریک جوجه گوشتی

فائزه احمدزاده^۱، سید جواد حسینی واشان^{۱*}، نظر افضلی^۱، علی اله رسانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۲

احمدزاده، ف.، س. ج. حسینی واشان، ن. افضلی، و ع. اله رسانی. ۱۴۰۰. اثر پودر مومیایی و عصاره علف هیضه بر عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده باریک جوجه گوشتی. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۵۱-۳۶۸.

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده باریک جوجه گوشتی تغذیه شده با پودر مومیایی و عصاره علف هیضه (کک‌کش بیابانی) انجام پذیرفت. برای اجرای آزمایش تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه یک‌روزه نر سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به شکل فاکتوریل ۳×۳ شامل سه سطح عصاره علف‌هیضه (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و سه سطح مومیایی (۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آب) در ۹ تیمار، ۳ تکرار و ۱۰ پرند در هر تکرار توزیع شدند. تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره علف‌هیضه و ۲۰ میلی‌گرم مومیایی سبب افزایش وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با شاهد شدند ($P < 0.05$)، هر دو سطح اصلی مومیایی باعث افزایش راندمان لاشه و وزن نسبی سینه نسبت به شاهد گردید ($P < 0.05$)، هر دو سطح اصلی، مومیایی و علف‌هیضه باعث افزایش وزن نسبی کبد، صفرا، قلب، طحال و بورس در مقایسه با شاهد شدند، سطح ۲۰۰ میلی‌گرم علف‌هیضه باعث کاهش چربی بطنی در مقایسه با شاهد شد ($P < 0.05$). تیمار حاوی ۴۰ میلی‌گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره علف‌هیضه باعث کاهش غلظت لیپوپروتئین کم چگال، کلسترول و فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز خون در مقایسه با شاهد گردید ($P < 0.05$)، ولی بر غلظت لیپوپروتئین با چگالی بالا و تری‌گلیسرید خون، پروتئین تام و آلبومین خون اثر نداشتند. تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم علف‌هیضه با ۲۰ میلی‌گرم مومیایی و تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم علف‌هیضه و ۴۰ میلی‌گرم مومیایی در مقایسه با شاهد باعث افزایش عیار پادتن تام و ایمینوگلوبین M و G علیه گلبول قرمز گوسفندی شدند ($P < 0.05$). ارتفاع پرز و سطح جذب در تیمارهای تغذیه شده با مومیایی و عصاره علف‌هیضه در مقایسه با شاهد بالاتر بود. این یافته‌ها نشان داد افزودن مومیایی و عصاره علف‌هیضه بترتیب در سطوح ۲۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم باعث بهبود عملکرد رشد و کاهش چربی بطنی، کلسترول و فعالیت آنزیم‌های کبدی و ریخت شناسی روده جوجه‌های گوشتی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ارتفاع پرز، آنزیم آلانین ترانسفراز، تری‌گلیسرید، شاخص تولید، عیار پادتن.

مقدمه

با ارتقای این شاخص‌ها در گله، هزینه تولید محصولات شامل گوشت و تخم مرغ کاهش یابد (۲۰). از گذشتۀ دور از پادزیست‌های محرک رشد در جیره غذایی طیور در جهت افزایش سلامت روده، قابلیت استفاده از مواد غذایی و کاهش ضریب تبدیل خوراک استفاده می‌شده است (۴۴). امروزه با مشخص شدن اثرات سوء جانبی این ترکیبات

راندمان مصرف خوراک و سلامت گله دو اصل مهم در صنعت پرورش طیور محسوب می‌شوند، بنابراین افزایش راندمان خوراک مصرفی، بهبود عملکرد و سامانه ایمنی از اهمیت زیادی برخوردارند تا

گردن در بلدرچین‌های ژاپنی در حال رشد می‌شود (۲۳). در مطالعه‌ای در زمینه استفاده از علف هیضه در آب آشامیدنی جوجه گوشتی گزارش گردید استفاده از علف هیضه در سطح ۷/۵ گرم در لیتر باعث افزایش وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با شاهد در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی شد (۲۷). استفاده از پودر علف هیضه تا سطح ۰/۳ درصد در جوجه گوشتی نشان داد که استفاده از پودر علف هیضه در سطح ۰/۳ درصد باعث افزایش وزن بدن، کاهش ضریب تبدیل خوراک، افزایش ارتفاع پرز، افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز و کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید در خون، کبد و گوشت ران جوجه گوشتی شد از طرف دیگر پودر علف هیضه در سطح ۰/۳ درصد باعث افزایش اسیدهای چرب غیراشباع و اسیدهای چرب امگا-۳ گوشت جوجه گوشتی گردید و این محققین بیان کردند می‌توان از پودر علف هیضه بعنوان جایگزین ترکیبات پادزیست محرک رشد در جیره جوجه گوشتی استفاده نمود (۴۱). استفاده از عصاره اکالیپتوس که دارای ماده موثره غالب مشابه علف هیضه (۸۰ سینئول) است باعث بهبود عملکرد، کیفیت لاشه و ترکیب اسیدهای چرب گوشت جوجه گوشتی گردید (۱۱).

مومیایی، ترکیبی هیدروکربنی قهوه‌ای یا سیاه رنگ و نیمه جامد است که در نتیجه اکسایش هیدروکربن‌های نفتی در شکاف‌های زمین و در بعضی غارها که در مجاورت ذخایر نفتی هستند، یافت می‌شود در ترکیب این ماده کربن، اکسیژن، ازت و گوگرد وجود دارد (۶). مومیایی شامل فسفر، هیدروژن، نیتروژن، کربن، گوگرد، هالوژن‌ها و عناصر فلزی است (۳۴). مواد موثره غالب شناسایی شده در مومیایی شامل اسید بنزوئیک، اسید هیپوریک، اسیدهای چرب، صمغ، مواد موم مانند، رزین، آلومینویدها و مواد گیاهی که اسید بنزوئیک جز فعال آنها می‌باشند (۷ و ۱۸). عملکرد فیزیولوژیکی اصلی مومیایی به دلیل حضور ترکیبات دی بنزوآلفا-پیرون بیواکتیو، اسید هیومیک و اسید فولیک است. اضافه کردن گوگرد معدنی (سولفات سدیم) به جیره بر پایه ذرت-کنجاله سویا با انرژی بالا باعث افزایش وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل خوراک شد (۱۰). طیور نسبت به سایر حیوانات مزرعه به کمبود فولاسیون حساس‌تر به نظر می‌رسند. کمبود اسید فولیک باعث کندی رشد، پردرآوری، کم خونی و پروسیس می‌شود. با پیشرفت کم خونی، تاج سفید رنگ و غشاهای مخاطی دهان زرد کم رنگ می‌شوند (۴۲). کمبود اسید فولیک باعث کاهش وزن بدن، راندمان خوراک، افزایش مرگ و میر و ضعف پاها و فلجی گردن در بلدرچین‌های ژاپنی در حال رشد می‌شود (۲۳). فلانوئیدها خاصیت محرک پاسخ ایمنی و ضد فساد دارند (۳۷). بررسی مطالعات پیشین نشان می‌دهد که میزان مطالعات در زمینه استفاده از علف هیضه و مومیایی در جیره طیور بسیار محدود است. بنابراین هدف از این پژوهش ارزیابی عملکرد رشد، سامانه ایمنی و ریخت شناسی روده

شیمیایی از جمله باقیمانده این داروها در گوشت و فرآورده‌های خوراکی که می‌توانند باعث بروز عوارض نامطلوبی همچون سرطان‌زایی، جهش‌زایی، ناقص الخلقه‌زایی، واکنش حساسیتی و مقاومت دارویی در انسان شوند نگرانی‌های در مورد استفاده از آن‌ها ایجاد نموده است. علاوه بر این گزارش شده است، بیش از ۷۰ درصد پادزیست‌ها و بقایای دارویی همانند پاتوژن‌ها برای سلامت انسان مضر هستند (۳). امروزه به دلیل افزایش مقاومت باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا، استفاده از جایگزین‌های طبیعی همانند گیاهان دارویی افزایش پیدا کرده است (۲۸). گیاهان دارویی به علت خواص درمانی و عوارض جانبی پایین جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی محسوب می‌شوند. داروهای گیاهی با اثر ضد میکروبی و تقویت کننده دستگاه گوارش نقش موثری در کاهش هزینه‌های تولید و مقاومت باکتریایی در خوراک دام و طیور دارند (۳۹). گیاه کک‌کش بیابانی با نام علمی *Pulicaria gnaphalodes* متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) است نام قدیمی کک‌کش بیابانی، علف هیضه است که تاکنون بالغ بر صد گونه از این جنس در جهان و پنج گونه در ایران شناسایی شده‌اند (۱). کک‌کش بیابانی، گیاهی علفی، چندساله، دارای ساقه راست، برگ‌های متراکم و دارای میوه‌ی فندقه است، روی‌شگاه آن اغلب کنار جاده‌ها، اراضی تخریب شده، بستر خشکه رودهای ناحیه ایرانی-تورانی، ارتفاعات کوهستانی نواحی خشک و نیمه خشک کشور آنتشار یافته است امروزه در اکثر عطاری‌ها بعنوان گیاه دارویی برای درمان گرم‌زدگی معرفی می‌شود (۱ و ۲۶). عصاره‌ی این گیاه سرشار از ترکیبات فنلی بوده و از خاصیت پاداکسندگی بالایی برخوردار است، بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک منبع گیاهی حاوی ترکیبات پاداکسند در صنعت غذا و دارو استفاده کرد. آزمایش‌های فیتوشیمی وجود ترکیباتی مانند آلکالوئید، آنتوسیانین، تانن و فلاونوئید را در عصاره‌ی الکلی (اتانولی و متانولی) کک‌کش بیابانی تأیید نمود (۳۹). فلاونوئیدهای مترشحه از گیاه کک‌کش بیابانی از کوئرستین و مشتقات آن تشکیل شده‌اند (۴۷). براساس تحقیقات انجام شده ۳۶ ترکیب شیمیایی در اساس گیاه کک‌کش بیابانی شناسایی شده است. بیشترین مواد موثره کک‌کش بیابانی را ۸، ۱-سینئول (۲۲/۹۳ درصد)، آلفا پینن (۸/۱۳ درصد)، آمورفا-۹، ۴دی ان-۲-ال (۸/۳۶ درصد)، میرتینول (۷/۲۴ درصد) تشکیل می‌دهند (۱۶ و ۱۷). کوئرستین و مشتقات آن فلاونوئیدهای اصلی موجود در گیاه کک‌کش بیابانی هستند. ماده موثره غالب علف هیضه و اکالیپتوس مشابه و ترکیب ۱ و ۸ سینئول است. کوئرستین در کاهو، کلم بروکلی، پیاز، چای، گوجه فرنگی و توت به عنوان ترکیب پاداکسند، ضد التهاب و محرک پاسخ ایمنی در جیره طیور مورد توجه قرار گرفته است (۳۳ و ۳۸). کوئرستین وقتی به جیره پرندگان اضافه می‌شود پایداری گوشت جوجه‌های گوشتی را افزایش می‌دهد (۴۶). کمبود اسید فولیک باعث کاهش وزن بدن و راندمان خوراک، افزایش مرگ و میر و ضعف پاها و فلجی

منطقه خراسان جنوبی عرضه می شود. علف هیضه پس از خشک کردن به روش سایه خشک، ساقه، و برگ به صورت مخلوط آسیاب شد سپس کک کش بیابانی و آب به نسبت ۱ به ۵ با هم ترکیب و به مدت ۷۲ ساعت توسط دستگاه همزن مخلوط گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت مواد داخل ظرف توسط کاغذ صافی، صاف شد و محلول بدست آمده به صورت دستی و روزانه به جیره طیور اضافه گردید (۴۰). مومیایی هم به صورت روزانه به میزان مورد نیاز توزین و در آب مصرفی مخلوط می گردید.

مقادیر فنول تام با روش فولین سیو— کالتیو اندازه گیری شد (۳۱) و میزان محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگس نجی ارزیابی شد (۲). میزان ترکیبات فنل و فلاونوئید موجود در پودر مومیایی و عصاره علف هیضه در جدول ۱ ارائه شده است.

باریک جوجه گوشتی تغذیه شده با پودر مومیایی و عصاره کک کش بیابانی بود.

مواد و روش ها

در این تحقیق، از ۳۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه نر سویه راس (۳۰۸) در یک دوره پرورش ۴۲ روزه استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به شکل فاکتوریل ۳×۳ شامل سه سطح عصاره علف هیضه (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره) و سه سطح مومیایی (۰، ۲۰، ۴۰ میلی لیتر در لیتر آب آشامیدنی) با ۹ تیمار ۴ تکرار و ۱۰ واحد آزمایشی در هر تکرار طراحی و اجرا شد. علف هیضه یا کک کش بیابانی و مومیایی از مراتع و نواحی کوهستانی منطقه طبس مسینای خراسان جنوبی جمع آوری شد هر دو ماده مورد آزمایش در عطاری های

جدول ۱- میزان فنل و فلاونوئید پودر مومیایی و عصاره کک کش بیابانی

Table 1- The concentration of phenol and flavonoid in *Pulicaria gnaphalodes* and mummy

	فنل (میلی گرم در کیلوگرم) Phenol (mg/kg)	فلاونوئید (میلی گرم در کیلوگرم) Flavonoid (mg/kg)
عصاره کک کش بیابانی <i>Pulicaria gnaphalodes</i>	386.03	5.51
مومیایی Mummy	23.96	0.108

آلاتین آمینوترانسفراز با استفاده از کیت های بیو شیمیایی شرکت پارس آزمون و دستگاه طیف سنجی نوری خودکار (Gesam Chem 200, Italy) تعیین شد (۲۵ و ۴۰). غلظت لیپوپروتئین کم چگال (LDL) خون با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۴):

رابطه (۱): $HDL = 0.0218 \times LDL - 0.0218 \times HDL$
کلسترول تام $= 0.0218 \times LDL$ (میلی گرم بر دسی لیتر)

به منظور بررسی وضعیت سامانه ایمنی جوجه های گوشتی، به تعداد سه قطعه پرنده از هر تکرار در سن ۱۸ روزگی ۰/۷ سی سی و در سن ۳۵ روزگی، یک سی سی گلبول قرمز گوسفندی ۱۰ درصد (SRBC) از طریق ورید بال تزریق گردید (۳۰، ۴۰) و در فاصله زمانی پس از ۷-۵ روز بعد از تزریق، از پرنده های مذکور خونگیری بعمل آمده و پاسخ ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. در زمان کشتار دو قطعه جوجه (در ۴۲ روزگی) از ناحیه ژنوم (۱۰ سانت قبل از زائده مکل)، قطعات یک سانتی متری برداشته و پس از شستشو در فرمالین (۱۰ درصد) قرار داده شد (۲۴) و پس از ۲۴ ساعت فرمالین تعویض شده و پس از تثبیت و تهیه برش مناسب، شاخص های ارتفاع پرز، عرض پرز، عمق کریپت نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت و سطح جذب تعیین شد (۱۹).

(رابطه ۲) $2\pi \times (\text{میانگین عرض پرزها}) \times (\text{میانگین طول پرزها}) = \text{سطح جذبی پرزها}$

به منظور تجزیه آماری داده ها از نرم افزار SAS ورژن ۹،۱ (۲۰۰۵)

جوجه ها در دوره ۴۲ روزه در قالب جیره سه مرحله ای آغازین (۱-۱۰ روزگی)، رشد (۱۱-۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) تغذیه شدند نیازمندی های جوجه ها در سه مرحله آغازین، رشد و پایانی بر مبنای دفترچه راهنمای راس ۳۰۸ تنظیم شد و ترکیب شیمیایی مواد خوراکی جهت متوازن نمودن جیره های از جدول های ترکیب شیمیایی مواد خوراکی (NRC) استفاده شد (جدول ۲). در دوره آزمایش، شرایط پرورشی شامل برنامه نوری، درجه حرارت و رطوبت مطابق پیشنهادات سویه راس اجرا شد. دسترسی به آب و خوراک در طی دوره آزمایش آزادانه بود. صفات عملکردی شامل مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک طی سه دوره آغازین، رشد و پایانی رکوردبرداری شدند. برای محاسبه شاخص تولید در هر دوره ابتدا مقدار افزایش وزن دوره (گرم) در درصد زنده مانده ضرب شد و بر حاصل ضرب ضریب تبدیل خوراک در طول دوره آزمایش تقسیم شد (۱۲ و ۲۳).

در پایان دوره آزمایش، دو قطعه جوجه از هر تکرار کشتار و خونگیری شده و بخش های مختلف تجزیه لاشه شد. برای اندازه گیری لاشه، پس از جدا کردن پوست و پاها، لاشه (فاقد محتویات درون شکمی) توزین شد و راندمان لاشه براساس درصدی از وزن زنده محاسبه شد. وزن نسبی اجزای لاشه شامل وزن نسبی سینه، ران، طحال، بورس فابریوس و چربی بطنی براساس درصدی از وزن زنده محاسبه شد. شاخص های خونی شامل غلظت لیپیدهای خون، پروتئین تام و میزان فعالیت آنزیم

استفاده شد. داده‌ها با استفاده از مدل عمومی (GLM) مورد آنالیز واریانس دوطرفه گرفتند. داده‌های در صد پس از تبدیل آرک سینوس مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی

در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام گرفت.

جدول ۲- اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه در طی دوره‌های آغازین، رشد و پایانی
Table 2- Ingredients and chemical composition of the basal diet used for starter, grower and finisher period

ماده خوراکی (%) Ingredients (%)	آغازین Starter	رشد Grower	پایانی Finisher
ذرت Corn	57.09	58.96	62.86
کنجاله سویا Soya bean meal	36.00	34.60	29.85
پودر ماهی Fish meal	3.45	0.00	0.00
روغن سویا Soybean oil	0.00	2.90	4.00
کربنات کلسیم Carbonate calcium	1.14	1.44	1.35
دی کلسیم فسفات DiCalcium phosphate	1.40	1.44	1.22
مکمل ویتامینه ^۱ Vitamin Premix ¹	0.25	0.25	0.25
مکمل معدنی ^۲ Mineral Premix ²	0.25	0.25	0.25
نمک Salt	0.30	0.30	0.30
دی-آل متیونین DL- Methionine	0.13	0.15	0.17
ترکیب شیمیایی مواد مغذی Chemical composition (%)			
انرژی سوخت و ساز (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolisable energy (Kcal kg)	2900	3050	3170
پروتئین خام (%) Crud protein(%)	23.00	20.50	18.75
فیبر خام (%) Crude fiber(%)	2.54	3.51	2.47
عصاره اتری (%) Ether extract (%)	2.41	5.30	6.61
لیزین (%) Lysine (%)	1.46	1.21	1.05
متیونین + سیستین (%) Methionine + cysteine(%)	0.97	0.75	0.68
کلسیم (%) Calcium(%)	1.05	1.00	0.90
فسفر قابل دسترس (%) Available phosphorus(%)	0.52	0.50	0.45

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامینه حاوی واحد ویتامین A، ۴۴۰۰۰۰۰، ۷۲۰۰۰ واحد ویتامین D، ۱۴۴۰۰ میلی گرم ویتامین E، ۲۰۰۰ میلی گرم ویتامین K، ۶۴۰ میلی گرم کوپالامین، ۶۱۲ میلی گرم ویتامین C، ۳۰۰ میلی گرم ریوفلاوین، ۲ گرم نیکوتینیک اسید؛ ۵۵ گرم اسید پانتوتینیک، ۱۲ میلی گرم پیریدوکسین.

^۲ هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۳۲ گرم اکسید منگنز، ۲۲ گرم اکسید روی، ۸ گرم اکسید مس، ۶۴۰ میلی گرم کبالت و ۸ گرم سلنیوم، ۵۰ گرم سولفات آهن، ۰/۳۲ گرم یدات سدیم، ۲۰۰ گرم کولین کلراید.

¹ Each Kg Vitamin premix contained 4400000 IU Vitamin A; 72000 IU Vitamin D3; 14400 IU Vitamin E; 2 g Vitamin K3; 612 mg Vitamin C; 300 mg Vitamin B2; 2 g Vitamin B3; 55 g Vitamin B5; ۱۲ g Vitamin B6; 1.75 g Vitamin B9; 640 mg Vitamin B12;

² Each Kg Mineral premix contained 32 mg Mn; 50 g Fe; 22 g Zn=; 8 g Cu; 0.32 g I; 8 g Selenium; 200 g; 640 mg Co; Cholin Chloride,

جدول ۳- اثر استفاده از مومیایی و عصاره علف هیضه بر صفات عملکرد رشد (گرم) جوجه گوشتی
Table 3- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on growth performance indices in broilers

	افزایش وزن				مصرف خوراک				ضریب تبدیل خوراک			
	Body weight gain (g/bird)				Feed intake (g/bird)				Feed conversion ratio			
	1-10 days	11-24 days	25-42 days	1-42 days	1-10 days	11-24 days	25-42 days	1-42 days	1-10 days	11-24 days	25-42 days	1-42 days
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم)												
Pulicaria (mg/kg)												
0	193.9	610.8	1434 ^c	2238.7 ^b	244.3	812.9	2664	3721	1.267	1.355	1.875 ^a	1.662 ^b
100	197.4	635.3	1543 ^b	2375.7 ^{ab}	242.4	834.2	2646	3723	1.335	1.327	1.720 ^b	1.567 ^b
200	196.4	645.8	1618 ^a	2460.2 ^a	241.0	831.4	2661	3733	1.234	1.300	1.648 ^b	1.518 ^b
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر)												
Mummy(mg/l)												
0	192.4	609.6	1437	2239	241.1	835.1	2652	3728	1.266	1.399	1.861 ^a	1.665 ^a
20	200.1	629.5	1589	2418.6	241.8	807.4	2665	3714	1.215	1.296	1.684 ^b	1.536 ^b
40	195.4	652.9	1568	2416.3	243.7	836.1	2654	3734	1.255	1.288	1.697 ^b	1.545 ^b
اشتباه معیار میانگین SEM	4.55	19.08	20.91	44.54	1.45	10.78	5.82	18.05	0.030	0.051	0.025 ⁴	0.035
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش												
Mummy and Pulicaria Interaction												
عصاره کک کش Pulicaria												
0	185.9	556	1273 ^c	2014.9 ^b	243	830.5	2663	3737	1.310	1.535	2.097 ^a	1.854 ^a
100	203.6	670.3	1464 ^b	2337.9 ^{ab}	243.1	852.7	2642	3738	1.202	1.285	1.805 ^b	1.599 ^b
200	187.8	602.2	1575 ^{ab}	2365 ^{ab}	240.2	822.2	2652	3714	1.287	1.377	1.682 ^{bc}	1.571 ^b
0	194.8	625.8	1475 ^b	2295.6 ^b	243.1	777.7	2670	3691	1.252	1.250	1.812 ^b	1.608 ^b
100	196.2	601.4	1583 ^{ab}	2380.6 ^{ab}	240	819.4	2653	3712	1.232	1.377	1.677 ^{bc}	1.559 ^b
200	209.2	661.2	1710 ^a	2580.4 ^a	242.3	825	2672	3739	1.160	1.262	1.562 ^c	1.449 ^b
0	200.9	650.7	1554 ^{ab}	2405.6 ^{ab}	246.6	830.5	2658	3735	1.240	1.282	1.715 ^{bc}	1.553 ^b
100	192.4	634.2	1581 ^{ab}	2407.6 ^{ab}	243.9	830.5	2644	3718	1.270	1.320	1.677 ^{bc}	1.544 ^b
200	192.2	637.7	1570 ^{ab}	2399.9 ^{ab}	240.5	847.2	2660	3748	1.255	1.262	1.700 ^{bc}	1.562 ^b
SEM	7.88	33.06	36.22	45.98	2.52	18.68	10.08	15.21	0.052	0.089 ⁰	0.044 ¹	0.052
سطح معنی داری												
P-Value												
کک کش Pulicaria	0.852 ²	0.424 ⁹	0.0001	0.0214	0.301 ⁹	0.331 ⁰	0.090 ⁷	0.452 ¹	0.6779	0.753 ⁴	0.000 ¹	0.002 ⁴
مومیایی Mummy	0.494 ⁸	0.293 ³	0.0001	0.1342	0.629 ⁴	0.120 ⁹	0.242 ³	0.328 ⁷	0.4590	0.254 ³	0.000 ¹	0.003 ⁷
اثر تقابل مومیایی و عصاره کک کش Pulicaria*mummy	0.266 ⁵	0.187 ⁷	0.0071	0.0421	0.720 ⁴	0.495 ⁴	0.966 ⁴	0.624 ¹	0.5006	0.321 ⁸	0.002 ⁴	0.004 ⁸

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

نتایج و بحث

تغذیه شده با سطح ۲۰ میلی گرم مومیایی + ۲۰۰ میلی گرم کک کش در مقایسه با گروه شاهد بود.

داده‌های مرتبط با اثر مومیایی و عصاره علف هیضه بر شاخص تولید جوجه گوشتی در جدول ۴ ارائه شده است. تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که اثرات متقابل پودر مومیایی و عصاره علف هیضه بطور معنی‌داری باعث افزایش شاخص تولید در هر سه دوره رشد، پایانی و کل دوره در مقایسه با شاهد شد ($P < 0.05$). در قسمت اثرات اصلی نیز سطوح عصاره علف هیضه و یا پودر مومیایی در مقایسه با شاهد باعث افزایش شاخص تولید شدند.

تأثیر افزودن پودر مومیایی و عصاره علف هیضه بر افزایش وزن بدن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ ارائه شده است. صفات عملکردی شامل مصرف خوراک، افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک در سه دوره آغازین، رشد و پایانی تحت تأثیر اثرات متقابل پودر مومیایی و عصاره کک کش بیابانی قرار نگرفت بجز شاخص افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک که در دوره پایانی و در کل دوره تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت ($P < 0.05$). بیشترین میزان افزایش وزن در جوجه‌های

جدول ۴- اثر استفاده از مومیایی و عصاره علف هیضه بر شاخص تولید جوجه گوشتی
Table 4- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on production index in broilers

	11-24 days	25-42 days	1-42 days
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم) Pulicaria (mg/kg)			
0	3.207 ^b	4.249 ^b	3.219
100	3.609 ^a	4.984 ^a	3.419
200	3. 859 ^a	5. 454 ^a	3.548
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر) Mummy(mg/l)			
0	3.202 ^b	4.289 ^b	3.112 ^b
20	3.750 ^a	5.242 ^a	3.469 ^a
40	3.724 ^a	5.133 ^a	3.621 ^a
اشتباه معیار میانگین SEM	0.117	0.241	0.094
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش Mummy and Pulicaria Interaction			
مومیایی	عصاره کک کش		
Mummy	Pulicaria		
0	0	2.587 ^b	3.372 ^c
0	100	3.481 ^{ab}	4.506 ^b
0	200	3.584 ^{ab}	5.202 ^{ab}
20	0	3.399 ^{ab}	4.522 ^b
20	100	3.635 ^{ab}	5.244 ^{ab}
20	200	4.240 ^a	6.082 ^a
40	0	3.688 ^{ab}	5.034 ^{ab}
40	100	3.713 ^{ab}	5.237 ^{ab}
40	200	3.658 ^{ab}	5.130 ^b
اشتباه معیار میانگین SEM	0.3635	0.443	0.214
سطح معنی داری P-Value			
کک کش Pulicaria	0.0245	0.0362	0.0634
مومیایی Mummy	0.0327	0.0456	0.0471
اثر تقابل مومیایی و عصاره کک کش Pulicaria*mummy	0.0139	0.0143	0.0398

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

پری بیوتیک‌ها باعث افزایش وزن نسبی ران و وزن نسبی سینه و افزایش راندمان لاشه می‌شود. بر اساس یافته‌های نجفی (۲۷)، عصاره علف هیضه نسبت به شاهد نتوانست بر وزن نسبی قلب اثرگذار باشد. افزودن کوثرستین به جیره جوجه‌های گوشتی باعث افزایش وزن نسبی قلب گردید (۸). بنابراین استفاده از پودر مومیایی و عصاره کک کش بیابانی می‌تواند به بهبود کیفیت لاشه جوجه گوشتی کمک نماید.

وزن نسبی بورس فابریسیوس و طحال (جدول ۶) در پایان دوره در بین تیمارهای آزمایشی افزایش نشان داد ($P < 0.05$) بطوری که در گروه تغذیه شده با سطح ۴۰ میلی گرم مومیایی و ۱۰۰ میلی گرم عصاره کک کش در مقایسه با شاهد وزن نسبی طحال و بورس بالاتر بود.

داده‌های مرتبط با اثر مومیایی و عصاره کک کش بیابانی بر پاسخ ایمنی در جدول (۷) ارائه شده داد عیار پادتن تام و ایموگلوبین M بر ضد SRBC در جوجه‌هایی که با سطح ۲۰ میلی گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی گرم عصاره کک کش یا ۴۰ میلی گرم مومیایی و صفر کک کش تغذیه شده بودند در مقایسه با شاهد بالاتر بود ($P < 0.05$). افزایش وزن نسبی اندام‌های لمفوئیدی به عنوان نشانه‌ای از پیشرفت سامانه ایمنی است (۱۵). پاندی و همکاران (۳۲) گزارش کردند مصرف مکمل کوثرستین در خوراک طیور باعث افزایش وزن نسبی بورس فابریسیوس و تیموس می‌شود. بنابراین در بخش اثرات متقابل عصاره کک کش و پودر مومیایی، سطح ۴۰ مومیایی و ۱۰۰ عصاره باعث بهبود وزن نسبی اندام‌های لمفاوی گردید. نجفی (۲۷) گزارش کرد عصاره آبی علف هیضه (کک کش بیابانی) افزوده شده به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی در هیچ یک از سطوح بر عیار پادتن تام و عیار IgM و IgG بر ضد SRBC نداشت. عصاره گلپر و سیر که دارای میزان زیادی کوثرستین می‌باشند سبب ایمنی هومورال در موش شد (۵) که با یافته‌های مطالعه حاضر در بهبود پاسخ ایمنی و افزایش وزن نسبی اندام‌های لمفاوی مطابقت دارد.

اثرات استفاده از جیره‌های آزمایشی بر ریخت شناسی ژژنوم جوجه‌های گوشتی در جدول (۸) ارائه شده است. ارتفاع پرز در ناحیه ژژنوم تحت تاثیر اثرات متقابل پودر مومیایی و عصاره کک کش قرار گرفت بطوری که ارتفاع پرز در پرندگان تغذیه شده با سطح ۴۰ میلی گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی گرم عصاره کک کش در مقایسه با شاهد بالاتر بود و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت و سطح جذب در پرندگان تغذیه شده با ۲۰ میلی گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی گرم عصاره کک کش در مقایسه با شاهد بالاتر بود ($P < 0.05$).

یافته‌های عملکردی و شاخص تولید نشان داد استفاده از ترکیبات آزمایشی باعث بهبود صفات عملکردی جوجه گوشتی گردید. مومیایی دارای در صد قابل توجهی از ترکیبات اسید بنزوئیک، اسید هیومیک و اسید فولیک، اسیدهای چرب، انولین و رزین‌ها است که این ترکیبات بویژه انولین، اسید فولیک و اسید هیومیک بعنوان ترکیبات محرک رشد شناخته می‌شوند (۴۵)، ترکیبات اسیدی موجود در مومیایی احتمالاً باعث کاهش اسیدیته محیط گوارشی و افزایش فعالیت جمعیت میکروبی اسید دوست آن و در نهایت افزایش گوارش پذیری مواد مغذی (پروتئین و چربی) و بهبود افزایش وزن بدن می‌شود (۱۷). بطور مشابه گزارش شده است استفاده از پودر علف هیضه در جیره جوجه گوشتی باعث افزایش وزن بالاتر و کاهش ضریب تبدیل خوراک می‌شود (۲۷ و ۴۲). از طرف دیگر، گیاهان خانواده کاسنی مانند کک کش بیابانی انرژی را به صورت فروکتان اینولین ذخیره می‌کنند، اینولین در جیره طیور نقش پری بیوتیکی داشته و باعث بهبود محیط روده می‌گردد بهبود محیط روده باعث بالا رفتن پاسخ ایمنی و عملکرد رشد می‌شود. کک کش بیابانی به علت خاصیت پاداکسندگی قوی که ناشی از ترکیبات پلی فنلی به خصوص کوثرستین است توان خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و کاهش ضریب تبدیل خوراک را دارد (۲۷، ۴۸).

اثر استفاده از پودر مومیایی و عصاره آبی علف هیضه بر راندمان لاشه و وزن نسبی اجزای لاشه جوجه‌های گوشتی در جدول (۵) ارائه شده است اثر متقابل پودر مومیایی و عصاره علف هیضه بر راندمان لاشه و وزن نسبی اجزای لاشه اثر نداشت. در بخش اثرات اصلی مومیایی باعث افزایش راندمان لاشه و وزن نسبی سینه نسبت به شاهد شد ($P < 0.05$). میانگین وزن نسبی قلب و صفرا تحت تاثیر اثرات متقابل پودر مومیایی و عصاره علف هیضه قرار گرفت و در سطح صفر، کمترین وزن نسبی قلب و صفرا مشاهده شد و تیمار حاوی ۴۰ میلی گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی گرم کک کش بیابانی دارای بیشترین وزن نسبی صفرا و قلب در مقایسه با شاهد بودند.

استفاده از عصاره علف هیضه در جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش چربی بطنی در مقایسه با شاهد گردید ($P < 0.05$). استفاده از پودر علف هیضه یا عصاره آویشن باغی نیز باعث کاهش چربی بطنی گردید (۱۱ و ۴۲). کاهش چربی بطنی در پرندگان تغذیه شده با عصاره کک کش را می‌توان به اثر آن بر کورتیکوسترون خون نسبت داد. افزودن ترکیبات گلوکوکورتیکوئیدی باعث پایداری انسولین و افزایش قند و تری گلیسرید خون و در نتیجه افزایش وزن نسبی چربی بطنی و کبد می‌شود (۳۴). ساکی و افتخاری (۳۵) گزارش کردند استفاده از اسید آلی به میزان یک درصد باعث بهبود کیفیت لاشه می‌گردد و

جدول ۵- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر وزن نسبی اجزای لاشه (درصدی از وزن زنده) جوجه گوشتی

Table 5- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on relative weight of carcass (% of live weight) in broilers

	راندمان لاشه Carcass	سینه Breast	ران Thigh	قلب Heart	کیسه صفرا Gall bladder	کبد Liver	چربی بطنی Abdominal fat
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم)							
Pulicaria (mg/kg)							
0	61.54	22.23	18.80	0.525 ^b	0.077 ^a	2.168 ^a	1.358 ^a
100	62.03	22.54	18.91	0.548 ^a	0.068 ^b	2.106 ^b	1.110 ^{ab}
200	61.36	21.94	18.95	0.531 ^{ab}	0.073 ^{ab}	2.122 ^{ab}	1.089 ^b
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر)							
Mummy(mg/l)							
0	60.33 ^b	21.65 ^b	18.90	0.510 ^b	0.060 ^b	2.114 ^b	1.291
20	62.33 ^a	23.00 ^a	18.70	0.334 ^{ab}	0.077 ^a	2.165 ^a	1.070
40	62.28 ^a	22.05 ^{ab}	19.07	0.561 ^a	0.081 ^a	2.117 ^b	1.182
اشتباه معیار میانگین SEM	0.4627	0.3155	0.2115	0.0141	0.0031	0.0549	0.0735
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش							
Mummy and Pulicaria Interaction							
عصاره کک کش مومیایی							
Mummy Pulicaria							
0 0	60.53	21.18	18.57	0.475	0.047 ^c	2.28	1.69 ^a
0 100	60.22	22.12	19.35	0.515	0.059 ^{bc}	1.98	1.05 ^b
0 200	62.30	21.66	18.76	0.540	0.074 ^{ab}	2.07	1.15 ^{ab}
20 0	61.79	22.80	18.56	0.548	0.078 ^{ab}	2.07	1.16 ^{ab}
20 100	62.86	23.61	18.41	0.568	0.086 ^a	2.21	1.10 ^b
20 200	62.30	22.59	19.12	0.485	0.066 ^{abc}	2.21	0.946 ^b
40 0	62.30	22.70	19.28	0.554	0.078 ^{ab}	2.15	1.21 ^{ab}
40 100	62.36	21.90	18.98	0.563	0.075 ^{ab}	2.12	1.17 ^{ab}
40 200	62.30	21.57	18.97	0.568	0.090 ^a	2.07	1.17 ^{ab}
اشتباه معیار میانگین SEM	0.7979	0.5465	0.3663	0.0244	0.0055	0.0952	0.1273
سطح معنی داری							
P-Value							
عصاره کک کش	0.5752	0.4044	0.8739	0.0034	0.0005	0.0249	0.0205
Pulicaria							
مومیایی	0.0038	0.0114	0.4567	0.0158	0.0029	0.0193	0.0980
Mummy							
کک کش * مومیایی	0.8179	0.4360	0.3295	0.0101	0.0010	0.1112	0.0951
Pulicaria*mummy							

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

جدول ۶- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر وزن نسبی اندام‌های لمفاوی (درصدی از وزن زنده) جوجه گوشتی

Table 6- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on relative weight of lymphatic organs (% of live weight) in broilers

	طحال Spleen	بورس فابریوس Burs of fabricus
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم) Pulicaria (mg/kg)		
0	0.118 ^b	0.173 ^b
100	0.147 ^a	0.204 ^a
200	0.130 ^{ab}	0.197 ^{ab}
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر) Mummy(mg/l)		
0	0.147 ^b	0.173 ^b
20	0.129 ^{ab}	0.203 ^a
40	0.119 ^a	0.198 ^{ab}
اشتباه معیار میانگین SEM	0.0063	0.0078
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش Mummy and Pulicaria Interaction		
مومیایی	عصاره کک	
Mummy	کش	
	Pulicaria	
0	0	0.139 ^b
0	100	0.175 ^{ab}
0	200	0.205 ^a
20	0	0.181 ^{ab}
20	100	0.223 ^a
20	200	0.206 ^a
40	0	0.200 ^{ab}
40	100	0.215 ^a
40	200	0.180 ^{ab}
اشتباه معیار میانگین SEM		0.0135
سطح معنی داری P-Value		
عصاره کک کش Pulicaria	0.0100	0.0125
مومیایی Mummy	0.0093	0.0127
کک کش * مومیایی Pulicaria*mummy	0.0032	0.0169

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

عملکرد رشد خواهد شد (۴۹). مرعشی سرائی و همکاران (۲۱) گزارش کردند استفاده از پری‌بیوتیک، گیاهان دارویی و اسید آلی به عنوان جایگزین پادزیست باعث افزایش ارتفاع پرز، عمق کریپت، و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در دوازدهه و ارتفاع پرز ایلئوم شد. اسیدآلی در جیره باعث افزایش ارتفاع پرز و کاهش جمعیت باکتریایی بیماری‌زا و ضخامت لایه ماهیچه‌ای می‌شود (۹). بره موم باعث افزایش ارتفاع ویلی‌های روده و افزایش سطح جذب و ظرفیت جذب مواد غذایی می‌

در مطالعات پیشین گزارش شده است استفاده از سطح ۰/۳ درصد پودر علف هیضه باعث افزایش ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در هر سه ناحیه دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم روده باریک جوجه گوشتی گردید (۴۲). پرزهای بلندتر سبب افزایش سطح جذب مواد مغذی در مجرای گوارشی می‌شوند و افزایش در نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت دارای همبستگی مثبت با جذب بهتر مواد مغذی و کاهش ترشح و دفع از دستگاه گوارش می‌شود که در نتیجه سبب افزایش

شود (۱۳). با توجه به اینکه استفاده از پودر مومیایی و عصاره کک کش از طریق افزایش طول پرزها و سطح جذب باعث افزایش فرصت جذب مواد مغذی و در نتیجه می‌تواند بهبود عملکرد جوجه گوشتی را

جدول ۷- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفندی (لگاریتم بر پایه ۲) در جوجه گوشتی

Table 7- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on antibody titer against sheep red blood cell (log 2) in broilers

		Total Antibody	IgG	IgM
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم)				
Pulicaria (mg/kg)				
0		5.83	2.25	3.58 ^b
100		6.58	2.25	4.33 ^{ab}
200		6.67	2.58	4.08 ^{ab}
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر)				
Mummy(mg/l)				
0		5.83	2.17	3.67
20		6.67	2.58	4.08
40		6.58	2.33	4.25
اشتباه معیار میانگین		0.293	0.244	0.283
SEM				
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش				
Mummy and Pulicaria Interatcion				
مومیایی	عصاره کک کش			
Mummy	Pulicaria			
0	0	4.50 ^b	1.25	3.25 ^b
0	100	6.50 ^{ab}	2.50	4.00 ^{ab}
0	200	6.50 ^{ab}	2.75	3.75 ^{ab}
20	0	5.75 ^{ab}	2.50	3.25 ^b
20	100	6.50 ^{ab}	2.50	4.00 ^{ab}
20	200	7.50 ^a	2.75	5.00 ^a
40	0	7.25 ^a	3.00	4.25 ^{ab}
40	100	6.75 ^{ab}	1.75	5.00 ^a
40	200	5.75 ^{ab}	2.25	3.50 ^{ab}
اشتباه معیار میانگین		0.507	0.417	0.360
SEM				
سطح معنی داری				
P-Value				
عصاره کک کش		0.1044	0.5351	0.0492
Pulicaria				
مومیایی		0.1044	0.4774	0.4774
Mummy				
کک کش * مومیایی		0.0066	0.493	0.0110
Pulicaria*mummy				

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

جوجه گوشتی باعث کاهش کلسترول خون شد ولی بر غلظت تری‌گلیسرید و HDL خون اثر نداشت (۴۲). بر اساس تحقیقات ناسون و کوکس (۲۹) اسید فولیک باعث کاهش غلظت کلسترول و LDL خون می‌شود. مصدق و همکاران (۲۵) گزارش کردند که مریم گلی باعث کاهش غلظت کلسترول و LDL خون می‌شود. ترکیبات فنولی موجود در عصاره گیاهان دارویی با کاهش فعالیت آنزیم کلیدی تنظیم‌کننده ساخت کلسترول (۳- هیدروکسی سی-۳- متیل گلوکاریل

غلظت لیپیدهای خونی شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، لیپوپروتئین کم‌چگال (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL) در ۴۲ روزگی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با عصاره کک کش بیابانی و مومیایی در جدول (۹) آمده است. اثر متقابل کک کش بیابانی و مومیایی بر غلظت کلسترول و LDL خون معنی‌دار بود و باعث کاهش آنها در مقایسه با شاهد شد ولی بر غلظت تری‌گلیسرید و HDL اثر نداشت. بطور مشابه استفاده از ۳/۰ در صد پودر علف هیضه در جیره

کوآنزیم A (HMG-CoA) ردوکتاز جگر موجب کاهش کلسترول خون می‌شوند (۴۳) و احتمالاً از این طریق باعث کاهش غلظت

جدول ۸- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر ریخت شناسی روده (میکرومتر) جوجه گوشتی
Table 8- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on intestinal morphology(μmeter)) in broilers

Table 3. Effect of intestinal gregarines and mummy on intestinal morphology (mmol/m ²) in broilers						
	ارتفاع پرز Villus Height	عرض پرز Villus Width	عمق کریپت Crypt depth	ارتفاع پرز به عمق کریپت Height : crypt ratio	سطح جذب Area absorption	
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم) Pulicaria (mg/kg)						
0	818.3 ^b	171.0	158.6	5.405 ^b	435.2 ^b	
100	883.8 ^b	170.1	165.8	5.396 ^b	469.2 ^{ab}	
200	1033 ^a	177.8	149.3	7.167 ^a	58.6.3 ^a	
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر) Mummy(mg/l)						
0	682.8 ^b	165.1	144.6	4.859 ^b	352.4 ^b	
20	1037 ^a	182.8	170.6	6.486 ^a	599.7 ^b	
40	1015 ^a	171.0	158.5	6.578 ^a	538.6 ^a	
اشتباه معیار میانگین SEM	30.323	11.873	10.047	0.4158	38.233	
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش Mummy and Pulicaria Interaction						
مومیایی Mummy	عصاره کک Pulicaria					
0	0	597.5 ^f	172.0	136.5	4.389 ^b	323.7 ^b
0	100	716.0 ^{ef}	173.0	144.5	5.041 ^{ab}	389.3 ^{ab}
0	200	735.0 ^{efd}	150.5	153.0	5.256 ^{ab}	344.4 ^{ab}
20	0	988.5 ^{abc}	183.5	198.5	5.411 ^{ab}	492.4 ^{abc}
20	100	979.0 ^{abcd}	179.0	174.0	5.698 ^{ab}	552.4 ^{abc}
20	200	1143.0 ^{ab}	212.0	139.5	8.350 ^a	754.2 ^a
40	0	869.0 ^{cde}	183.5	141.0	6.416 ^a	489.6 ^{abc}
40	100	956.5 ^{bcde}	158.5	179.0	5.450 ^{ab}	466.0 ^{abc}
40	200	1222.0 ^a	171.0	155.5	7.896 ^a	660.2 ^{ab}
اشتباه معیار میانگین SEM		52.521	20.566	17.402	0.7202	66.223
سطح معنی داری P-Value						
عصاره کک کش Pulicaria	0.0001	0.8826	0.5160	0.0069	0.0240	
مومیایی Mummy	0.0001	0.5696	0.2059	0.0122	0.0003	
کک کش* مومیایی Pulicaria*mummy	0.1137	0.3320	0.1519	0.3407	0.2587	

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

مقایسه با شاهد پایین‌تر بود (جدول ۹: $P < 0.05$) ولی میزان فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز تحت تاثیر اثرات متقابل پودر مومیایی و عصاره کک کش قرار نگرفت (جدول ۱۰) ولی در بخش اثرات اصلی،

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های کبدی خون جوجه‌های گوشتی نشان داد فعالیت آنزیم اسپاراتات آمینوترانسفراز در جوجه‌های تغذیه شده با سطح ۴۰ میلی گرم مومیایی و ۲۰۰ میلی گرم عصاره کک کش در

استفاده از مومیایی در جیره‌های آزمایشی باعث کاهش میزان فعالیت آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز خون جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$).

جدول ۹- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر غلظت لیپیدهای خون (میلی گرم در دسی لیتر) جوجه گوشتی

Table 9- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on blood lipid concentration (mg / dL) in broilers

	کلسترول Cholesterol	تری گلیسرید Triglyceride	لیپوپروتئین با چگالی بالا HDL	لیپوپروتئین با کم چگالی LDL	
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم) Pulicaria (mg/kg)					
0	106.84	95.42	60.79	84.73 ^a	
100	101.00	86.11	61.30	74.47 ^b	
200	100.63	89.70	62.55	74.90 ^{ab}	
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر) Mummy(mg/l)					
0	102.38	97.20	60.26	82.40	
20	103.25	86.13	62.08	75.66	
40	102.83	87.90	62.30	76.04	
اشتباه معیار میانگین	2.137	4.083	0.955	2.910	
SEM					
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش Mummy and Pulicaria Interaction					
Mummy	Pulicaria				
0	0	114.6 ^a	104.3	59.00	97.61 ^a
0	100	94.00 ^b	91.71	60.28	72.45 ^b
0	200	98.50 ^{ab}	95.50	61.50	77.12 ^{ab}
20	0	100.1 ^{ab}	91.13	62.00	75.75 ^{ab}
20	100	105.2 ^{ab}	79.37	61.37	74.42 ^b
20	200	104.3 ^{ab}	87.87	62.87	76.80 ^{ab}
40	0	105.7 ^{ab}	90.75	61.37	80.83 ^{ab}
40	100	103.7 ^{ab}	87.25	62.25	76.51 ^{ab}
40	200	99.00 ^{ab}	85.71	63.28	70.77 ^b
اشتباه معیار میانگین	3.701	7.072	1.655	5.040	
SEM					
سطح معنی داری P-Value					
عصاره کک کش Pulicaria	0.0781	0.2739	0.4118	0.0235	
مومیایی Mummy	0.9586	0.1286	0.2604	0.1923	
کک کش * مومیایی Pulicaria*mummy	0.0094	0.9394	0.9800	0.0963	

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

فعالیت آنزیم‌های کبدی سرم نشانه‌ای از مشکلات کبدی است (۵۰). در این آزمایش میزان فعالیت آنزیم‌های فعالیت آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در پرندگان تغذیه شده با مومیایی و علف هیضه نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد که نشان دهنده ممانعت از آسیب‌های کبدی هست. نجفی (۲۷) گزارش نمود که فعالیت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز در جوجه تغذیه شده با علف هیضه در مقایسه با شاهد کاهش یافت که با یافته‌های این

غلظت پروتئین تام خون و آلبومین خون جوجه‌های گوشتی تحت تاثیر پودر مومیایی و عصاره کک کش قرار گرفت. دو آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز از آنزیم‌های اصلی مرتبط با فعالیت کبد هستند آنزیم آلانین آمینوترانسفراز فقط در کبد است و آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز که علاوه بر کبد در ماهیچه، قلب، کلیه و مغز وجود دارد. اگر فعالیت این دو آنزیم در خون افزایش یابد، می‌توان دریافت که کبد دچار آسیب شده است (۱۴ و ۵۰). افزایش

آزمایش مطابقت دارد.

جدول ۱۰- اثر استفاده از مومیایی و عصاره کک کش بر غلظت پروتئین خون (میلی گرم بر دسی لیتر) و فعالیت آنزیم های کبدی (واحد در لیتر) جوجه گوشتی
Table 10- Effect of *Pulicaria gnaphalodes* and mummy on concentration of blood protein (mg / dL) and liver enzymes activity (U/L) in broilers

	آلبومین Albumin	پروتئین Protein	آلانین آمینوترانسفراز ALT	آسپاراتات آمینوترانسفراز AST
عصاره کک کش (میلیگرم در کیلوگرم) ulicaria (mg/kg)				
0	1.39	2.84	6.45	212.8
100	1.40	2.85	6.15	201.2
200	1.47	2.86	5.39	200.4
پودر مومیایی (میلی گرم در لیتر) lummy(mg/l)				
0	1.41	2.82	7.36 ^a	215.9 ^a
100	1.42	2.89	5.99 ^{ab}	215.8 ^a
200	1.43	2.84	4.64 ^b	182.7 ^b
اشتباه معیار میانگین EM	0.054	0.107	0.521	7.532
اثر متقابل مومیایی و عصاره کک کش lummy and Pulicaria Interatcion				
lummy				Pulicaria
0	1.34	2.65	8.37	232.1 ^a
100	1.41	2.90	7.71	186.8 ^{ab}
200	1.49	2.90	6.00	228.8 ^{ab}
0	1.40	2.99	5.86	233.5 ^a
100	1.44	2.90	6.25	220.2 ^{ab}
200	1.41	2.80	5.87	193.5 ^{ab}
0	1.42	2.89	5.13	172.6 ^b
100	1.35	2.76	4.50	196.5 ^{ab}
200	1.50	2.89	4.28	178.8 ^b
اشتباه معیار میانگین EM	0.094	0.186	0.903	13.04
سطح معنی دار -Value				
عصاره کک کش ilicaria	0.5413	0.9905	0.3247	0.4347
مومیایی ummy	0.9862	0.8700	0.0021	0.0028
کک کش * مومیایی ilicaria*mummy	0.8414	0.7352	0.7282	0.0208

a,b میانگین های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P < 0.05$).a,b Means within same column with different superscripts differ ($P < 0.05$).

نتیجه گیری کلی

در لیتر آب و ۲۰۰ میلی گرم کک کش بیابانی در خوراک باعث بهبود عملکرد رشد، ریخت شناسی روده، پاسخ ایمنی و کاهش لیپیدهای خونی جوجه گوشتی شد.

یافته ها نشان داد استفاده همزمان از سطح ۲۰ میلی گرم مومیایی

منابع

1. Betoli, H., A. Haqir Ebrahim Abadi, I. Karimi Khazani, and A. Mazuchi. 2017. Examine your questions Essence Plant *Pulicaria* (*Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss.) Kashan Barzak area. *Ecophytochemical Medicinal Plants*, 1

- (17): 65-77. (In Persian).
2. Chang, Y. L., D. O. Kim, K. W. Lee, H. J. Lee, and C. Y. Lee. 2002. Vitamin C equivalent anti oxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13): 3713-3717.
3. Craigmill, A.L., and K. A. Cortright. 2002. Interspecies considerations in the evaluation of human food safety for veterinary drugs, *AAPS Pharmacy Science*, 4(4): 126-136.
4. Dansethakul P., L. Thanpanthamchai, S. Saichanma, A. Worachartcheewan, and P. Pidetcha. 2015. Determining a new formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol: Data mining approach. *Excel Journal*, 14: 478-483.
5. Dash, S., L. K. Nath, J. Bhise, P. Kar, and S. Bhattacharya. 2006. Stimulation of immune function activity by the alcoholic root extract of *Heracleum nepalense*. *Indian Journal of Pharmacology*, 38: 336-340.
6. Dehkhoda, A. 1955. *Dehkhoda dictionary*. Volume Forty-Six- Letter (m), Tehran: Cyrus Press, pp. 3-1320. (In Persian).
7. Ghosal, S., K. Kawanishi, and K. Saiki. 1995. The chemistry of shilajit odour. *Indian Journal of Chemistry*, 34: 40-44.
8. Goliomytis, M., T. Soureki, D. Smitsis, P. E. Charismiadon, M. A. Hager, A. L. Theodorides, and S. G. Deliigeorgis, 2014. The Effects of quercetin dietary supplementation on broiler growth performance, meat quality, and oxidative stability. *Poultry Science*, 93: 1957-1962.
9. Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, and O. X. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broiler. *International Journal of Poultry Science*, 5: 149-155.
10. Harms, R. H. 1972. Response of poultry to supplemental inorganic sulfate. *Proceedings Maryland Nutrition. Cinf*, 53: 235-240.
11. Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, and T. Veldkamp. 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry Science*, 92: 2059-2069.
12. Hosseini-Vashan S. J., A. Golian, and A. Yaghobfar. 2016. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. *International Journal of Biometeorology*, 60:1183-1192.
13. Izadi, H., J. Arshami, A. Golian, and A. R. Raji. 2013. Effects of chicory root powder on growth performance and histomorphometry of jejunum in broiler chicks. *Veterinary Research*, 4: 169-174.
14. Jamshidi, A., H. Ahmadi Ashtiani, B. Gholamhosseini, and S. Bakae. 2007. The effects of oral administration of the extract Milk thistle (silymarin) on histological and biochemical changes caused by aflatoxin in broilers, *Medicinal Plants*, 4(24): 9-14.
15. Katanbaf, M. N., E. A. Dunnington, and P. B. Siegel. 1989. Restricted feeding in early and late-feathering chickens. Growth and physiological responses. *Poultry Science*, 68: 344-351.
16. Khani, A., and J. Asghari. 2012. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science*, 12(73): 1-10
17. Kirchgeßner, M., and F. X. Roth. 1982. Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition. *Pig News and Information*, 3: 259-264.
18. Kong, Y. C., P. P. H. But, K. H. Ng, K. F. Cheng, R. C. Cambie, and S. B. Malla, 1987. Chemical studies on a nepalese panacea-shilajit (I). *Pharmacol Biology*, 25 (3): 179-182.
19. Laudadio, V., L. Passantino, A. Perillo, G. Lopresti, A. Passantino, R. U. Khan, and V. Tufarelli. 2012. Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science*, 91(1): 265-270. doi.org/10.3382/ps.2011-01675.
20. Leeson, S., and J. Summers. 2013. *Poultry nutrition*. Translated by Golian, Abolqasem, and Salar Mo'ini, Muhammad. Kosar Economic Organization Agricultural Education and Research Unit. Tehran. Iran. (In Persian).
21. Marashi Saray, S. V., F. Shariatmadari, M. A. Alizadeh Sadr Daneshpour, and M. A. Karimi Torsizi. 2010. The effect of using prebiotics, herbs and organic acids as antibiotic substitutes on the performance and apparent digestibility of broiler chickens. *Journal of Veterinary (Research and Construction)*, 86: 15-20. (In Persian).
22. Martins, J. M. S., C. M. C. Carvalho, F. H. Litz., M. M. Silveria, C. A. Moraes, M. C. A. Silva, N. S. Fagundes, and E. A. Fernandes. 2016. Productive and Economic Performance of Broiler Chickens Subjected to Different Nutritional Plans. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18(2): 209-216.
23. McDowell, L. R. 2000. Reevaluation of the metabolic essentiality of the vitamins review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13: 115-125.

24. McManus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, 2: 99-108.
25. Mossadegh, R., S. Salari, M. Sari, T. Mohammad Abadi, and Taghizadeh. (2013). Comparison of the effect of addition of essential native medicinal plant essential oil with virgin amycin antibiotic on function, blood metabolites and some safety parameters of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 5 (1): 20-28.
26. Mozaffarian, V. 2008. Flora of Ilam. Farhange Moaser Publication, Tehran, 936p. (In Persian)
27. Najafi, E. 2016. Effect of aqueous extract pulicaria of ascorbic acid on barberry performance parameters, carcass characteristics, blood immune system and liver enzymes of heat-stressed broiler chickens. MSc. Thesis. Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian).
28. Najifi, P. and M. Torki. 2010. Performance, blood metabolites and immunocompetance of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1164-1168.
29. Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Macmillian Worth Publishers, New York, 804-812.
30. Nelson, N. A., N. Lakshmanan, and S. J. Lamont. 1995. Sheep red blood cell and Brucella abortus antibody responses in chickens selected for multitrait immunocompetence. *Poultry Science*, 74: 1603-1609.
31. Ordone, A. A. L., J. D. Gomez, and M. A. Vattuone. 2008. Antioxidant activities of Sechium edule swartz extracts. *Food Chemistry*, 97: 452-458.
32. Pandey, R., R. Maurya, G. Singh, B. Sathiamoorthy, and S. Naik. 2005. Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from Boerhaavia diffusa Linn. *International Immunopharmacology*, 5: 541-553.
33. Pekkarinen, S. S., I. M. Heinonen, and A. I. Hopia. 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaempferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate, *Journal of Science and Food Agriculture*, 79: 499-506
34. Rhee, S. J., W. K. Choe, and T.Y. Ha. 1995. The effect of vitamin E on the antioxidative defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 48: 451-457.
35. Saki, A. and M. Eftekhari. 2012. Influence of mixed levels of organic acids and two sources of methionine supplementation on performance, carcass characteristics and digestive system of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science*, 43 (1): 41-49. (In Persian) .
36. Schepetkin, I. A., G. A. Xie, M. T. Jutila, and M. Quinn. 2009. Complement-fixing activity of fulvic acid from shilajit and other natural sources. *Phytotherapy Research*, 23 (3): 373-84.
37. Serafini, M., I. Peluso, and A. Raguzzini. 2010. Session1:antioxidants and the immune system. Flavonoids as anti inflammatory agents. *The Proceeding of the Nutrition Society*, 69: 273-278.
38. Shahidi, F., and M. Naczsk. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press publishing, Taylor and Francis group, United States.
39. Shariatifar, N., A. Kamkar, M. R. Shamsi Ardakani, A. Misaghi, A. H. Jamshidi, and Gh. R. Jahed Khaniki. 2012. Quantitative and qualitative study of phenolic compounds and antioxidant activity of plant pulicaria gnaphalodes. *Journal of Horizon of Knowledge (Gonabad University of Medical Sciences and Health Services)*, 4: 35-41. (In Persian).
40. Sharifian, M., S. J. Hosseini-Vashan, M. H. Fathi Nasri, A. H. Perai. 2019. Pomegranate peel extract for broiler chickens under heat stress: Its influence on growth performance, carcass traits, blood metabolites, immunity, jejunal morphology, and meat quality. *Livestock Science*, 227: 22-28.
41. Shirani, V., V. Jazi, M. Toghyani, A. Ashayerizadeh, F. Sgarifi, and R. Barekatin. 2019. *Pulicaria gnaphalodes* powder in broiler diets: consequences for performance, gut health, antioxidant enzyme activity, and fatty acid profile. *Poultry Science*, 98: 2577-2587. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez010>.
42. Siddons, R. C. 1978. Nutrient deficiencies in animals: folic acid. *CRC handbook series in nutrition and foods publishing*, Taylor and Francis group, United States.
43. Tahmasebi, M., F. Shariatmadari, and M. A. Karimi Torsizi. 2012. Effect of alcoholic extract of thyme, vitamin e and fat in diet on cholesterol and egg yolk cholesterol and immunity of laying chicken under heat stress conditions. *Journal of Medicinal Plant*, 9 (2): 183-192. (In Persian).
44. Toghyani, M., A. Gheisari, G. h. Ghalamkari, and M. Mohammadrezaei. 2010. Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (Nigella sativa) and peppermint (Mentha piperita). *Journal of Livestock Science*, 129: 173-178.
45. Torabi, N. 2015. The effect of mummy on the progression of experimental osteoarthritis in rats. DVM, Veterinary. Thesis. Faculty of Veterinary Medicine Bahonar University of Kerman, Iran. (In Persian).
46. Vasantha Rupasinghe, H. P., C. M. Ronalds, B. Rathgeber, and R. A. Robinson. 2010. Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. *Science of Food and Agriculture*, 90: 1172-1178.
47. Wollenweber, E., and A. Rustayian. 1991. Exudative flavonoids in three Persian astraceae species. *Biochemical*

- Systematics and Ecology, 19(8): 673-675.
48. Xu, Z. R., C. H. Hu, M. S. Xia, X. A. Zhan, and M.Q. Wang. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. Poultry Science, 82: 1030-1036.
 49. Zantop, D. W. 1997. Biochemistries. In Avian Medicine: Principles and Applications. Winger Publishing, Florida, United States.
 50. Zargari, A. 2011. Medicinal Plants. University of Tehran Publications. Third volume, Tehran. Iran. 34-38. (In Persian).



Effect of mummy powder and *Pulicaria gnaphalodes* extract on growth performance, immune system and intestine morphology of broiler chickens

Faezeh Ahmadzadeh¹, Seyyed Javad Hosseini-Vashan^{1*}, Nazar Afzali¹, Ali AllahRessani²

Submitted: 08-04-2020

Accepted: 03-10-2020

Ahmadzadeh, F., S. J. Hosseini-Vashan, N. Afzali, and A. Allahressani. 2021. Effect of mummy powder and *Pulicaria gnaphalodes* extract on growth performance, immune system and intestine morphology of broiler chickens. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):351-368.

Introduction Mummies are the brown or black hydrocarbon that are produced deep layers of earth or mountain and contain a significant percentage of benzoic acid, humic acid, and folic acid, fatty acids, inulin, and resins. The mummy probably reduces the acidity of the digestive content and increases the activity of its microbial acid-loving population, and ultimately increases the digestibility of nutrients (protein and fat) and improves body weight gain. On the other hand, *pulicariap gnaphalodes* is an herbaceous, perennial, with straight stems, dense leaves and hazelnut fruit. The *pulicariap gnaphalodes* store energy in the form of fructan and inulin. The most active component of it is 8, 1-cinnamol (22.93%), alpha pinene (8.13%), amorphous-9, 4DN-2-L (8.36%), myrtenol (7.24%). Percent). Quercetin and its derivatives are the main flavonoids in *pulicariap gnaphalodes*. Inulin plays a prebiotic role in poultry diets and improves the intestinal environment. Improving the intestinal environment increases the immune response and growth performance. The strong antibacterial properties of *Pulicaria gnaphalodes* due to its polyphenolic compounds, especially quercetin, has the ability to neutralize free radicals and reduce feed conversion ratio. Therefore, this study was carried out to investigate the effect of *Pulicaria gnaphalodes* extract and mummy on growth performance, blood biochemical indices, immune system and jejunal morphology of broiler chickens.

Materials and Methods A total of 360 one-day-old Ross 308 chicks was used in 9 treatments (three levels of PULICARIA GNAPHALODES extract (PGE) (0, 100, and 200 mg/kg) and three levels of mummy (0, 20 and 40 mg/L). 3 replicates, and 10 birds. The experiment was done in a completely randomized design with 3 × 3 factorial design. The growth performance indices were recorded at the end of each period of starter (1-10 days), grower (11-24 days), finisher (25-42 days). At the end of the experiment, two birds from each replicate were slaughtered to study the relative weight of the carcass components. The blood of two birds of each replicate were gathered, then the sera were extracted and freezed at -20 °C at 42 days. To study the jejunal morphology, a slice of 1 cm from the midpoint of jejunum from each slaughtered birds were separated, then it was placed in formalin until send laboratory. The statistical analyses were done with SAS software with GLM procedure. The Tukey test was used to compare average treatments.

Results and Discussion The results showed that growth performance traits including feed intake, body weight gain and feed conversion ratio did not affect by the interaction effects of mummy powder and PGE, except for body

1- Graduate Student, Associate professor and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Chemistry, University of Birjand, Birjand, Iran.

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

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.79474

weight gain index and feed conversion ratio that was affected at the finisher period. The highest weight gain was observed in broilers fed 20 mg of mummy + 200 mg of PGE compared to the control group. Mummies contain a significant percentage of benzoic acid, humic acid, and folic acid, fatty acids, inulin, and resins. The mummy probably reduces the acidity of the digestive content and increases the activity of its microbial acid-loving population, and ultimately increases the digestibility of nutrients (protein and fat) and improves body weight gain. The PGE also is an energy source in the form of inulin, inulin plays a prebiotic role in poultry diets and improves the intestinal environment. Improving the intestinal environment increases the immune response and growth performance. Due to its polyphenolic compounds, especially quercetin, PGE has the ability to neutralize free radicals and reduce feed conversion ratio. The mummy compares to control significantly increased carcass weight and breast relative weight ($P < 0.05$). Both experimental dietary treatments significantly increased liver, bile, heart, spleen and relative weight bursa ($P < 0.05$). The interaction of PGE and mummy increased the antibody titer against SRBC and immunoglobulin M and G compared to control ($P < 0.05$). Increasing the relative weight gain of lymphoid organs is a sign of the development of the immune system. Pandey et al. (28) have reported that quercetin supplementation in poultry feed increases the relative weight of Fabricius and Thymus. The interaction effect of PGE and mummy powder at the level of 40 mummy and 100 extracts improved the relative weight of lymphatic organs and antibody titer against SRBC. In this study, no significant alterations were observed in the concentration of blood protein, triglyceride, and high-density lipoprotein of broilers fed different dietary treatments. The birds fed 40 mummy and 200 PGE caused a decrease in LDL concentration, cholesterol, and aspartate aminotransferase activity compared to control ($P < 0.05$). Phenolic compounds in herbal extracts reduce blood cholesterol by lowering the activity of key enzyme-regulating cholesterol-building enzymes (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) HMG-CoA liver reeducates.

Conclusion These findings showed that the addition of mummy and PGE at 20 mg/l of water and 200 mg/kg of feed together respectively in the diet may improve growth performance, reduce abdominal fat and blood lipids and liver enzyme activity in broiler chickens.

Keywords: Alanine aminotransferase, Antibody titer, Performance index, Triglyceride, Villus Height.



مقاله علمی - پژوهشی

تعیین انرژی قابل متابولیسم ذرت فرآوری شده در دماهای مختلف و اثر آن در جیره‌های با و بدون مکمل آنزیمی بر عملکرد رشد و مورفولوژی روده کوچک جوجه‌های گوشتی در دوره ۲۴-۱ روزگی

محسن تیموری^۱، احمد حسن آبادی^{۲*}، حسن نصیری مقدم^۲، ابوالقاسم گلیان^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶

تیموری، م.، ا. حسن آبادی، ح. نصیری مقدم، و ا. گلیان. ۱۴۰۰. تعیین انرژی قابل متابولیسم ذرت فرآوری شده در دماهای مختلف و اثر آن در جیره‌های با و بدون مکمل آنزیمی بر عملکرد رشد و مورفولوژی روده کوچک جوجه‌های گوشتی در دوره ۲۴-۱ روزگی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۶۹-۳۸۸.

چکیده

به منظور تعیین محتوی ماده خشک ذرت، انرژی قابل متابولیسم ظاهری و قابلیت هضم پروتئین خام از یک جیره پایه که تنها منبع انرژی و پروتئین آن ذرت فرآوری شده (در دماهای ۵۵، ۷۰ و ۸۵°C به مدت ۱۵۰ ثانیه) و نشده با و بدون مکمل آنزیمی بود، آزمایش اول به روش جمع‌آوری فضولات با استفاده از تعداد ۱۴۴ قطعه جوجه‌گوشی سویه راس ۳۰۸ در سن ۳-۹ روزگی انجام شد. فرآوری ذرت در ۷۰°C نسبت به ۸۵°C قابلیت هضم ماده خشک را به طور معنی‌داری بهبود بخشید. در آزمایش دوم، اثر دماهای فرآوری و مکمل آنزیمی روی، سطح صفر و ۵/۰ گرم در کیلوگرم جیره با استفاده از تعداد ۵۷۶ قطعه جوجه‌گوشی ۱-۲۴ روزگی در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل ۲×۴ با ۶ تکرار و ۱۲ قطعه پرند در هر تکرار مطالعه شد. فرآوری ذرت ضریب تبدیل خوراک را در سن ۱۰-۱۱ روزگی به طور معنی‌داری بهبود داد؛ اما سایر صفات عملکردی تحت تأثیر تیمارها و اثرات متقابل آن‌ها قرار نگرفت. افزودن آنزیم باعث کاهش معنی‌دار وزن نسبی لوزالمعده شد. فرآوری ذرت باعث بهبود معنی‌دار پهنای پرز، عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت شد. افزودن آنزیم ارتفاع و پهنای پرز را به طور معنی‌داری بهبود داد. جمعیت لاکتوباسیل‌ها تحت تأثیر فرآوری و مکمل آنزیمی بهبود معنی‌داری نشان داد. بیفیدوباکترها، اشریشیا کولای و کلوستریدیوم در محتویات ایلئوم تحت تأثیر فرآوری، آنزیم و اثر متقابل آن‌ها قرار نگرفت. با توجه به نتایج این آزمایش، فرآوری حرارتی ذرت و افزودن آنزیم به جیره جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری بر عملکرد رشد نداشت؛ ولی شاخص‌های بافت‌شناسی ژژنوم و فلور میکروبی روده کوچک را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، جوجه گوشتی، ذرت، عملکرد، فرآوری حرارتی.

مقدمه

تخم‌مرغ باعث شده که متخصصان تغذیه طیور با تکیه بر دانش و فن به دنبال تصحیح و ارتقاء روش‌های تغذیه‌ای موجود بوده و همواره مسیری که بتواند استفاده حداکثری از مواد خوراکی را سبب شود، جستجو می‌کنند. به کارگیری تکنیک‌های مختلف فرآوری خوراک دام

روند رو به رشد جمعیت، کمبود مراتع و منابع و در مقابل آن افزایش نیاز انسان برای فراهم نمودن پروتئین حیوانی (مرغ و

(Email: hassanabadi@um.ac.ir

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.83851

(*)- نویسنده مسئول:

۱- دانشجوی دکتری تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استادان گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

پروتئینی و نشاسته و چربی در ارتباط است (۲۸). در مقایسه با فرآوری با حرارت متعادل، حرارت‌دهی با دمای بالا می‌تواند اثرات نامطلوبی از قبیل واکنش میلارد را باعث شود (۲۲ و ۲۷). چندین عامل فیزیکی و شیمیایی بر انرژی قابل متابولیسم و عملکرد حیوان مؤثر هستند که شامل ویسکوزیته و سختی دانه (۸)، نشاسته، پروتئین، پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای و چربی موجود در آن می‌باشند (۷ و ۲۳).

فرآوری دانه غلات به‌عنوان یکی از راهکارهای عمده جهت بهبود بهره‌بود ارزش غذایی مواد مغذی، مخصوصاً انرژی قابل متابولیسم، نشاسته و پروتئین برای طیور مطرح است (۱۹). این فرآیند با تخریب عوامل ضد تغذیه‌ای خوراک‌های با منشأ گیاهی ارزش غذایی انرژی و پروتئین را بالا می‌برد (۲۶). دستگاه سوپرپخت قابلیت فرآوری اجزای مختلف خوراک با دماهای از دماها و زمانهای متفاوت را دارد که در برخی از کارخانجات خوراک دام و طیور ایران در حال استفاده است. با این شیوه از فرآوری، در واحدهای پرورش طیور که به هر دلیل تمایلی به استفاده از خوراک پلت ندارند می‌توان مواد ضد تغذیه‌ای و سالمونلا را از بین برده و بهره‌وری بیشتر از غلات را انتظار داشت. همچنین در مواقع شیوع بیماری‌های متابولیکی و ویروسی، با فراهم نمودن محصول فرآوری شده می‌توان به تغییر فرمولاسیون جیره و کاهش فشار متابولیکی کمک نمود. هدف از انجام این پژوهش مطالعه اثر دماهای مختلف فرآوری ذرت در خوراک مش با و بدون مکمل آنزیمی بر انرژی قابل متابولیسم ذرت و اثر استفاده از آن بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در دوره‌های آغازین و رشد، مورفولوژی ژنوم و جمعیت میکروبی ایلئوم در سن ۲۴ روزگی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ذرت، آنزیم و جوجه‌های مورد استفاده در آزمایش

ذرت استفاده شده در این طرح پژوهشی از نوع وارداتی برزیلی بود. چهار تن ذرت یادشده در شرکت تولید خوراک دام و طیور دردانه خراسان رضوی واقع در شهرک صنعتی چناران با آسیابی با قدرت ۱۰۰ اسب بخار (۷۵ کیلو وات) و ۱۴۸۰ دور و با ۵۰ هرتز در دقیقه با ۶۴ چکش ساخت شرکت آسیاب ایران و با توری سه میلی‌متری آسیاب گردید. قابلیت تغییر تعداد دوران با تغییر فرکانس از ۳۰۰ دور تا ۱۸۰۰ دور از ویژگی‌های این نوع آسیاب است. ذرت آسیاب شده به چهار قسمت مساوی تقسیم گردید؛ یک قسمت از ذرت بدون فرآوری حرارتی و سه قسمت دیگر پس با گذشتن از سوپرکاندیشنر در معرض فرآوری حرارتی با بخار به تفکیک به مدت ۱۵۰ ثانیه در دماهای ۵۵، ۷۰ و ۸۵°C قرار گرفتند. این کاندیشنر از نسل جدید کاندیشنرها به شمار آمده و ساخت شرکت آسیاب ایران با

و طیور با استفاده از حرارت بخار از روش‌هایی است که سال‌هاست بشر از آن در افزایش بهره‌وری خوراک استفاده نموده است. تکامل ژنتیکی نیز باعث شده نیاز پرندگان در بازه‌های زمانی مختلف، متفاوت باشد بدون شک این پیشرفت ژنتیکی یکی از عوامل اصلی مؤثر در پیشرفت تولیدات طیور به ویژه در ارتباط با ضریب تبدیل خوراک و سرعت رشد بوده همچنین رشد پیوسته ماهیچه و بهره‌وری پرنده در تبدیل خوراک به ماهیچه، با بازده در تولید انرژی ارتباط دارد. خوراک به‌شترین هزینه (حدود ۷۰ درصد) تولیدات طیور را به‌خود اختصاص می‌دهد (۳). ذرت یکی از غلات استراتژیک است که در تغذیه طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۳). ذرت به‌دلیل دارا بودن مقادیر زیاد روغن، نشاسته و مقدار فیبر کم، دانه‌ای پرانرژی محسوب می‌شود. بخش اصلی پرانرژی ذرت، اندوسپرم نشاسته‌ای است که شامل آمیلوز و آمیلوپکتین است (۱۰). باور بر این است که گرانول‌های نشاسته‌ای که دارای مقادیر بالایی از آمیلوز (بیشتر از ۴۰ درصد) هستند، نسبت به سایر گرانول‌ها مقاومت بیشتری در برابر هیدرولیز از خود نشان می‌دهند. بنابراین، هیدرولیز آنزیمی ممکن است به واسطه ناکافی بودن خلل و فرج که از خصوصیات فیزیکی-شیمیایی این مواد است محدود شود (۶). میزان آمیلوز بالا با کاهش قابلیت هضم در ارتباط است (۲۹). نشاسته منبع مهم تأمین انرژی در غلات به شمار رفته و توجه به دسترسی و هضم آن حائز اهمیت می‌باشد (۲۴). در دیواره سلولی آندوسپرم دانه‌های غلات بخشی از کربوهیدرات‌های ساختمانی وجود دارند که در روده کوچک طیور محلول‌اند (اغلب آرابینوزایلان‌ها در ذرت) و وزن مولکولی بالایی دارند (۱۰). از جمله تغییرات فیزیکی و شیمیایی مثبت فرآوری با حرارت بخار، ژلاتینه شدن نشاسته، دنا‌توره شدن پروتئین‌های مهارکننده آنزیم‌های دستگاه گوارش و شکسته شدن دیواره سلولی است (۲۲). پروتئین ذرت عمدتاً به صورت پرولامین (ژئین) است که الگوی اسیدهای آمینه آن برای طیور مطلوب نمی‌باشد. از طرف دیگر، ژئین از نظر اسیدهای آمینه لیزین و تریپتوفان فقیر است (۱۶). پروتئین ذرت ممکن است ارزش تغذیه‌ای پایینی داشته باشد، اما این پروتئین می‌تواند تا ۲۰ درصد پروتئین جیره‌های آغازین جوجه‌های گوشتی را به خود اختصاص دهد (۹). امروزه تکنیک‌های مختلف فرآوری خوراک با کاهش سطوح مواد ضدتغذیه‌ای و متورم سازی نشاسته منجر به بهبود سطح دسترسی مواد مغذی و افزایش قابلیت هضم خوراک می‌شود (۲۰).

از شیوه‌های مختلف فرآوری می‌توان به سوپرکاندیشنینگ اشاره نمود. مهم‌ترین مرحله در فرآوری حرارتی، کاندیشنینگ یا فرآوری خوراک مش است که با افزودن بخار به خوراک مش انجام می‌شود (۲۸). تیمار حرارتی متعادل جیره‌های جوجه‌های گوشتی ارزش تغذیه‌ای خوراک را بهبود می‌بخشد. این بهبود با ژلاتیناسیون نشاسته، تخریب مواد ضدتغذیه‌ای حساس به حرارت، تخریب دیواره‌های سلولی، بهبود قابلیت دسترسی مواد مغذی از طریق تفکیک ماتریکس

گروه سه قطعه‌ای (دو نر و یک ماده) تقسیم و در سن سه روزگی به‌طور تصادفی به ۴۸ قفس متابولیکی منتقل شدند. هشت جیره آزمایشی که تنها منبع انرژی و پروتئین موجود در آنها ذرت بود تهیه (جدول ۱) و هر جیره به‌طور تصادفی به شش قفس اختصاص یافت. جیره‌های آزمایشی به منظور عادت پذیری از روز سه تا پنج‌روزگی در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت و در روز ششم پس از ۱۲ ساعت گرسنگی و تعبیه سینی‌های مخصوص جمع‌آوری فضولات در زیر قفس‌ها، به مدت چهار روز در اختیار جوجه‌ها قرار گرفتند. خوراک باقیمانده پس از ۹۶ ساعت تغذیه از جلوی قفس‌ها جمع‌آوری و به جوجه‌ها ۱۲ ساعت گرسنگی داده شد و فضولات آنها تا پایان گر سگی دوم جمع‌آوری گردید. مقدار خوراک مصرفی جوجه‌های هر قفس در مدت چهار روز آزمایش با کسر خوراک باقیمانده از خوراک داده شده تعیین شد (۲۴). فضولات دفعی به مدت ۴۸ ساعت در جریان هوای ملایم اتاق قرار گرفت و سپس در آون با دمای 60°C به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. فضولات خشک شده دو ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد تا با شرایط محیطی به تعادل برسند. پر و ضایعات احتمالی با بادبزن جدا شد و وزن کل فضولات دفع شده هر قفس مشخص گردید (۳۱ و ۳۲). کل فضولات مربوط به هر قفس آسیاب و همگن شدند؛ سپس میزان ماده خشک، پروتئین خام و انرژی خام در نمونه‌های خوراک و فضولات بر اساس روش‌های پیشنهادی انجمن شیمی دانان (۴) تعیین گردید. برای تعیین انرژی خام نمونه‌های جیره و فضولات جمع‌آوری شده، از بمب کالری‌متر (مدل PARR 1261) استفاده شد.

آزمایش دوم:

در این آزمایش تعداد ۵۷۶ قطعه جوجه گوشتی یک روزه مخلوط و بطور مساوی از دو جنس (تعیین جنسیت با استفاده از وضعیت پرها) تهیه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چیدمان فاکتوریل (4×2) با شش تکرار و ۱۲ پرند (شش قطعه نر و شش قطعه ماده) در ۴۸ پن پوشیده شده از بستر تراشه چوب و با ابعاد $120 \times 120 \times 80$ سانتی‌متر که مجهز به یک دانخوری سینی و دو آبخوری نیپل بود قرار داده شدند. جوجه‌ها از سن یک تا ۱۰ و ۱۱ تا ۲۴ روزگی با جیره‌های (پیشدان و میاندان) آزمایشی بر پایه ذرت-کنجاله سویا تغذیه شدند. جوجه‌ها در کل آزمایش به خوراک و آب به صورت آزاد دسترسی داشتند (۵). دمای جایگاه پرورش در زمان ورود جوجه‌ها در دامنه 30°C تا 32°C درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و پس از روز سوم هر روز 0.5°C تا رسیدن به دمای 22°C (۲۲-۲۰) کاهش یافت. همچنین، در سه روز نخست ورود جوجه‌ها به سالن، برنامه نوری ۲۴ ساعت روشنایی و پس

ظرفیت 1400 کیلوگرم و دارای دو شافت^۱ که هر شافت دارای ۱۶ پدال با زاویه 45° درجه است و فشار بخار دو بار از طریق سه شیر تدریجی تزریق بخار اعمال گردید. این دستگاه دو جداره با زاویه 25° درجه از سطح افق تعبیه شده است و جداره داخلی آن به واسطه دارا بودن المنت‌های برقی توانایی آن را دارد که قبل از شروع عملیات فرآوری حرارتی، متناسب با گرمای مورد نیاز در ابتدای فرآوری، گرم شود. این ماشین دارای فیدر هوشمند است و حرکت مواد با توجه به زاویه 45° درجه‌ای که پدال‌ها دارند از سمت پایین به بالا صورت می‌گیرد؛ اما به دلیل شرایط ثقی و وضعیت پدال‌های آخر که به‌صورت معکوس نصب شده‌اند، این مواد به سمت پایین هدایت می‌شوند. کنترل میزان بار خارج شده از دستگاه را یک شیر چرخشی انجام می‌دهد. این دستگاه دارای هفت سنسور دمایی است که میزان حرارت جذب شده توسط مواد را در هفت نقطه نشان می‌دهد. از ویژگی‌های این دستگاه، قدرت فرآوری به صورت قسمت به قسمت و فرآوری به صورت پیوسته بوده که عملیات فرآوری در این طرح قسمت به قسمت انتخاب گردید تا میزان بار ورودی و زمان ماندگاری در کاندیشنر در ابتدا معین باشد. ذرت مورد مطالعه در این آزمایش به مدت ۱۵۰ ثانیه به تفکیک در معرض دماهای (۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتیگراد) قرار گرفت و به‌منظور کاهش رطوبت، عملیات خشک کردن در خشک‌کن و سرد کردن در کولر انجام و سپس کیسه‌گیری و به منظور استفاده در طرح آزمایشی به مزرعه تحقیقاتی ارسال شد. مکمل آنزیمی روابیو^۲ از نوع رقیق شده (ساخت شرکت ادیسو فرانسه) به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک حاوی 6400 واحد سلولاز، 2000 واحد بتاگلوکاناز و 22000 واحد زایلاناز در هر گرم مکمل، مورد استفاده قرار گرفت. چهار نمونه ذرت اشاره شده هر یک به دو قسمت تقسیم و به یک قسمت از هر نمونه، مکمل آنزیمی افزوده شد و در نهایت ۸ نوع جیره ذرت-سویا فراهم گردید. جوجه‌های یک روزه مورد نیاز در این طرح از سویه راس ۳۰۸ و از ایستگاه جوجه‌کشی ثامن واقع در شهرستان چناران، شرکت مرغ مادر دیزباد با میانگین وزن ابتدایی جوجه‌ها 43 گرم فراهم شد. این طرح پژوهشی در قالب دو آزمایش در مرکز تحقیقات طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

آزمایش اول:

به‌منظور تعیین انرژی قابل متابولیسم ظاهری و قابلیت هضم پروتئین خام در یک نمونه ذرت شاهد و سه نمونه ذرت فرآوری شده با و بدون مکمل آنزیمی، 144 قطعه جوجه یک روزه از سویه راس ۳۰۸ (دو قطعه جوجه نر و یک قطعه جوجه ماده در هر تکرار) به ۴۸

۱- هر واحد فعالیت آنزیمی معادل مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید یک میلی مول قند احیا در هر دقیقه در $\text{pH}=4.8$ و دمای 50°C است.

1- Shaft
2- Rovabio®, Adisseo Company, France.

(جدول ۱) در ۴۸ قفس به طور تصادفی توزیع شدند. افزایش وزن و خوراک مصرفی روزانه جوجه‌ها به صورت گرم در روز به ازای هر جوجه برای تمام واحدهای آزمایشی در پایان هر دوره اندازه‌گیری شد.

از آن ۲۳ ساعت رو شنایی و یک ساعت خاموشی تا پایان دوره آزمایش اعمال شد. جیره‌های آزمایشی در برگیرنده هشت نوع فرمول خوراکی بودند که شامل دو جیره پایه براساس ذرت و کنجاله سویا به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت و سه نمونه ذرت فراوری شده در دماهای ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد با و بدون مکمل آنزیمی

جدول ۱- اجزا و ترکیبات شیمیایی محاسبه شده جیره‌های آزمایشی (%)

Table 1- Composition and calculated analysis values (%) of the experimental diets

اجزای خوراک Ingredients	جیره برای تعیین بهره‌وری مواد مغذی (آزمایش ۱) Diet for determination of nutrient utilization (trial1)	آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1-10 d)	رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11-24 d)
ذرت Corn	96.23 ^۱	492.30 ^۲	525.20 ^۲
کنجاله سویا (۴۴٪ پروتئین خام) Soybean meal (44 % Crude protein)	-	416.90	379.00
روغن سویا Soybean oil	-	44.20	54.20
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.94	9.80	9.30
دی‌کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.87	20.10	17.40
مکمل معدنی و ویتامینه ^۳ Trace mineral-vitamin premix ³	0.50	5.00	5.00
لایزین هیدروکلرید L-Lysine HCl	-	1.90	1.20
دی‌ال - متیونین DL-Methionine	-	4.10	3.50
ال - ترئونین L-Threonine	-	1.00	0.60
کلرید سدیم Sodium chloride	0.27	2.90	2.90
بی‌کربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.12	1.20	1.20
کولین کلراید (۶۰٪) Choline chloride (60 %)	0.07	0.60	0.50
ترکیب محاسبه شده Calculated analysis			
انرژی قابل متابولیسم (مگاژول/کیلوگرم) Metabolizable energy (Kcal/kg)	3223	3000	3100
پروتئین خام (%) Crude protein (%)	8.18	23.00	21.50
کلسیم (%) Calcium (%)	0.80	0.96	0.87
فسفر قابل دسترس (%) Available phosphorus (%)	0.39	0.48	0.43
متیونین (%) Methionine (%)	0.17	0.75	0.68

ادامه جدول ۱		Continuation of Table 1	
0.99	1.08	0.31	متیونین + سیستین (%) Methionine + cysteine (%)
1.29	1.44	0.23	لیزین (%) Lysine (%)
0.88	0.97	0.28	ترئونین (%) Threonine (%)
0.16	0.16	0.15	سدیم (%) Sodium (%)
0.24	0.25	0.21	کلر (%) Chloride (%)
236	251	84	تبادل آنیون - کاتیون (میلی اکی والان بر کیلوگرم) DCAB (mEq/Kg) ⁴

^۱ ذرت فرآوری نشده و فرآوری شده در دماهای ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه با و بدون مکمل آنزیمی برای تهیه ۸ جیره استفاده شد تا اثر فرآوری حرارتی و مکمل آنزیمی بر انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم مواد مغذی تعیین شود.

^۲ ذرت فرآوری نشده و فرآوری شده در دماهای ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه با و بدون آنزیم روایو برای تهیه ۸ جیره آزمایشی در دوره‌های آغازین و رشد استفاده شد.

^۳ مکمل ویتامینه و مواد معدنی مواد زیر را در هر کیلوگرم از جیره تأمین می‌کرد: ویتامین A، ۸۸۰۰ واحد بین‌المللی؛ کوله کلسیفرول، ۲۵۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۸۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K3، ۲/۲ میلی‌گرم؛ ویتامین B12، ۰/۰۱ میلی‌گرم؛ تیامین، ۱/۵ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، ۴ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۳۵ میلی‌گرم؛ اسید فولیک، ۰/۵ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۱۵ میلی‌گرم؛ پیردوکسین، ۲/۵ میلی‌گرم؛ اسید پنتوتنیک، ۸ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۵۰ میلی‌گرم بتائین، ۱۹۰ میلی‌گرم؛ روی، ۶۵ میلی‌گرم؛ منگنز، ۷۵ میلی‌گرم؛ سلنیوم، ۰/۲ میلی‌گرم؛ ید، ۰/۹ میلی‌گرم؛ مس، ۶ میلی‌گرم؛ آهن، ۷۵ میلی‌گرم.

^۴ تعادل آنیون - کاتیون جیره

¹ Unprocessed and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s with or without Rovabio® enzyme supplement were used to prepare 8 diets to determine the effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on metabolizable energy and nutrient utilization.

² Unprocessed and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s with or without Rovabio® enzyme supplement were used to prepare 8 experimental diets in starter and grower periods.

³ Supplied per kg of diet: vitamin A as acetate, 8800 IU; Cholecalciferol, 2500 IU; vitamin E (as dl-α tocopherol) 80 IU, vitamin K3, 2.2 mg; Vitamin B12, 0.01 mg, Thiamine, 1.5 mg; Riboflavin, 4 mg; Niacin 35 mg; Folic acid 0.5 mg; Biotin, 0.15 mg; Pyridoxine 2.5 mg; Pantothenate, 8 mg; Choline chloride, 50 mg; Betaine 190 mg; Zinc, 65 mg; Magnesium, 75 mg; Selenium, 0.2 mg; Iodide, 0.9 mg; Copper, 6 mg; Iron, 75 mg.

⁴ Dietary cation-anion balance.

میکروبی در روز کشتار، حدود ۳ گرم از محتویات ناحیه ایلئوم روده کوچک از هر قطعه جوجه کشتار شده به لوله‌های استریل حاوی ۹ میلی‌لیتر بافر فسفات منتقل و لوله‌ها داخل فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ترکیبات تشکیل دهنده بافر شامل کلرید سدیم (NaCl) به مقدار ۸/۵ گرم در لیتر، فسفات هیدروژن سدیم (NaH2PO4) به مقدار ۰/۶۸ گرم در لیتر و سود (NaOH) به مقدار ۰/۱۵ گرم در لیتر بودند. برای این کار لاکتوباسیل در روگوسا آگار و در شرایط بی‌هوازی و سالمونلا در محیط کشت سلینت اف قرار داده شد؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و آنگاه پرگنه‌های تشکیل شده مورد شمارش قرار گرفتند. جهت بررسی بافت‌شناسی ناحیه ژژنوم بافت روده کوچک جوجه‌های مورد آزمایش و تعیین ابعاد پرزهای این ناحیه از هر قطعه جوجه کشتار شده حدود یک تا دو سانتی‌متر از قسمت میانی ژژنوم جدا و پس از شست‌شو با محلول سرم فیزیولوژیک بافر خنثی (با pH حدود ۷/۲) جهت تثبیت، بافت‌ها به ظروف استریل در

به منظور افزایش دقت در اندازه‌گیری افزایش وزن بدن، دانخوری‌ها ۲ ساعت قبل از توزین از دسترس جوجه‌ها خارج می‌شد و برای جوجه‌های تلف شده نیز تصحیح انجام گرفت. مقدار خوراک مصرفی برای هر جوجه با استفاده از فرمول روز مرغ به دست آمد و ضریب تبدیل خوراک برای هر واحد آزمایشی از تقسیم مقدار خوراک مصرفی بر افزایش وزن بدن در کل دوره محاسبه شد. برای تعیین درصد تلفات هر قفس در کل دوره، تلفات هر قفس شمارش و درصد آن نسبت به کل جوجه‌های آن قفس محاسبه گردید. در پایان ۲۴ روزگی نیز یک قطعه پرندۀ نر از هر قفس که وزن آن به میانگین وزنی آن قفس نزدیک بود انتخاب، توزین و کشتار شد. پس از انجام عملیات پوست‌کنی، وزن لاشه، سینه، ران‌ها، مجموع پشت، بال و گردن و همچنین اندام‌های داخلی شامل قلب، طحال، پیش‌مده، سنگدان، کبد، لوزالمعده، بورس فابریسیوس، چربی محوطه شکمی، دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم توزین گردیدند. همچنین طول دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم نیز اندازه‌گیری شد. افزون بر این، جهت بررسی وضعیت

دار که حاوی بافر فرمالین با همان اسیدیته و غلظت ۱۵ درصد بود، همکاران (۱۴) استفاده شد. انتقال و تا زمان اندازه‌گیری بافت‌شناسی روده در یخچال نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری ابعاد پرز و عمق کریپت از روش آجی و

جدول ۲- اثر فرآوری حرارتی و مکمل آنزیمی بر انرژی قابل متابولیسم ظاهری، قابلیت هضم ظاهری پروتئین خام و ماده خشک جوجه‌های گوشتی در سن ۳-۹ روزگی
Table 2- Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on apparent metabolizable energy, apparent digestibility of crude protein and dry matter in broiler chicks on 3 - 9 d

تیمارها Treatments	انرژی قابل متابولیسم ظاهری (کیلوکالری در کیلوگرم) Apparent metabolizable energy (Kcal×kg ⁻¹)	پروتئین خام (%) Crude protein (%)	ماده خشک (%) Dry matter (%)
اثرات اصلی Main effects			
دما ^۱ Temperature ¹			
فرآوری نشده Unprocessed	3052.80	56.80	79.30 ^a
55 °C	3057.70	55.00	77.20 ^{ab}
70 °C	3133.70	58.70	78.10 ^a
85 °C	3061.90	55.90	75.40 ^b
SEM	28.40	0.015	0.008
آنزیم ^۲ Enzyme ²			
-	3093.80	57.80	77.70
+	3059.30	55.50	77.30
SEM	20.08	0.01	0.006
اثرات متقابل Interaction effects			
آنزیم × فرآوری Enzyme × Processing			
- فرآوری نشده Unprocessed	3048.80	56.50	79.30
55 °C	3073.60	56.60	77.50
70 °C	3176.20	60.40	78.30
85 °C	3076.40	57.60	75.80
+ فرآوری نشده Unprocessed	3056.70	57.10	79.20
55 °C	3041.80	53.50	77.00
70 °C	3091.10	57.10	77.90
85 °C	3047.40	54.10	74.90
SEM	40.16	0.021	0.012
احتمال سطح Probabilities, P≤			
فرآوری Processing	0.15	0.38	0.03
آنزیم Enzyme	0.23	0.14	0.60
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.71	0.76	0.98

^۱ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۲آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک به جیره اضافه گردید.

¹Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

²Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ diet.

جدول ۳- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن بدن (گرم)، افزایش وزن (گرم/پرنده)، مصرف خوراک (گرم/پرنده) و ضریب تبدیل (گرم خوراک / گرم افزایش وزن) جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰-۱ روزگی^۱

Table 3- Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on the body weight (g), weight gain (g/bird), feed intake (g/bird) and feed to gain ratio (g feed/g gain) of broiler (1–10 day)¹

تیمارها Treatments	وزن بدن Body weight	افزایش وزن Weight gain	مصرف خوراک Feed intake	ضریب تبدیل Feed per unit gain
اثرات اصلی Main effects				
دما ^۲ Temperature ²				
فرآوری نشده Unprocessed	249.78	21.04	22.38	1.08 ^{ab}
55 °C	249.77	21.01	22.29	1.05 ^b
70 °C	246.72	20.76	22.12	1.07 ^b
85 °C	245.48	20.58	21.11	1.11 ^a
SEM	3.45	0.33	0.60	0.012
آنزیم ^۳ Enzyme ³				
-	244.56	20.52	21.59	1.09
+	251.32	21.18	22.33	1.07
SEM	2.44	0.23	0.42	0.008
اثرات متقابل Interaction effects				
آنزیم × فرآوری Enzyme × Processing				
-				
فرآوری نشده Unprocessed	255.83 ^a	21.65 ^a	21.95	1.07
55 °C	246.75 ^{ab}	20.74 ^{ab}	22.53	1.06
70 °C	238.19 ^b	19.90 ^b	21.30	1.10
85 °C	237.45 ^b	19.78 ^b	20.61	1.14
+				
فرآوری نشده Unprocessed	243.72 ^{ab}	20.43 ^{ab}	22.72	1.09
55 °C	252.78 ^a	21.28 ^a	22.05	1.04
70 °C	255.25 ^a	21.61 ^a	22.95	1.04
85 °C	253.52 ^a	21.38 ^a	21.62	1.09
SEM	4.88	0.47	0.85	0.017
Probabilities, P≤				
فرآوری Processing	0.754	0.746	0.449	0.006
آنزیم Enzyme	0.057	0.058	0.229	0.070
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.016	0.013	0.656	0.131

^{a,b} در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

^۱ هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

^۲ ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۳ آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

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

¹ Each value represents the mean of six replicates (12 birds per replicate).

² Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³ Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg-1 diet.

جدول ۴- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن بدن (گرم)، افزایش وزن (گرم/پرنده)، مصرف خوراک (گرم/پرنده) و ضریب تبدیل (گرم خوراک / گرم افزایش وزن) جوجه‌های گوشتی در سن ۱۱-۲۴ روزگی^۱

Table 4- Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on the body weight (g), weight gain (g/bird), feed intake (g/bird) and feed to gain ratio (g feed/g gain) of broilers (11-24 day)¹

تیمارها Treatments	وزن بدن Body weight	افزایش وزن Weight gain	مصرف خوراک Feed intake	ضریب تبدیل Feed per unit gain
اثرات اصلی Main effects				
دما ^۲ Temperature ²				
فرآوری نشده Unprocessed	952.43	50.21	72.23	1.55
55 °C	945.85	49.71	76.58	1.70
70 °C	954.37	50.52	75.74	1.67
85 °C	954.33	50.63	73.12	1.66
SEM	19.730	1.370	1.920	0.051
آنزیم ^۳ Enzyme ³				
-	943.77	49.95	73.10	1.64
+	959.72	50.59	75.74	1.64
SEM	13.95	0.970	1.350	0.036
اثرات متقابل Interaction effects				
آنزیم × فرآوری Enzyme × Processing				
-				
فرآوری نشده Unprocessed	943.56	49.12	70.64	1.566
55 °C	973.48	51.91	77.13	1.696
70 °C	933.47	49.66	72.77	1.618
85 °C	924.57	49.08	71.84	1.688
+				
فرآوری نشده Unprocessed	961.30	51.25	73.83	1.526
55 °C	918.21	47.52	76.03	1.698
70 °C	975.25	51.43	78.72	1.526
85 °C	984.09	52.18	74.39	1.715
SEM	27.91	1.94	2.71	1.072
Probabilities, P≤				
فرآوری Processing	0.988	0.965	0.335	0.220
آنزیم Enzyme	0.420	0.648	0.176	0.991
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.196	0.222	0.639	0.715

^۱هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

^۲ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۳آنزیم روآبئو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

¹Each value represents the mean of six replicates (12 birds per replicate).

²Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg-1 diet.

آنالیز آماری

نتایج به دست آمده از این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش فاکتوریل، با استفاده از نرم افزار آم - ساری 9.1، SAS، رویه مدل خطی عمومی (GLM) مورد تجزیه آماری قرار گرفتند (۲۵). داده ها برای اثرات اصلی ذرت مختلف مورد استفاده و مکمل آنزیمی و اثرات متقابل فرآوری ذرت $\times$ مکمل آنزیمی آنالیز شدند. کلیه میانگین های مربوط به اثرات اصلی توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0.05$) مقایسه گردیدند. مدل آماری طرح به شرح رابطه ۱ است.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه: Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین جامعه، α_i = اثر ذرت فرآوری شده، β_j = اثر مکمل آنزیمی (استفاده یا عدم استفاده از آنزیم)، $\alpha\beta_{ij}$ = اثر متقابل ذرت فرآوری شده $\times$ مکمل آنزیمی، ε_{ijk} = خطای آزمایش در هر مشاهده می باشد.

نتایج و بحث

تأثیر دماهای مختلف فرآوری ذرت و مکمل آنزیمی بر انرژی قابل متابولیسم ظاهری، پروتئین خام و ماده خشک در جوجه های گوشتی در جدول ۲ نشان داده شده است. فرآوری حرارتی و مکمل آنزیمی اثر معنی داری بر مقدار انرژی قابل متابولیسم ظاهری و قابلیت هضم پروتئین خام نداشت. فرآوری در دمای ۵۵ و ۷۰ درجه سانتی گراد اثر معنی داری بر قابلیت هضم ماده خشک نداشت؛ اما فرآوری در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد در مقایسه با تیمار شاهد آن را کاهش داد ($P < 0.05$). مکمل آنزیمی اثر معنی داری بر قابلیت هضم ماده خشک نداشت. هیچ اثر متقابل معنی داری بین فرآوری ذرت و مکمل آنزیمی بر مقدار انرژی قابل متابولیسم ظاهری، قابلیت هضم پروتئین خام و ماده خشک ذرت مشاهده نشد.

تأثیر فرآوری ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن بدن (گرم)، افزایش وزن (گرم/پرنده)، مصرف خوراک (گرم/پرنده) و ضریب تبدیل خوراک (گرم مصرف خوراک/گرم افزایش وزن) جوجه های گوشتی در سن ۱۰-۱۲ روزگی در جدول ۳ نشان داده شده است. تأثیر فرآوری حرارتی بر وزن بدن جوجه های گوشتی در سن یک تا ۱۰ روزگی و افزایش وزن روزانه و مصرف خوراک معنی دار نبود. ضریب تبدیل غذایی پرندگان تغذیه شده با جیره های حاوی ذرت فرآوری شده در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به طور معنی داری بیشتر از جوجه های دریافت کننده جیره دارای ذرت های فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۷۰ درجه سانتی گراد بود. با این وجود، تفاوت معنی داری با تیمار شاهد وجود نداشت.

اثرات متقابل فرآوری ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن بدن در سن ۱۰ روزگی جوجه ها و افزایش وزن روزانه آنها در دوره آغازین (۱۰-۱۲ روزگی) معنی دار بود ($P < 0.05$). وزن بدن و افزایش وزن روزانه در جوجه های تغذیه شده با جیره های بدون مکمل آنزیمی زمانی که دمای فرآوری افزایش یافت، کاهش نشان دادند ولی در جیره هایی که مکمل آنزیمی داشتند برعکس این حالت مشاهده شد. اثرات متقابل در ارتباط با مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی وجود نداشت. فرآوری ذرت، مکمل جیره با آنزیم و اثرات متقابل آنها تأثیری بر عملکرد رشد ۱۱ تا ۲۴ روزگی (جدول ۴) و دوره یک تا ۲۴ روزگی (جدول ۵) نداشتند. گنزالس-آلوارادو و همکاران (۱۲) در

آزمایشی بر روی ذرت و برنج به صورت خام و مقایسه با ذرت و برنج به صورت پخته مشاهده نمودند که پختن خوراک می تواند باعث بهبود قابلیت هضم مواد مغذی گردد. جیمز-مورنو و همکاران (۱۵) سطوح بالاتر انرژی قابل متابولیسم ظاهری را در جوجه های گوشتی که با ذرت فرآوری شده با بخار تغذیه شده بودند را نسبت به آنهایی که ذرت خام مصرف کردند را گزارش نمودند. همچنین، این محققان عنوان نمودند که فرآوری حرارتی ممکن است برخی از همی سلولزهای موجود در ذرت را محلول نموده و با آزادسازی قندها ممکن است قسمتی از آنها برای پرنده قابل دسترس شده و باعث افزایش انرژی قابل متابولیسم ظاهری ذرت گردد. در آزمایش دیگری، قابلیت هضم ایلئومی نشاسته تحت تأثیر دمای فرآوری در جیره های بر پایه ذرت قرار نگرفت؛ ولی با افزایش دمای فرآوری در جیره بر پایه گندم، قابلیت هضم ایلئومی کاهش یافت (۱). همچنین، سیهوس و هلند (۲۹) بیان داشتند که تغذیه خوراک فرآوری شده (پلت) ممکن است باعث کاهش قابلیت هضم در برخی شرایط گردد. نتایج مطالعه گودزی و همکاران (۱۳) با روش های مختلف فرآوری خوراک نشان داد که قابلیت هضم ایلئومی پروتئین و اسیدهای آمینه در روش فرآوری با زمان طولانی کاهش می یابد. کاهش ضرایب هضمی لیزین و آرژینین به علت واکنش میلارد و افزایش ویسکوزیته است و به علت تخریب بیشتر پلی ساکاریدهای غیرنشاسته ای و تولید نشاسته های پس رفتی و ترکیبات مقاوم، انرژی قابل دسترس کاهش می یابد (۱). در مطالعه حاضر دلیل احتمالی تحت تأثیر قرار نرفتن انرژی قابل متابولیسم ذرت و قابلیت هضم پروتئین آن به قابلیت هضم بالای این دو ماده مغذی در حالت بدون فرآوری ذرت مربوط می باشد که فرآوری و آنزیم توانسته تفاوت معنی داری در قابلیت هضم آنها ایجاد کند. البته در خصوص ماده خشک با توجه به حرارت اعمال شده در طول فرآوری ممکن است این تیمار حرارتی توانسته باشد بر قابلیت هضم ماده خشک موثر باشد. به طور کلی در مطالعه حاضر، آنزیم اثر معنی داری بر افزایش انرژی قابل متابولیسم ظاهری، قابلیت هضم پروتئین خام و قابلیت هضم ماده خشک نداشت. به نظر می رسد از آنجایی که در این آزمایش هیچ گونه ماتریکسی برای آنزیم در نظر گرفته نشد، احتمالاً نتوانسته اثرات مثبت خود را نشان دهد. نتایج به دست آمده در این پژوهش پیشنهاد می کند که احتمالاً زمان فرآوری در این مطالعه به منظور تغییر در ساختار ذرت مناسب نبوده تا منجر به افزایش قابلیت هضم جیره شود. اثر متقابل فرآوری ذرت به همراه مکمل آنزیمی بر انرژی قابل متابولیسم ظاهری، قابلیت هضم پروتئین خام و قابلیت هضم ماده خشک ذرت معنی دار نبود. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود اثر مکمل آنزیمی بر وزن بدن، افزایش وزن روزانه، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی در دوره یک تا ۱۰ روزگی معنی دار نبود.

لوآر و همکاران (۱۷) دریافتند با افزایش دمای فرآوری خوراک از 74°C به 96°C در تغذیه جوجه های گوشتی در دوره ۲۸ تا ۴۲ روزگی، ضریب تبدیل غذایی از $1/96$ به $2/04$ افزایش پیدا کرد. در مطالعه لوآر و همکاران (۱۷) هیچکدام از سطوح مختلف دماهای فرآوری تأثیر معنی داری بر بهبود ضریب تبدیل غذایی نداشتند؛ که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. گنجاندن اجزای خوراکی با قابلیت هضم بالا ممکن است خوراک مصرفی و قابلیت هضم مواد مغذی و عملکرد رشد جوجه های گوشتی را در روزهای

اول زندگی افزایش دهد (۲۱).

جدول ۵- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن بدن (گرم)، افزایش وزن (گرم/پرندۀ)، مصرف خوراک (گرم/پرندۀ) و ضریب تبدیل (گرم خوراک / گرم افزایش وزن) جوجه‌های گوشتی در سن ۱-۲۴ روزگی^۱

Table 5-Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on the body weight (g), weight gain (g/bird), feed intake (g/bird) and feed to gain ratio (g feed/g gain) of broilers (1-24 day)¹

تیمارها Treatments	وزن بدن Body weight	افزایش وزن Weight gain	مصرف خوراک Feed intake	ضریب تبدیل Feed per unit gain
اثرات اصلی Main effects				
دما ^۲ Temperature ²				
فرآوری نشده Unprocessed		38.04	51.42	1.45
55 °C		37.75	53.74	1.56
70 °C		38.13	52.98	1.49
85 °C		38.11	51.16	1.52
SEM		0.82	1.22	0.04
آنزیم ^۳ Enzyme ³				
-		37.68	51.54	1.49
+		38.34	53.11	1.52
SEM		0.58	0.86	0.03
اثرات متقابل Interaction effects				
آنزیم × فرآوری Enzyme × Processing				
-				
فرآوری نشده Unprocessed		37.67	50.24	1.43
55 °C		38.92	54.39	1.53
70 °C		37.26	51.26	1.46
85 °C		36.87	50.29	1.54
+				
فرآوری نشده Unprocessed		38.41	52.60	1.47
55 °C		36.59	53.10	1.59
70 °C		39.00	54.71	1.53
85 °C		39.35	52.04	1.49
SEM		1.16	1.73	0.06
Probabilities, P≤ سطح احتمال				
فرآوری Processing		0.98	0.39	0.36
آنزیم Enzyme		0.42	0.20	0.53
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme		0.19	0.56	0.73

^۱ هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرندۀ در هر تکرار).

^۲ ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۳ آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

¹Each value represents the mean of six replicates (12 birds per replicate).

²Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ diet.

جدول ۶ - تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر خصوصیات لاشه (% وزن بدن) جوچه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی^۱

Table 6-Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on carcass characteristics of broiler chickens at 24 day of age ¹										
تیما رها	لاشه قابل مصرف	ران ها	سینه	پشت و گردن	کبد	پانکراس	قلب	طحال	بورس فابریسیوس	چربی محوطه شکمی
Treatments	Edible carcass	Thighs	Breast	Neck+back	Liver	Pancreas	Heart	spleen	Bursa of Fabricius	Abdominal fat pad
اثرات اصلی										
دما ² Temperature ²										
Unprocessed	60.78	18.00	23.64	19.13	2.53	0.37	0.57	0.10	0.20	0.64
55 °C	60.06	17.84	23.46	18.76	2.59	0.35	0.59	0.12	0.17	0.54
70 °C	60.88	18.39	23.32	19.16	2.45	0.35	0.54	0.12	0.18	0.74
85 °C	60.38	17.76	23.89	18.73	2.67	0.36	0.58	0.12	0.19	0.54
SEM	0.62	0.25	0.48	0.18	0.09	0.016	0.026	0.008	0.015	0.058
آنزیم ³ Enzyme ³										
-	60.25	17.84	23.83	18.57 ^b	2.52	0.38 ^a	0.59	0.12	0.18	0.60
+	60.80	18.15	23.33	19.32 ^a	2.60	0.34 ^b	0.55	0.11	0.19	0.63
SEM	0.44	0.18	0.34	0.13	0.06	0.011	0.018	0.005	0.010	0.041
اثرات متقابل										
فرآوری × آنزیم										
Enzyme × Processing	فرآوری نشده	فرآوری شده	فرآوری نشده	فرآوری شده	فرآوری نشده	فرآوری شده	فرآوری نشده	فرآوری شده	فرآوری نشده	فرآوری شده
-	59.94	17.63	23.60	18.69	2.40	0.40	0.63	0.12 ^{abc}	0.197	0.54
55 °C	60.17	18.01	23.72	18.43	2.58	0.38	0.61	0.14 ^a	0.130	0.52
70 °C	61.20	18.33	24.12	18.75	2.47	0.36	0.55	0.11 ^{abc}	0.199	0.73
85 °C	59.70	17.39	23.88	18.42	2.62	0.36	0.58	0.11 ^{abc}	0.200	0.59
فرآوری نشده	61.63	18.36	23.68	19.58	2.65	0.35	0.52	0.09 ^c	0.207	0.73
Unprocessed	59.95	17.66	23.20	19.08	2.60	0.32	0.56	0.10 ^{bc}	0.217	0.55
55 °C	60.56	18.46	22.53	19.56	2.42	0.35	0.54	0.12 ^{abc}	0.177	0.74
70 °C	61.07	18.12	23.90	19.04	2.71	0.35	0.57	0.13 ^{ab}	0.179	0.48
85 °C	0.88	0.36	0.69	0.26	0.13	0.02	0.037	0.011	0.021	0.083
SEM	Probabilities, P≤									
Processing	0.780	0.32	0.85	0.24	0.39	0.73	0.630	0.440	0.638	0.072
Enzyme	0.390	0.24	0.31	0.0007	0.41	0.03	0.084	0.288	0.394	0.608
فرآوری × آنزیم	0.485	0.40	0.60	0.95	0.72	0.67	0.494	0.046	0.065	0.368
Processing × Enzyme										

abcs: هر سه ستون میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P < 0.05).

هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

abcs: Means within the column with different superscripts differ (P < 0.05).

¹Each value represents the mean of six replicates.

²Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ diet.

شدن پروتئین‌ها باعث دسترسی راحت‌تر پروتئازها می‌گردد. نتایج به‌دست آمده از آزمایش قبادی و کریبی (۱۱) نشان می‌دهد مصرف مکمل آنزیمی در دوره صفر تا ۲۰ روزگی تأثیر معنی‌داری بر وزن بدن

ماسوکوئیتو و همکاران (۱۸) دریافتند که فرآوری خوراک در زمان‌های ۸۰ و ۱۲۰ ثانیه باعث بهبود در قابلیت هضم پروتئین می‌شود. این تأثیر با شکسته شدن پل‌های دی‌سولفیدی و دناتوره

در این مطالعه احتمالاً به تأثیر مثبت آنزیم بر قابلیت هضم مواد مغذی بوده که احتمالاً باعث کاهش عددی وزن نسبی ایلئوم شده است. قبادی و کریمی (۱۱) نیز نشان دادند که مکمل آنزیمی تأثیر معنی داری بر درصد وزن نسبی پیش معده، سنگدان، طول بخش‌های مختلف روده کوچک و چربی محوطه شکمی ندارد.

فرآوری ذرت، مکمل جیره با آنزیم و اثرات متقابل آنها تأثیری بر ویژگی‌های لاشه و مورفولوژی روده در سن ۲۴ روزگی (جدول ۶ و ۷) جوجه‌های گوشتی نداشتند به استثناء اینکه افزودن آنزیم به طور معنی داری وزن نسبی لوزالمعده را کاهش داد ($P < 0.05$).

تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر هیستومورفولوژی جوجه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی در جدول ۸ نشان داده شده است. فرآوری ذرت در دماهای مختلف اثر معنی داری بر ارتفاع پرز نداشت؛ اما مکمل آنزیمی به طور معنی داری آن‌ها افزایش داد ($P < 0.05$). اثر متقابل فرآوری ذرت و مکمل آنزیمی بر ارتفاع پرز معنی دار بود ($P < 0.05$). ارتفاع پرزهای ژژنومی پرندگان تغذیه شده با جیره‌های فاقد مکمل آنزیمی زمانی که دمای فرآوری افزایش یافت، کاهش نشان دادند و برعکس این حالت در جیره‌هایی که با آنزیم مکمل سازی شده بودند، مشاهده شد. تیمار حرارتی ذرت مورد استفاده در جیره، پهنای پرز، عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در ژژنوم جوجه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی را به طور معنی داری تحت تأثیر قرار داد ($P < 0.05$). پهنای پرز پرندگان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ذرت فرآوری شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. عمق کریپت در پرندگان تغذیه شده با جیره‌های حاوی ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به طور معنی داری نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود. با این وجود، این پارامتر در پرندگان تغذیه شده با ذرت فرآوری شده در دمای ۷۰ درجه تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت. نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در پرندگان تغذیه شده با ذرت فرآوری شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به طور معنی داری پایین‌تر از تیمار شاهد بود؛ اما دو تیمار دیگر اختلاف معنی داری را با تیمار شاهد نشان ندادند. فاکتور اصلی مکمل آنزیمی به طور معنی داری ارتفاع پرز و پهنای پرز را تحت تأثیر قرار داد. ارتفاع پرز و عمق کریپت با افزوده شدن آنزیم به جیره‌ها به طور معنی داری افزایش یافتند ($P < 0.05$). عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت پاسخی به مکمل سازی آنزیمی ندادند. اثر متقابل تیمار حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی در خوراک بر ارتفاع پرز در سن ۲۴ روزگی معنی دار شد ($P < 0.05$).

و افزایش وزن روزانه دارد؛ که با نتایج حاصل از این تحقیق تا حدودی مطابقت دارد. به طوریکه استفاده از مکمل آنزیمی سبب افزایش وزن بدن، افزایش وزن روزانه و افزایش خوراک مصرفی شد. اثرات سودمند مکمل زایلاناز و آمیلاز بر ویسکوزیته روده و قابلیت دسترسی مواد مغذی در جیره‌های بر پایه ذرت پخته یا فلیک شده در 145°C و به مدت ۱۰ دقیقه نسبت به حالت فرآوری نشده بیشتر مشخص شد (۲ و ۳۰). نتایج پژوهشی کویسون و همکاران (۹) نشان می‌دهد که مصرف مکمل آنزیمی در سن یک تا ۲۱ روزگی جوجه‌های گوشتی بر مصرف خوراک تأثیر معنی داری نداشته ولی بر افزایش وزن روزانه تأثیر معنی داری داشته است که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. احتمالاً با توجه به پیشرفت‌هایی که از لحاظ ژنتیکی در جوجه‌های گوشتی صورت گرفته است باعث شده است تا این پرندگان توانایی بیشتری در استفاده و بهره‌وری بالاتر از ذرت داشته باشند و این در حالی است که در پژوهش حاضر احتیاجات جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ با توجه به جداول سویه راس (۵) به صورت کامل فراهم شده‌اند و مکمل آنزیمی به صورت سرک استفاده شده است. بنابراین احتمال آن وجود دارد که فرآوری در این دماها نتوانسته است تفاوت معنی داری بین تیمارهای مختلف ایجاد نماید. محققان بیان کردند که عملکرد جوجه‌های گوشتی توسط پختن یا فلیک کردن ذرت یا افزودن آنزیم، فقط در سن یک تا ۴ روزگی تحت تأثیر قرار گرفت که در این دوران افزایش وزن و بازدهی خوراک با افزودن آنزیم بهبود یافت (۱). فرآوری کمتر از 85°C برای عملکرد جوجه‌های گوشتی مناسب بوده و دمای فرآوری در 95°C منتج به افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل ضعیف‌تر می‌شود (۱). در مطالعه‌ای که توسط عبدالهی و همکاران (۱) انجام گردید خوراک مصرفی به ازای اضافه وزن بدن در پرندگان تغذیه شده با ذرت با افزایش دمای فرآوری، افزایش یافت. در جیره‌های ذرت قابلیت هضم نشاسته در ایلئوم تحت تأثیر قرار نگرفت قابلیت هضم ایلئومی نیتروژن جیره بر پایه ذرت که در 75°C فرآوری شده بود، کمتر از آنهایی بود که در ۶۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد فرآوری شده بودند در حالی که افزایش دمای فرآوری اثرات مختلفی بر افزایش وزن و مصرف خوراک در پرندگانی که از ذرت یا گندم استفاده می‌کنند، دارد و به طور منفی بر خوراک مصرفی به ازای افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی تا سن ۲۱ روزگی اثر می‌گذارد. در پژوهش عبدالهی و همکاران (۱) قابلیت هضم ایلئومی ماده خشک، پروتئین خام یا نشاسته جیره‌های پلت شده تحت تأثیر زمان‌های فرآوری قرار نگرفت همچنین این پژوهشگران تأثیری از دمای فرآوری بر AME نیافتند. در پژوهش حاضر احتمالاً با توجه به اینکه مکمل آنزیمی دارای آنزیم‌های کربوهیدراز، پکتیناز و پروتئاز است توانسته است فشار تحمیل شده بر لوزالمعده را برداشته و این غده ترش‌تری ترشح مازاد بر نیاز نداشته و احتمالاً باعث وزن نسبی کمتر آن شده باشد (جدول ۶). تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن نسبی قسمت‌های مختلف روده کوچک در جدول ۷ نشان داده شده است، همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، کاهش وزن نسبی ایلئوم

جدول ۷- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر وزن نسبی قسمت‌های مختلف روده کوچک (% وزن زنده) و مقایسه طول آنها (برحسب سانتی‌متر) در جوجه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی^۱

Table 7-Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on gut morphology of broiler chickens at 24 day of age¹

تیمارها Treatments	درصد از وزن زنده % of live weight					روده کوچک (سانتی متر) Small intestine (cm)	دئودنوم (سانتی متر) Duodenu m (cm)	ژژنوم (سانتی متر) Jejunu m (cm)	ایلئوم (سانتی م تر) Ileum (cm)	
	پیش معده Proventricul us	سگداند Gizzar d	دئودنوم duodenu m	ژژنوم Jejunu m	ایلئوم Ileu m					
اثرات اصلی Main effects										
دما ^۲ Temperatur e ²										
فرآوری نشده Unprocesse d	0.62	2.01	1.05	1.70	1.25	190.81	31.50	76.68	82.62	
55 °C	0.61	2.14	1.01	1.83	1.29	195.06	33.81	80.12	81.12	
70 °C	0.60	2.13	1.00	1.82	1.26	188.06	35.93	75.37	76.75	
85 °C	0.59	2.27	1.04	1.73	1.28	183.62	31.75	73.68	78.18	
SEM	0.044	0.076	0.045	0.074	0.04 9	5.77	2.92	2.15	2.39	
آنزیم ^۳ Enzyme ³										
-	0.61	2.16	1.02	1.80	1.32	189.43	32.00	77.56	79.87	
+	0.61	2.12	1.03	1.73	1.22	189.34	34.5	75.37	79.46	
SEM	0.031	0.054	0.032	0.052	0.03 4	4.08	2.07	1.52	1.69	
اثرات متقابل Interaction effects										
آنزیم × Enzyme ×	فرآوری Processing									
-	فرآوری نشده Unprocesse d	0.69	2.14	1.00	1.70	1.30	192.37	31.62	77.00	83.75
	55 °C	0.56	2.21	1.06	1.97	1.36	203.50	35.87	84.50	83.12
	70 °C	0.61	2.00	0.94	1.79	1.28	180.12	29.00	74.75	76.37
	85 °C	0.56	2.27	1.08	1.75	1.32	181.75	31.50	74.00	76.25
+	فرآوری نشده Unprocesse d	0.55	1.87	1.10	1.70	1.20	189.25	31.37	76.37	81.50
	55 °C	0.67	2.07	0.97	1.69	1.22	186.62	31.75	75.75	79.12
	70 °C	0.59	2.26	1.06	1.85	1.24	196.00	42.87	76.00	77.12
	85 °C	0.62	2.27	1.00	1.70	1.23	185.50	32.00	73.37	80.12
	SEM	0.063	0.10	0.065	0.104	0.06 9	8.16	4.14	3.05	3.38
Probabilities, P≤										
	فرآوری Processing	0.96	0.14	0.830	0.516	0.93 9	0.566	0.686	0.214	0.311
	آنزیم Enzyme	0.98	0.62	0.801	0.373	0.07 0	0.987	0.401	0.320	0.866
	فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.24	0.10	0.249	0.411	0.91 1	0.266	0.174	0.379	0.669

^۱هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

^۲ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۳آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

^۱Each value represents the mean of six replicates.

^۲Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

^۳Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ diet.

جدول ۸- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر هیستومورفولوژی ژژنوم جوجه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی^۱

Table 8-Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on jejunum histomorphology of broiler chickens at 24 day of age¹

تیمارها Treatments	ارتفاع پرز (میکرومتر) Villi height (μm)	پهنای پرز (میکرومتر) Villi width (μm)	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt depth (μm)	ارتفاع پرز به عمق کریپت Villi width to Crypt depth
اثرات اصلی Main effects				
دما ^۲ Temperature ²				
فرآوری نشده Unprocessed	733.50	155.75 ^b	155.25 ^c	4.78 ^a
55 °C	737.00	176.25 ^b	174.50 ^b	4.30 ^{ab}
70 °C	745.50	200.25 ^a	166.75 ^{bc}	4.51 ^{ab}
85 °C	767.16	161.50 ^b	194.58 ^a	3.94 ^b
SEM	15.81	7.78	6.49	0.20
آنزیم ^۳ Enzyme ³				
-	728.62 ^b	164.25 ^b	174.12	4.25
+	762.95 ^a	182.62 ^a	171.41	4.51
SEM	11.18	5.50	4.59	0.141
اثرات متقابل Interaction effects				
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme				
- فرآوری نشده Unprocessed	192.37	31.62	77.00	83.75
55 °C	203.50	35.87	84.50	83.12
70 °C	180.12	29.00	74.75	76.37
85 °C	181.75	31.50	74.00	76.25
+ فرآوری نشده Unprocessed	189.25	31.37	76.37	81.50
55 °C	186.62	31.75	75.75	79.12
70 °C	196.00	42.87	76.00	77.12
85 °C	185.50	32.00	73.37	80.12
SEM	8.16	4.14	3.048	3.38
Probabilities, P≤				
فرآوری Processing	0.566	0.686	0.214	0.311
آنزیم Enzyme	0.987	0.401	0.320	0.866
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.266	0.174	0.379	0.669

^{a,b,c} در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

^۱ هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

^۲ ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۵۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

^۳ آنزیم روایو از شرکت ادیسو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلو در تن خوراک اضافه گردید.

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

¹ Each value represents the mean of six replicates.

² Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³ Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ diet.

جدول ۹- تأثیر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر شمار باکتریایی محتویات ایلئوم جوجه‌های گوشتی در سن ۲۴ روزگی^۱
Table 9-Effect of corn thermal processing and enzyme supplementation on microbial count (Log₁₀CFU/g) of ileum contents in broiler chickens at 24 day of age¹

تیمارها Treatments	لاکتوباسیل‌ها Lactobacillus	بیفیدوباکتریها Bifidobacterium	کلوستریدیوم Clostridium	ای-کولای Escherichia Coli	سالمونلا Salmonella
اثرات اصلی Main effects					
دما ^۲ Temperature ²					
فرآوری نشده Unprocessed	4.73	6.44 ^b	5.19	1.57	ND یافت نشد
55 °C	4.69	6.93 ^{ab}	5.23	1.52	ND یافت نشد
70 °C	4.73	7.07 ^a	5.59	1.76	ND یافت نشد
85 °C	4.58	6.40 ^b	5.21	1.52	ND یافت نشد
SEM	0.282	0.192	0.249	0.103	-
آنزیم ^۳ Enzyme ³					
-	6.48 ^b	5.20	1.69	4.71	ND یافت نشد
+	6.93 ^a	5.41	1.50	4.66	ND یافت نشد
SEM	0.135	0.176	0.072	0.199	
اثرات متقابل Interaction effects					
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme					
-					
فرآوری نشده Unprocessed	6.19	4.97	1.55	4.61	ND یافت نشد
55 °C	6.54	4.93	1.60	4.58	ND یافت نشد
70 °C	7.12	5.78	1.92	5.05	ND یافت نشد
85 °C	6.09	5.12	1.70	4.59	ND یافت نشد
+					
فرآوری نشده Unprocessed	6.69	5.40	1.60	4.85	ND یافت نشد
55 °C	7.32	5.54	1.45	4.80	ND یافت نشد
70 °C	7.01	5.39	1.60	4.41	ND یافت نشد
85 °C	6.71	5.30	1.35	4.58	ND یافت نشد
SEM	0.271	0.352	0.145	0.399	
Probabilities, P≤ سطح احتمال					
فرآوری Processing	0.044	0.639	0.330	0.979	
آنزیم Enzyme	0.027	0.420	0.072	0.867	
فرآوری × آنزیم Processing × Enzyme	0.401	0.527	0.501	0.666	

^{a,b} در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P < 0.05).

^۱ هر کدام از مقادیر یاد شده میانگین ۶ تکرار است (۱۲ پرنده در هر تکرار).

ذرت فرآوری نشده و ذرت فرآوری شده در دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه.

آنزیم روابیو از شرکت ادیسئو (فرانسه) تهیه شد و به میزان نیم کیلوگرم در تن خوراک اضافه گردید.

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

¹ Each value represents the mean of six replicates.

² Unprocessed corn and processed corn at temperatures 55, 70 and 85 °C for 150 s.

³ Rovabio® enzyme was provided from Adisseo company (France) and supplemented at the rate of 0.50 g×kg⁻¹ c diet.

قابل تخمیر را به منظور استفاده لاکتوباسیل ها بهبود دهد (۱۳). این موضوع با پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه گودرزی و همکاران (۱۳) افزایش دمای فرآوری منجر به افزایش تعداد لاکتوباسیل ها در چینه دان و ایلئوم شد در حالی که به نظر می رسد کلسترییدیوم و انتروباکترها تحت تأثیر قرار نگرفتند.

نتیجه گیری کلی

فرآوری ذرت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و استفاده از آن در جیره آردی جوجه های گوشتی قابلیت هضم ماده خشک ذرت را به طور معنی داری بهبود بخشید؛ اما اثر معنی داری بر قابلیت هضم پروتئین خام و مقدار انرژی قابل متابولیسم ذرت نداشت. فرآوری ذرت ضریب تبدیل خوراک در سن ۱۰-۱ روزگی به طور معنی داری بهبود داد؛ اما اثری بر افزایش وزن و خوراک مصرفی جوجه ها در این دوره نداشت. صفات عملکرد رشد در دوره رشد (۲۴-۱۱ روزگی) و کل دوره آزمایش (۲۴-۱ روزگی) تحت تأثیر تیمارها و اثرات متقابل آنها قرار نگرفت. افزودن آنزیم کربوهیدراز به جیره باعث کاهش معنی دار وزن نسبی لوزالمعده گردید. فرآوری ذرت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و استفاده از آن در جیره، شاخص های بافت شناسی بخش ژژنوم روده کوچک را بهبود داد. جمعیت لاکتوباسیل ها در محتویات ایلئوم تحت تأثیر فرآوری و مکمل آنزیمی افزایش معنی داری نشان داد اما جمعیت بیفیدوباکترها، اشریشیا کولای و کلسترییدیوم تحت تأثیر فرآوری، افزودن آنزیم و اثر متقابل آنها قرار نگرفت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی شرکت آرونا (نماینده شرکت ادیسو در ایران)، مساعدت فنی شرکت آسیاب و همراهی مدیریت و پرسنل شرکت خوراک دام و طیور در خانه خراسان رضوی که امکان فرآوری ذرت را فراهم نمودند، تقدیر و تشکر می گردد.

همچنین افزایش ارتفاع پرزهای ژژنوم پرندگان تغذیه شده با جیره های مکمل شده توسط آنزیم با افزایش دمای فرآوری نسبت به زمانی که پرندگان از جیره های فاقد آنزیم تغذیه شدند، بیشتر مشهود بود. به عبارت دیگر، آنزیم در خوراک های فرآوری شده در دماهای بالاتر به نحو مؤثرتری عمل کرد. اثرات متقابل آنزیم و فرآوری حرارتی در رابطه با پهنای و عمق کریپت و نسبت بین ارتفاع پرز به عمق کریپت معنی دار نبودند. به نظر می رسد بهبود معنی دار در مشخصات ظاهری پهنای پرز، عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت احتمالاً تحت تأثیر اثرات مثبت فرآوری حرارتی ذرت قرار گرفته و این اثرات مثبت در جذب مواد مغذی مؤثر بوده اند. در مطالعه حاضر با توجه به اینکه مکمل آنزیمی به قابلیت دسترسی مواد مغذی کمک می کند، احتمال آن وجود دارد تا این مکمل آنزیمی به رشد بیشتر پرزهای روده کوچک کمک نموده است و با توجه به نتایج آزمایش حاضر، ممکن است فرآوری حرارتی به همراه آنزیم توانسته قابلیت هضم ذرت را افزایش و باعث رشد پرزها شده است همچنین اثرات مضر فاکتورهای ضد تغذیه ای در ذرت را از بین برده و با کنار زدن لایه های مختلف دیواره سلولی توسط آنزیم و همچنین تأثیر مثبت حرارت بر این لایه های سلولی، آنزیم های اندوژنوس به شکل کارآمدتر و بهتری توانسته اند به وظایف ذاتی خود عمل نمایند.

اثر فرآوری حرارتی ذرت و مکمل آنزیمی بر شمارش باکتریایی ایلئوم جوجه های گوشتی در سن ۲۴ روزگی در جدول ۹ نشان داده شده است. همان طور که در این جدول مشاهده می شود بیفیدوباکترها، ای کولای و جمعیت کلوسترییدیومی در محتویات ایلئومی تحت تأثیر فرآوری، مکمل آنزیمی و اثرات متقابل آنها قرار نگرفته است. سالمونلا در نمونه ها یافت نشد. با این وجود فرآوری ذرت و افزودن آنزیم به جیره جوجه های گوشتی به طور معنی داری جمعیت لاکتوباسیل ها را تحت تأثیر قرار داد ($P < 0.05$). جمعیت لاکتوباسیل ها توسط دمای فرآوری ذرت در ۷۰ درجه سانتیگراد نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. احتمالاً خوراک اکسپند شده، اندازه ساختار میکرو سکویی ذرات را کاهش داده که به دنبال آن دان سینه خوراک کاهش و حلالیت فیبر افزایش می یابد که ممکن است قابلیت دسترسی کربوهیدرات های

منابع

1. Abdollahi, M. R., V. Ravindran, T. J. Wester, G. Ravindran, and D. V. Thomas. 2010. Influence of conditioning temperature on performance, nutrient utilization and digestive tract development of broilers fed on maize- and wheat-based diets. *British Poultry Science*, 51: 648-657.
2. Amerah, A. M., C. Gilbert, P. H. Simmins, and V. Ravindran. 2010. Influence of feed processing on the efficacy of exogenous enzymes in broiler diets. *World's Poultry Science Journal*, 67: 29-46.
3. Amuzmehr, A., B. Dastar, M. Shamse-Shargh, and S. Zrehdaran. 2010. Effect of different levels of raw and processing rice bran on performance of broiler chicks. *Animal Sciences*, 1: 33-27. (In Persian)
4. AOAC International. 2006. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
5. Aviagen. 2014. Nutrition Specifications Manual: Ross 308. Aviagen Ltd., Scotland, UK.

6. Boorman N., and J. McNab. 2002. Poultry Feedstuffs: Supply, Composition and Nutritive Value (Poultry Science Symposium) First Edition. CABI publishing Co., London, UK.
7. Choct, M. 1999. Soluble non-starch polysaccharides affect net utilization of energy by chickens. Recent Advances in Animal Nutrition in Australia, 12: 31-35.
8. Cowieson, A. J. 2005. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. Animal Feed Science and Technology, 119: 293-305.
9. Cowieson, A. J., M. Hruby, and M. F. Isaksen. 2005. The effect of conditioning temperature and exogenous xylanase addition on the viscosity of wheat-based diets and the performance of broiler chickens. British Poultry Science, 46: 717-724.
10. Fathi, M. H. 2010. Animal feeds Evaluation. Ayizh publishing Co., Tehran, Iran.
11. Ghobadi, Z., and A. Karimi. 2012. Effect of feed processing and enzyme supplementation of wheat-based diets on performance of broiler chicks. Journal of Applied Animal Research, 40: 260-266.
12. Gonza'lez-Alvarado, J. M., E. Jime'nez-Moreno, R. La'zaro, and G. G. Mateos. 2007. Effect of type of cereal, heat processing of the cereal and inclusion of fiber in the diet on productive performance and digestive traits of broilers. Poultry Science, 86: 1705-1715.
13. Goodarzi Boroojeni, F., W. Vahjen, A. Mader, F. Knorr, I. Ruhnke, I. Rohe, A. Hafeez, C. Villodre, K. Manner, and J. Zentek. 2014. The effect of different thermal treatments and organic acid levels in feed on microbial composition and activity in gastrointestinal tract of broilers. Poultry Science, 93: 1440-1452.
14. Iji, P. A., R. J. Hughes, M. Choct, and D. R. Tivey. 2001. Intestinal structure and function of broiler chickens on wheat-based diets supplemented with a microbial enzyme. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 14: 54-60.
15. Jime'nez-Moreno, E., J. M. Gonza'lez-Alvarado, R. La'zaro, and G. G. Mateos. 2009. Effect of type of cereal, heat processing of the cereal and fiber inclusion in the diet on gizzard pH and nutrient utilization in broilers at different ages. Poultry Science, 88: 1925-1933.
16. Leeson, S., and J. D. Summers. 2001. Scott's nutrition of the chicken. 4th edition. Nottingham University Press, London, UK.
17. Loar, R. E., K. G. S. Wamsley, A. Evans, J. S. Moritz, and A. Corzo, 2014. Effects of varying conditioning temperature and mixer-added fat on feed manufacture efficiency, 28-to-42-day broiler performance, early skeletal effect, and true amino acid digestibility. Journal of Applied Poultry Research, 23: 444-455.
18. Massuqueto, A., J. F. Durao, V. G. Schramm, M. V. T. Netto, E. L. Krabbe, and A. Maiorka. 2017. Influence of feed form and conditioning time on pellet quality, performance and ileal nutrient digestibility in broilers. Journal of Applied Poultry Research, 27: 51-58.
19. Mathison, G. W. 1996. Effects of processing on the utilization of grain by cattle. Animal Feed Science and Technology, 58: 113-125.
20. Medel, P., M. A., Latorre, C. De Blas, R. Lazaro, and G. G. Mateos. 2004. Heat processing of cereals in mash or pellet diets for young pigs. Animal Feed Science and Technology, 113: 127-140.
21. Omede, A. A., and P. A. Iji. 2018. Response of broiler chickens to processed soy protein product when offered at different inclusion levels in mash or crumbled prestarter diets. Journal of Applied Poultry Research, 27: 159-171.
22. Pickford, J. R. 1992. Effect of processing on the stability of heat labile nutrients in animal feeds. Pages 177-192 in Recent Advances in Animal Nutrition. Cole D. J., Haresing W. Ed. Butterworth-Heinemann Ltd. UK.
23. Pirgozliev, V. R., C. L. Birch, S. P. Rose, P. S. Kettlewell, and M. R. Bedford. 2003. Chemical composition and the nutritive quality of different wheat cultivars for broiler chickens. British Poultry Science, 44: 464-475.
24. Ravindran, V., Z. V. Tilman, P. C. H. Morel, G. Ravindran, and G. D. Coles. 2007. Influence of β -glucanase supplementation on the metabolisable energy and ileal nutrient digestibility of normal starch and waxy barleys for broiler chickens. Animal Feed Science and Technology, 134: 45-55.
25. SAS Institute Inc. 2004. User's guide, version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
26. Seena, S., K. R. Sridhar, A. B. Arunb, and C. C. Young. 2006. Effect of roasting and pressure-cooking on nutritional and protein quality of seeds of mangrove legume Canavalia Cathartica from southwest coast of India. Journal of Food Comparative Analysis, 19: 284-293.
27. Silversides, F. G., and M. R. Bedford. 1999. Effect of pelleting temperature on the recovery and efficacy of a xylanase enzyme in wheat-based diets. Poultry Science, 78: 1184 -1190.
28. Skoch, E. R., K. C. Behnke, C. W. Deyoe, and S. F. Binder. 1981. The effect of steam- conditioning rate on the pelleting process. Animal Feed Science and Technology, 6: 83-90.
29. Svihus, B., A. K. Uhlen, and O. M. Harstad. 2005. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch. Animal Feed Science and Technology, 122: 303-320.
30. Sylvanus, D. P. O, P. K. Malumba, Y. Beckers, and B. Francois. 2015. Impact of drying and heat treatment on the feeding value of corn. A review. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 19: 301-312.

31. Tiemouri, H., H. Zarghi, and A. Golian. 2017. Effect of enzyme supplementation on metabolic energy, digestibility of dry matter and crude protein in barley in broiler chickens. Iranian Journal of Animal Science Research, 10: 513-523. (In Persian)
32. Wiseman, J. 2000. Correlation between physical measurements and dietary energy values of wheat for poultry and pigs. Animal Feed Science and Technology, 84: 1-11.



Determination of Metabolizable Energy of Corn Processed at Different Temperatures and Effect of their Inclusion in Mash Diets with and without Enzyme Supplementation on Growth Performance and Small Intestine Morphology of Broiler Chickens During 1-24 days

Mohsen Teymouri¹, Ahmad Hassanabadi^{2*}, Hassan Nasiri-Moghaddam², Abolghasem Golian²

Submitted: 18-10-2019

Accepted: 06-01-2020

Teymouri, M., A. Hassanabadi, H. Nasiri-Moghaddam, and A. Golian. 2021. Determination of Metabolizable Energy of Corn Processed at Different Temperatures and Effect of their Inclusion in Mash Diets with and without Enzyme Supplementation on Growth Performance and Small Intestine Morphology of Broiler Chickens During 1-24 days. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):369-388.

Introduction Corn is one of the most important cereals used for poultry feeding due to its high starch, available energy and protein. Starch is an important source of energy in cereals and it is important to pay attention to its availability. In the cell wall of the endosperm, cereal grains, contain some of the structural carbohydrates that are soluble in the small intestine and have high molecular weight which may cause viscosity. Positive physical and chemical changes by steam conditioning, include starch gelatinization, denaturation of digestive enzyme inhibitor proteins, and cell wall breakage. Regardless of NSP content, some amounts of nutrients pass through the birds gut without being digested in corn-soy diets. Supplementing broiler diets with exogenous enzymes to degrade NSP has been a useful tool to release energy and nutrients, which can increase the value of low quality corn in poultry feeds and improve growth performance.

Materials and Methods This project was conducted at the Poultry Research Center of Ferdowsi University of Mashhad. A batch of corn grains was obtained from a commercial supplier and ground in a hammer mill to pass through screen sizes of 3.0 and 5.0 mm for starter (1-10 d) and grower (11-24 d) periods, respectively. First trial: Apparent metabolizable energy (AME) and digestibility of corn crude protein (CP) and dry matter (DM) were determined in basal diets, which the corn was the sole source of ME and CP. Basal diets contained the conditioned (at temperatures of 55, 70 and 85 °C) or unconditioned corn and was or was not supplemented with enzyme (Rovabio®; Adisseo, France) at the amount of 0.5 g/kg diet. Total excreta collection was performed with 144 chicks in 8 treatments with 6 replicates and 3 birds each, during 7 to 9 days of age using battery cages. Excreta from each replicate cage were collected early in the morning and in the evening. After removing feathers, feed residues, and other contamination sources, excreta were air dried in an oven at 55 °C for 72 hours. Then the excreta were weighed and homogenized, then a sample of approximately 30% of the excreta was randomly separated and kept at -20 °C to further analysis. Then, dried excreta samples were ground in a micro-mill and submitted to the Animal Nutrition Lab. Feed and excreta dry matter, gross energy, and nitrogen contents were determined. Second trial: In second trial, 576 d-old broilers from Ross 308 strain with initial BW of 43 g, were fed with mash diets containing conditioned corn which was or was not supplemented with enzyme, during starter (1-10 d) and grower (11-24 d) periods. The experiment was done based on a completely randomized design with 4 × 2 factorial arrangement of treatments evaluating four corn conditioning temperatures (unconditioned and conditioned at 55, 70 and 85 °C) and two enzyme (Rovabio®; Adisseo, France) levels (0 and 0.5 g/kg diet). chicks were assigned under eight treatments with 6 floor pen replicates. Each floor pen of 1.2 × 1 × 0.8 m (L × W × H) included 12 chicks (6 male and 6 female,

1- Ph.D student, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

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

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

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.83851

equally for all replicates). Floor pens were covered with 1.5 Kg/m² of wood shavings. Four of eight experimental diets were supplemented with 0.5 g/kg of a multiple enzyme complex composed of cellulases, 6400 unit; β -glucanase, 2000 unit and Xylanase 22000 unit per gram (Rovabio[®], Adisseo, France). Corn-soy-based diets were formulated to meet the Ross 308 strain recommendations for major nutrients for starter and grower phases. Feed and water were supplied for ad libitum consumption throughout the trial with a tube feeder and two nipple drinkers in each floor pen. House temperature was initially set at 32 °C on day one and was decreased linearly by 0.5 °C per d to a temperature of 21 °C. During the experiment, the lighting program consisted of 23L:1D. A completely randomized design with 4×2 factorial arrangement was used in the both trials. Main factors were included corn conditioning temperatures (unconditioned and conditioned at 55, 70 and 85 °C) and two enzyme levels (0 and 0.5 g/kg diet). The data were analyzed using generalized linear model (GLM) procedure, SAS software (9.4) and the differences between them was tested by Duncan's test ($P \leq 0.05$).

Results and Discussion Conditioning and enzyme supplementation had no significant effects on AME and CP digestibility. Conditioning at 80 °C decreased DM digestibility of corn in comparison to control group ($P < 0.05$). Enzyme had no significant effect on DM digestibility. In second trial, there were no significant differences in productive performance among treatments during 11-24 d and the accumulated period (1 to 24 d). Feed conversion ratio (FCR) of the birds fed diets containing conditioned corn at 85 °C was significantly more than that of 55 and 70 °C diets during 1-10 d; although it was not significantly different with control group. Neither corn conditioning nor enzyme supplementation had significant effect on carcass characteristics, and small intestine segments length and weight at 24 d. Enzyme supplementation significantly increased villi height and width at 24 d ($P < 0.05$). Corn conditioning significantly increased villi width and crypt depth but decreased villi width to crypt depth ratio. Bifidobacteria, E. coli and clostridia population in the ileal contents were not affected by corn conditioning and enzyme supplementation. Lactobacillus population was increased by enzyme addition and also by corn conditioning at temperature 70 °C in compare to control group. These results are in agreement with those reported by Gonza'lez-Alvarado et al. (2007) who reported no significant differences in growth performance of broiler chicks fed heat treated corn-based diets. However, negative effect of higher pelleting temperatures on the WG of birds fed corn-based diets have also been reported. They showed that pelleting a corn-soybean meal diet at 65 °C resulted in higher weight gain compared to the basal mash diet and diets pelleted at 75 and 85 °C.

Conclusion In general, corn conditioning and enzyme supplementation did not improve growth performance and nutrient utilization but improved gut histomorphology and microbial status.

Key words: Broiler, Corn Conditioning, Jejunum, Microbial count, Performance.



مقاله علمی - پژوهشی

اثرات تزریق داخل تخم سین بیوتیک بر درصد جوجه درآوری، کیفیت جوجه، فراسنجه‌های خونی و عملکردی جوجه‌های تازه تفریخ شده بلدرچین ژاپنی

شادی اسعدی^۱، محسن دانشیار^{۲*}، یونس علی‌جو^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۳

اسعدی، ش.، م. دانشیار، و ی. علی‌جو. ۱۴۰۰. اثرات تزریق داخل تخم سین بیوتیک بر درصد جوجه درآوری، کیفیت جوجه، فراسنجه‌های خونی و عملکردی جوجه‌های تازه تفریخ شده بلدرچین ژاپنی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۳۸۹-۴۰۴.

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر تزریق محلول سین بیوتیک در تخم‌های بلدرچین ژاپنی بر جوجه درآوری، کیفیت و وزن جوجه یک‌روزه و فراسنجه‌های خونی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۳۷۵ عدد تخم نطفه‌دار بلدرچین ژاپنی در قالب یک طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد پژوهش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (بدون تزریق)، تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر و تزریق سطوح ۱، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سین بیوتیک (بیوپ، محصول شرکت زیست درمان ماهان-ایران) در آب مقطر می‌باشند. تزریق در روز ۸ انکوبا سیون به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین ژاپنی صورت گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که تزریق سطوح ۱، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سین بیوتیک به داخل تخم بلدرچین موجب کاهش جوجه درآوری گردید. به طوری که در گروه شاهد با ۹۱/۳۵ درصد بیشترین میزان هچ و در تیمار ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سین بیوتیک با ۵۹/۲۹ درصد کمترین میزان هچ مشاهده شد. تزریق یک میکروگرم سین بیوتیک باعث بهبود افزایش وزن در هفته دوم، افزایش مصرف خوراک در هفته دوم و سوم و افزایش ضریب تبدیل خوراک در هفته سوم گردید. تزریق بیش از ۱ میکروگرم سین بیوتیک به کیسه هوایی تخم بلدرچین باعث افزایش مصرف خوراک در هفته‌های دوم، سوم و پنجم پرورش و ضریب تبدیل خوراک در هفته سوم گردید. همچنین تزریق سین بیوتیک تأثیری بر وزن و کیفیت جوجه‌های یک‌روزه نداشت. بعلاوه، عدم تأثیر تزریق داخل تخم بلدرچین بر خصوصیات لاشه، اندام‌های داخلی و فراسنجه‌های خونی نداشت. به طور کلی نتایج آزمایش اخیر نشان داد که تزریق ۱ میکروگرم سین بیوتیک موجب بهبود افزایش وزن و افزایش مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک می‌گردد. تزریق بیش از یک میکروگرم سین بیوتیک به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین ژاپنی موجب کاهش جوجه درآوری و افزایش مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک گردید ولی تأثیری بر خصوصیات لاشه، اندام‌های داخلی و فراسنجه‌های خونی بلدرچین‌های ژاپنی نداشت. بر اساس نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد تزریق سطح یک میکروگرم می‌تواند در بهبود عملکرد جوجه‌ها مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: بلدرچین ژاپنی، تزریق داخل تخم مرغی، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک، کیفیت جوجه یک‌روزه، عملکرد رشد.

مقدمه

کمتر، عملکرد بالاتر، وضعیت ایمنی سلامت بهتر (تولیدات عاری از باقی‌مانده داروهای ارتقاء دهنده رشد مثل آنتی‌بیوتیک‌ها) انجام دهد. تأثیر اصلی آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد از طریق ایجاد تغییرات در جمعیت میکروبی دستگاه گوارش است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد به دلیل افزایش نگرانی‌ها در رابطه با ایجاد سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین به واسطه ابقای

در قرن حاضر، صنعت پرورش طیور با چالش‌های جدیدی روبرو بوده است. اصلاح نژاد طیور به منظور پاسخ‌گویی به افزایش جمعیت و متعاقب آن افزایش تقاضای محصولات طیور منجر به کاهش دوره پرورش همراه با افزایش وزن در سال‌های اخیر شده است (۱۶). از سوی دیگر صنعت طیور باید این مسئله را با صرف هزینه خوراک

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
(Email: m.daneshyar@urmia.ac.ir)
* - نویسنده مسئول:
DOI:10.22067/ijasr.v13i3.81538

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

پدیوکوکوس اسید لاکتیکی^۹، اتروکوکوس فاسیوم^{۱۰}، باسیلوس سابتیلیس^{۱۱} و ترکیبات پری بیوتیکی این نوع سین بیوتیک شامل فروکتوالیگوساکارید (Yeast extract) بود. برای تهیه محلول‌ها ابتدا ارلن و لوازم آزمایشگاهی مورد استفاده با استفاده از دستگاه تقطیر استریل‌یزه گردید. سپس مقداری مشخص از ماده مورد نظر توزین شده و داخل ارلن ریخته شد و به میزان مشخصی آب مقطر به آن افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه تیتراسیون قرار گرفت و یک عدد مگنت داخل محلول می‌گذاریم تا کاملاً حل شود. برای تزریق ابتدا دمای سالن با استفاده از بخاری برقی بین ۲۰ الی ۲۴ درجه سلسیوس حفظ شد، تا تخم‌های خارج شده از دستگاه برای تزریق دچار شوک حرارتی نشوند. در روز ۸ انکوباسیون بعد از نور بینی و مشاهده کیسه هوایی تخم، قسمت کیسه هوایی با استفاده از اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردید. بعد با استفاده از سرسوزن‌های شماره ۲۷ در قسمت ضدعفونی شده سوراخی ایجاد کرده و محلول مورد نظر با استفاده از سرنگ انسولین و سرسوزن شماره ۲۷ و به طول ۱۲ میلی‌متر به داخل تخم‌ها تزریق گردید و سپس سوراخ ایجاد شده به وسیله پارافین مذاب مسدود شد و سریعاً تخم‌های تزریق شده به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شدند. برای جوجه‌کشی از دستگاه جوجه‌کشی دماوند مدل dq150sh استفاده گردید. دمای ستر حدود ۳۷/۷ درجه سلسیوس و رطوبت آن ۶۵ در صد و دمای هچر ۳۷/۲ درجه سلسیوس و رطوبت آن ۷۵-۸۰ درصد بود. جنین در مرحله ستر در حال رشد است. بنابراین برای جلوگیری از چسبیدن آن به پوسته تخم‌ها هر ۴ تا ۶ ساعت یک بار به صورت کامل چرخانده شدند. در زمان هچر در جوجه‌کشی حساسیت بالایی دارد و معمولاً ۳ الی ۵ روز آخر جوجه‌کشی به این دوره تعلق دارد که در این زمان چرخش تخم‌های نطفه‌دار متوقف می‌شود.

بعد از تفریخ تخم‌های تیمارهای مختلف، تعداد تخم‌های هچ شده و هچ نشده مشخص گردید و جوجه‌های تفریخ شده به سالن منتقل گردید و با جیره‌های مشابه بر پایه ذرت و سویا تغذیه شدند. جیره پایه طبق راهنمای NRC 1994 تنظیم گردید.

نحوه امتیازدهی جوجه‌ها بر اساس شاخص‌های کیفی

قبل از هچ سالن آماده شده و با کاغذ رول کف سالن پوشیده شده و پن بندی انجام گردید. پن‌های مورد استفاده از مجموعه توری‌های کفه، دیواره‌ها و سقف تشکیل می‌گردد. از پن‌هایی با طول و عرض ۶۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر استفاده شد. بعد از هچ، ۲ جوجه از هر تکرار برای بررسی فراسنجه‌های کیفیت جوجه طبق جدول ۲ و

آنتی بیوتیک‌ها در محصولات حیوانی مانند گوشت و تخم مرغ از ابتدای ژانویه ۲۰۰۶ در اروپا به کلی ممنوع گردید. پری بیوتیک‌ها به عنوان ترکیبات غذایی غیر قابل هضم تعریف می‌شوند که از طریق تحریک رشد یا فعالیت گونه‌های باکتریایی مفید موجود در روده برای میزبان مؤثر هستند و به همین دلیل برای سلامتی میزبان نیز مفید هستند (۱۶). ترکیب هم‌کوشی بین پروبیوتیک و پری بیوتیک، غذاهای حاوی این دو را سین بیوتیک گویند (۹). تغذیه داخل رویانی به عنوان یک ابزار سودمند برای غلبه بر محدودیت رشد اولیه در طی رشد رویانی و پس از خروج از تخم در طیور اهلی محسوب می‌شود (۱۴). مشخص شده است که تزریق تخم در اوایل زندگی جنینی بلدرچین بخصوص تزریق مکمل‌های مواد مغذی در طول کل زندگی جنینی پرنده مفید باشد (۲۹). بنابراین هدف از این آزمایش بررسی این اثرات احتمالی سطوح مختلف تزریق سین بیوتیک (یک، دو و چهار میکروگرم در میلی‌لیتر به ازای هر تخم بلدرچین در روز ۸ انکوباسیون) بر در صد جوجه درآوری، رشد و توسعه جنین، کیفیت جوجه یک‌روزه، وزن جوجه، میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک، وزن اندام‌های داخلی و خصوصیات لاشه و برخی از فراسنجه‌های خونی از قبیل تری‌گلیسرید، پروتئین کل، گلوکز، اوره، اسید اوریک، کلسترول با چگالی بالا و فعالیت آنزیم‌های آلکالین ترانسفراز^۱ و آسپارات ترانسفراز^۲ بود.

مواد و روش‌ها

سیصد و هفتاد و پنج عدد تخم بلدرچین در قالب یک طرح بلوک کاملاً تصادفی به ۵ تیمار (هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار دارای ۱۵ تخم نطفه‌دار بودند) تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون تزریق)، تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر و تزریق ۱ میکروگرم سین بیوتیک (۱۰۰۰ واحد تشکیل کلنی باکتری و با غلظت یک میکروگرم در یک میلی‌لیتر)، تزریق ۲ میکروگرم سین بیوتیک (۲۰۰۰ واحد تشکیل کلنی باکتری و با غلظت ۲ میکروگرم در یک میلی‌لیتر) و ۴ میکروگرم سین بیوتیک (۴۰۰۰ واحد تشکیل کلنی باکتری و با غلظت ۴ میکروگرم در یک میلی‌لیتر) به داخل کیسه هوایی بودند. که مجموع باکتری‌های آن 2×10^9 CFU/gr است ترکیبات پروبیوتیکی این نوع سین بیوتیک (بایودپ، محصول شرکت زیست درمان ماهان-ایران) شامل ساکارومایسس سرویزیه^۳، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس^۴، لاکتوباسیلوس پانتاروم^۵، لاکتوباسیلوس کازئی^۶، لاکتوباسیلوس مامنوزوز^۷، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم^۸،

7- Lactobacillus mammosus
8- Bifidobacterium bifidum
9- Pediococcus acidilactici
10- Enterococcus faecium
11- Bacillus subtilis

1- Alt
2- Ast
3- Saccharomyces cervisiae
4- Lactobacillus acidophilus
5- Lactobacillus plantarum
6- Lactobacillus casei

جدول ۱- ترکیب اقلام خوراکی (درصد) و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی.
Table 1- Combination of food items (%) and nutrients of experimental diets

اقلام خوراکی Ingredient (g/kg)	جیره رشد (۱ تا ۳۵ روزگی) Growth diet (1 to 35 days)
ذرت Corn	50.27
کنجاله سویا Soybean meal	44.17
روغن Oil	2.30
دی کلسیم فسفات Di-calcium Phosphate	1.04
کربنات کلسیم Calcium carbonate	1.12
متیونین Methionine	0.15
ترئونین Threonine	0.10
نمک Salt	0.24
جوش شیرین bicarbonate	0.10
مواد مغذی جیره پایه	
انرژی (کیلو کالری بر کیلوگرم) ME (kcal/kg)	2900
پروتئین (درصد) CP (%)	24
لیزین (درصد) lysine (%)	1.34
متیونین (درصد) Methionine (%)	0.5
متیونین + سیستین (درصد) methionine+ cystine (%)	0.88
ترئونین (درصد) Threonine (%)	1.02
تریپتوفان % Tryptophan	0.30
آرژنین % Arginine	1.64
ایزولوسین % Isoleucine	1.03
لوسین % Lucien	1.98
والین % Valine	1.13
کلسیم (درصد) Ca (%)	0.79
فسفر % Phosphorus	0.30
سدیم % Sodium	0.15
پتاسیم % potassium	1.02
کلر % Chlorine	0.18
تعادل الکترولیتی % Electrolyte balance	266.55
مکمل ویتامینی ^۱ Vitamin premix ^۱	0.25
مکمل معدنی ^۲ Mineral Premix ^۲	0.25

^۱ مکمل ویتامینی به ازای هر کیلوگرم از جیره مواد مغذی زیر را تأمین نمود: ویتامین A (۳۶۰۰۰۰ واحد بین‌المللی)، ویتامین D3 (۸۰۰۰۰ واحد بین‌المللی)، ویتامین E (۷۲۰۰ واحد بین‌المللی)، ویتامین K3 (۸۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین B12 (۶ میلی‌گرم)، پیریدوکسین (۱۱۷۶ میلی‌گرم)، تیامین (۷۰۰ میلی‌گرم)، ریوفلاوین (۲۶۴۰ میلی‌گرم)، اسید پانتوتیک (۳۹۲۰ میلی‌گرم)، نیاسین (۱۱۸۸۰ میلی‌گرم)، بیوتین (۴۰ میلی‌گرم)، کولین (۲۰۰۰۰ میلی‌گرم)، فولاسین (۴۰۰ میلی‌گرم)، اتوکسی کوئین (۱۰۰۰ میلی‌گرم).

^۲ مکمل معدنی در هر کیلوگرم جیره: سلنیوم (۸۰ میلی‌گرم)، مس (۴۰۰۰ میلی‌گرم)، ید (۳۹۶ میلی‌گرم)، آهن (۲۰۰۰ میلی‌گرم)، منگنز (۳۹۶۸۰ میلی‌گرم)، روی (۳۳۸۸۰ میلی‌گرم).
^۱ Vitamin premix supplied per kilogram of diet: vitamin A (retinyl acetate) (3,600,000 IU), vitamin D3 (80,000 IU), vitamin E (7,200 IU), vitamin K3 (800 mg), vitamin B12 (6 mg), pyridoxine (1,176 mg), thiamin (700 mg), Riboflavin (2,640 mg), Pantothenic acid (2,920 mg), niacin (11,880 mg), biotin (40 mg), Choline (20,000 mg), Folicin (400 mg), Atoxiquin (1,000 mg).

^۲ Mineral premix per kilogram of diet: Selenium (80 mg), copper (4,000 mg), iodine (396 mg), iron (2,000 mg), manganese (39,680 mg), zinc (33,880 mg).

جدول ۲- مربوط به تعیین کیفیت جوجه (Tona et al., 2003).

Table 2- Parameters related to chick quality determination (Tona et al., 2003).

فراستجه‌های کیفی Qualitative parameters	نحوه ارزیابی Evaluation method
فعالیت Activity	فعالیت بر اساس گذاشتن جوجه به پشت برای تعیین چگونگی برگشت سریع آن بر روی پای خود ارزیابی می‌شود. به برگشت سریع بر روی پاهای خود نمره خوب، اما به برگشت آرام یا باقی ماندن بر روی پشت نمره پایین داده شد. Activity is assessed by laying the chick on its back to determine how quickly it returned to its feet. A quick spring back onto its feet was regarded as good, but trailing back onto its feet or remaining on its back was assessed as weak.
وضعیت ظاهری Down and appearance	بدن جوجه برای خشکی و پاکیزگی مورد بررسی قرار گرفت. اگر خشک و تمیز بود، نرمال در نظر گرفته شد. اگر خیس یا کثیف یا هر دو (که می‌تواند منبع آلودگی باشد) باشد، پس خوب نبود. The chick body was examined for dryness and cleanness. It was regarded as normal if it was dry and clean. If it was wet or dirty or both (which could be a source of contamination), then it was considered as not good.
جذب زرده Retracted yolk	جوجه به‌صورت مورب در کف دست قرار گرفت. حرکت شکم کاملاً متوقف‌شده و بعد از لمس شکم به زرده جذب‌شده نمره خوب و در غیر این صورت نمره پایین داده شد. The chick was put on its back obliquely on the hand palm until abdominal movement totally stopped. The height of its abdomen was estimated. The consistency of the abdomen to touch was then estimated. If the height of abdomen touching estimation was higher and harder than normal, yolk retraction would be regarded as large and consistent.
چشم‌ها Eyes	جوجه بر روی پا قرار داده شد و با نگاه به چشم، به سه حالت شفاف و گشادی، باز و شفاف و همچنین بسته نمره داده شد. Making the baby chick standing on its legs, its eyes were observed. The state of brightness and wideness of the gape of the eyelids were estimated
پاها legs	جوجه بر روی پا قرار داده شد و به سه حالت ایستادن به‌صورت صاف، یک پای ملتهب و دو پای ملتهب نمره داده شد. The chick was put on its feet to determine if it remained upright well. The toes were examined for their conformation. If the chick remained upright with difficulty, articulations of the knees were examined to detect signs of inflammation or redness or both.
ناحیه ناف Navel area	بسته بودن و تیره بودن آن بررسی شد. در صورت متفاوت بودن رنگ با پوست بدن، نمره پایین داده شد. Navel and surrounding areas were examined for closure of the navel and its coloring. If the color was different from the color of skin, the chick would be regarded as bad chick.
باقیمانده غشایی Remaining membrane	با مشاهده ناحیه، غشای باقیمانده به سه اندازه خیلی بزرگ، بزرگ و کوچک طبقه‌بندی شد. By observing the size of navel area estimation was done for any remaining of membrane. The size of any remaining membrane was classified as very large, large, or small
باقیمانده زرده Remaining yolk	با مشاهده ناحیه، غشای باقیمانده به سه اندازه خیلی بزرگ، بزرگ و کوچک طبقه‌بندی شد. By observing the size of any navel yolk remaining el area are estimated of any. The size of any remaining yolk was classified as very large, large, or small.

بر اساس جداول تونا و همکاران (۲۰۰۳) مجموع امتیاز جوجه باکیفیت خوب ۱۰۰ می‌باشد.

سپس تعداد جوجه‌های هچ شده از هر تیمار شمارش شده و به‌صورت گروهی باهم وزن‌کشی شدند و بعد از تعیین کیفیت به داخل پن انتقال داده شد تمامی جوجه‌ها به صورت چشمی با امتیازبندی خوب، متوسط و ضعیف سنجیده شدند. با توجه به موارد ذکر شده در مقاله تونا و همکاران (۳۳)، ارزیابی جوجه‌ها بر اساس قسمت‌های مختلف و شرایط فیزیکی آن‌ها صورت گرفت. این شرایط شامل فعالیت، پوشش سطح بدن، چشم‌ها، پاها، ناحیه ناف، جذب زرده و باقیمانده غشایی بود. روش‌های سنجش آن‌ها در جدول ۳-۱ آمده است. مجموع اعداد به‌دست‌آمده در مقیاس ۱۰۰ می‌باشد. سطح امتیازبندی هر شاخص در ارتباط بااهمیت آن در بقای جوجه است.

جدول ۳- نحوه نمره دهی به شاخص‌های مختلف (Tona et al., 2003)

Table 3- How to score different parameters (Tona et al., 2003)

پارامترها Parameters	خصوصیات Specification	نمرات Scores
فعالیت Activity	خوب Good	6
	ضعیف Weak	0
	تمیز و خشک Clean and dry	10
ظاهر و پر Down and appearance	خیس Wet	8
	کثیف و خیس Dirty and wet	0
زرده جذب‌شده Retracted yolk	زرده جذب‌شده نرمال Body with normal swallowed yolk	12
	زرده بزرگ Body with swallowed large yolk and rather hard to touch	0
	باز و شفاف Opened and bright	16
چشم‌ها Eyes	باز و غیر شفاف Opened and not bright	8
	بسته Closed eyes	0
پاها legs	پاها و انگشتان طبیعی Normal legs and toes	16
	یک پای عفونی One infected leg	8
	دو پای عفونی Two infected legs	0
ناف Navel area	کاملاً تمیز و بسته Completely closed and clean	12
	کاملاً بسته نشده و رنگی Not completely closed and not discolored	6
	بسته نشده و بی‌رنگ Not closed and discolored	0
باقیمانده غشایی Remaining membrane	بدون غشا No membrane	12
	غشای کوچک Small membrane	8
	غشای بزرگ Large membrane	4
	غشای خیلی بزرگ Very large membrane	0
باقیمانده زرده Remaining yolk	بدون زرده No yolk	16
	زرده کوچک Small yolk	12
	زرده بزرگ Large yolk	8
	زرده خیلی بزرگ Very large yolk	0

نحوه پرورش و نمونه‌گیری

احتیاجات غذایی جوجه‌ها بر اساس جداول (۲۵) تنظیم گردید. وزن کشی به صورت گروهی از جوجه‌های هر پن با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۵ گرم، در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ انجام گرفت و با استفاده از روش روز مرغ (به منظور امکان تصحیح برای تلفات احتمالی)، افزایش وزن روزانه هر پرند و مقدار خوراک مصرفی به دست آمد و سپس ضریب تبدیل خوراک با در دست داشتن دو مورد فوق برآورد شد.

در طول دوره آزمایش، افزایش وزن، خوراک مصرفی و تلفات به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد و در پایان دوره ضریب تبدیل خوراک، افزایش وزن و خوراک مصرفی برای هر تیمار محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش از دو طرح آماری استفاده گردید. داده‌های مربوط به جوجه‌کشی و بعد از هج (قبل از انجام کارهای پرورشی) از طرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده گردید. طبقات ستر به عنوان بلوک

در نظر گرفته شد. برای دوره پرورش از طرح کاملاً تصادفی استفاده می‌شود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SAS)، و روش (GLM) انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد با هم مقایسه شدند. جوجه‌ها باید ظاهری یکنواخت با پر و بال تمیز و خشک عاری از هرگونه مواد، مانند زرده تخم‌مرغ و یا مدفوع داشته باشند.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌کنید، تزریق همه تیمارهای آزمایشی باعث کاهش جوجه درآوری در مقایسه با شاهد گردید ($P < 0.05$). تزریق آب مقطر کمترین تأثیر را بر جوجه درآوری داشت ولی تزریق بالاترین سطح سین‌بیوتیک موجب بیشترین کاهش جوجه درآوری گردید. همچنین تزریق همه تیمارهای آزمایشی موجب کاهش عددی وزن جوجه‌های هج شده در مقایسه با شاهد گردید ($P = 0.07$). بعلاوه عدم تأثیر بلوک برای درصد جوجه درآوری و وزن جوجه یک‌روزه مشاهده گردید ($P > 0.05$).

جدول ۴- تأثیر تزریق داخل تخم‌مرغی سین‌بیوتیک بر درصد هج و وزن جوجه یک‌روزه

Table 4- Influence of in ovo injection of synbiotic on hatching percentage and one-day-old chicks weight

تیمارها Treatments	هج Hatch	وزن جوجه (gr) Chicken weight
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	91.35 ^a	7.42
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	74.04 ^{bc}	6.80
تزریق یک میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	77.87 ^{ab}	7.37
تزریق دو میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	71.14 ^{bc}	7.18
تزریق چهار میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	59.29 ^c	7.14
میانگین خطای استاندارد SEM	2.82	0.10
سطح احتمال P-value	0.02	0.07
اثر بلوک Block effect	0.7	0.06

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. همچنین ناف جوجه‌های هج شده از تخم‌های تغذیه‌شده با ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک کمتر از مقدار مربوط به جوجه‌های حاصل از تخم‌مرغ‌های شاهد بود ($P = 0.05$). بعلاوه عدم تأثیر بلوک برای شاخص‌های کیفی جوجه یک‌روزه به‌استثنای ناف مشاهده گردید ($P > 0.05$).

عدم تأثیر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های فعالیت، وضعیت ظاهری، زرده جذب شده، چشم‌ها، پاها، باقیمانده غشایی و باقیمانده زرده جوجه‌های تفریخ شده مشاهده گردید ($P > 0.05$). البته ناف تمایل به معنی‌دار شدن داشت ($P = 0.07$) و جوجه‌های هج شده از سطح ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک، زرده جذب شده کمتری

جدول ۵- تأثیر تزریق داخل تخم مرغی سین‌بیوتیک بر کیفیت جوجه یک‌روزه

Table 5- Effect of in ovo injection of synbiotic on the quality of one-day-old chicks

تیماها Treatments	فعالیت Activity	ظاهر و پر Appearance and feather	زرده جذب شده Absorbed yolk	چشم‌ها Eyes	پاها legs	ناف Navel	باقیمانده غشایی Membrane remnant	باقیمانده زرده Yolk remnant
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	4.66	10	12	13.77	15.11	10.33	10.44	15.11
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	5.64	10	9.88	14.58	15.05	9.52	9.64	14.35
تزریق یک میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	5.64	10	9/88	14.11	15.05	11.29	9.41	15.52
تزریق دو میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	5.71	9.90	7.42	14.47	16.00	9.71	8.76	14.85
تزریق چهار میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	5.57	10	11.14	15.42	16.00	9.85	9.71	14.57
خطای استاندارد SEM	0.19	0.02	0.49	0.34	0.31	0.31	0.29	0.20
سطح احتمال P-value	0.65	0.44	0.07	0.61	0.63	0.05	0.18	0.12
اثر بلوک Block effect	0.8	0.31	0.56	0.4	0.4	0.02	0.14	0.07

منجر به تغییر مصرف خوراک گردید ($P < 0.05$). در هفته دوم، تزریق ۱ میکروگرم سین‌بیوتیک موجب افزایش مصرف خوراک در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی گردید درحالی‌که تفاوت معنی‌داری برای مصرف خوراک بین سایر تیمارهای آزمایشی در این هفته مشاهده نگردید. در هفته سوم، تزریق سطوح ۱ و ۲ میلی‌گرم سین‌بیوتیک موجب افزایش مصرف خوراک در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی شدند و بالاترین مصرف خوراک مربوط به تزریق ۲ میکروگرم سین‌بیوتیک بود. در هفته پنجم نیز اگرچه تزریق سطوح ۱ و ۲ میکروگرم سین‌بیوتیک موجب افزایش مصرف خوراک شدند ولی فقط تأثیر تزریق ۲ میکروگرم بر مصرف خوراک در این هفته معنی‌دار بود.

تأثیر تزریق داخل تخم بلدرچین سین‌بیوتیک بر افزایش وزن بدن جوجه‌های تفریخ شده در هفته‌های مختلف در جدول ۵ آمده است. تزریق هیچ‌گونه تأثیری بر افزایش وزن بدن در هفته‌های اول، سوم، چهارم و پنجم نداشت ($P > 0.05$). اما در هفته دوم، تزریق آب مقطر و سطح یک میکروگرم سین‌بیوتیک موجب افزایش وزن بالاتری در مقایسه با شاهد شد ($P < 0.05$) درحالی‌که تفاوت معنی‌داری بین سایر تیمارها برای افزایش وزن بدن در این هفته وجود نداشت. همان‌طور که در جدول ۷ مشاهده می‌کنید، تزریق آب مقطر یا سین‌بیوتیک هیچ‌گونه تأثیری بر مصرف خوراک در طول هفته‌های اول و چهارم نداشت ($P > 0.05$) اما در هفته دوم، سوم و پنجم تزریق

جدول ۶- تأثیر تزریق سین‌بیوتیک به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین بر افزایش وزن هفتگی

Table 6- Influence of synbiotic injections into the air sac quail egg on weekly weight gain

تیمارها Treatments	هفته اول First week	هفته دوم Second week	هفته سوم Third week	هفته چهارم Forth week	هفته پنجم Fifth week
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	17.93	29.26 ^b	43.93	50.64	33.09
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	19.76	34.29 ^a	44.17	47.84	32.28
تزریق یک میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	18.72	34.77 ^a	43.09	52.77	33.36
تزریق دو میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	15.04	30.64 ^{ab}	43.24	55.11	35.30
تزریق چهار میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	13.72	26.85 ^b	38.63	47.25	32.92
میانگین خطای استاندارد SEM	1.01	0.88	1.12	1.29	1.23
سطح احتمال P-value	0.31	0.008	0.61	0.27	0.95

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

a-

جدول ۷- تأثیر تزریق سین‌بیوتیک به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین بر مصرف خوراک بلدرچین ژاپنی

Table 7- Effect of synbiotic injection into the air sac quail egg on Japanese Quail feed

تیمارها Treatments	هفته اول first week	هفته دوم second week	هفته سوم third week	هفته چهارم forth week	هفته پنجم fifth week
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	53.64	71.73 ^b	92.59 ^c	125.65	143.44 ^b
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	61.66	73.65 ^b	104.08 ^c	146.01	165.81 ^{ab}
تزریق یک میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	52.28	91.38 ^a	138.65 ^b	163.23	166.79 ^{ab}
تزریق دو میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	52.96	78.72 ^b	163.66 ^a	149.27	192.53 ^a
تزریق چهار میکروگرم در میلی لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	51.58	72.47 ^b	114.378 ^c	156.48	153.20 ^b
میانگین خطای استاندارد SEM	1.61	2.01	6.48	4.87	5.13
سطح احتمال P-value	0.27	0.006	<0.0001	0.16	0.02

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

شاهد و آب مقطر گردید ($P < 0.05$).
تأثیر تزریق داخل تخم بلدرچین سین‌بیوتیک بر وزن اندام‌های داخلی و لاشه جوجه‌های حاصله در هفته‌های مختلف در جدول ۹ آمده است. تزریق آب مقطر یا سطوح مختلف سین‌بیوتیک تأثیری بر

با توجه به جدول ۸ تزریق هیچ‌گونه تأثیری بر ضریب تبدیل خوراک هفته‌های اول، دوم، چهارم و پنجم نداشته ($P < 0.05$). اما در هفته سوم، تزریق سطح ۱، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی لیتر آب مقطر سین‌بیوتیک منجر به افزایش ضریب خوراک در مقایسه با تیمارهای

وزن سینه، ران، کل لاشه و اندام‌های داخلی قلب، کبد، سنگدان و روده نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۸- تأثیر تزریق سین‌بیوتیک به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین بر ضریب تبدیل خوراک.

Table 8- Effect of synbiotic injection into air sac quail egg on feed conversion ratio

تیماها Treatments	هفته اول First week	هفته دوم Second week	هفته سوم Third week	هفته چهارم Forth week	هفته پنجم Fifth week
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	3.14	2.45	2.27 ^b	2.52	4.33
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	3.25	2.22	2.38 ^b	3.04	5.44
تزریق یک میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	3.71	2.56	3.25 ^a	3.13	5.17
تزریق دو میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	2.79	2/60	3.78 ^a	2.84	5.64
تزریق چهار میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	3.58	2.73	3.16 ^a	3.40	4.74
میانگین خطای استاندارد SEM	0.23	0.07	0.16	0.13	0.23
سطح احتمال P-value	0.07	0.19	0.0005	0.32	0.38

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

جدول ۹- تأثیر تزریق داخل تخمی سین‌بیوتیک بر وزن اندام‌های داخلی و خصوصیات لاشه بلدرچین‌های ژاپنی در سن ۳۵ روزگی.

Table 9- Effect of in ovo injection of synbiotic on the weight of internal organs and characteristics of carcasses of Japanese Quail at age 35.

تیماها Treatments	لاشه Carcass	سینه Breast	ران‌ها Thighs	قلب Heart	کبد Liver	سنگدان Gizzard	روده Intestine
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	59.01	23.43	14.73	0.79	2.26	2.36	3.85
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	58.23	23.32	13.97	0.90	2.12	2.12	3.55
تزریق یک میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	58.33	23.27	14.27	0.84	1.96	2.50	4.11
تزریق دو میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	59.07	23.43	14.66	0.81	2.03	2.32	3.54
تزریق چهار میکروگرم در میلی‌لیتر سین‌بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	56.86	23.10	13.59	0.82	2.26	2.19	4.24
میانگین خطای استاندارد SEM	0.35	0.28	0.19	0.02	0.07	0.06	0.10
سطح احتمال P-value	0.35	0.99	0.32	0.29	0.5	0.36	0.05

تأثیر تزریق داخل تخم بلدرچین سین‌بیوتیک بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های هج شده در هفته‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱۱ آمده است. تزریق هیچ تأثیری بر اوره، اسید اوریک، گلوکز، تری‌گلیسرید، کراتینین و پروتئین نداشت ($P > 0.05$).

تأثیر تزریق داخل تخم بلدرچین سین‌بیوتیک بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های هج شده در هفته‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱۰ آمده است. مشاهده می‌گردد، تزریق داخل تخمی محلول سین‌بیوتیک تأثیری بر میزان آنزیم‌های آلکالین ترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز نگذاشت ($P > 0.05$).

جدول ۱۰- اثرات تزریق داخل تخم سطوح مختلف سین بیوتیک بر میزان آنزیم‌های آلکالین ترانسفراز و آسپاراتات ترانسفراز خون بلدرچین‌های ژاپنی در سن ۳۵ روزگی
Table 10- Effects of different in ovo levels injection on alkaline transferase and aspartate transferase of Japanese Quail blood at age 35.

تیمارها Treatments	آسپاراتات آمینوترانسفراز AST (واحد در لیتر) U/L	آلاتین آمینوترانسفراز Alt (واحد در لیتر) U/L
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	6.34	3.70
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	6.21	4.36
تزریق یک میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	7.14	4.75
تزریق دو میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	5.28	1.84
تزریق چهار میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	4.46	2.47
میانگین خطای استاندارد SEM	0.89	0.68
سطح احتمال P-value	0.92	0.65

جدول ۱۱- اثرات تزریق داخل تخم محلول سین بیوتیک بر فراسنجه‌های خونی بلدرچین‌های ژاپنی در سن ۳۵ روزگی.
Table 11- Effects of in ovo injection of synbiotic on blood indices in Japanese Quails at Age 35.

تیمارها Treatments	اوره Urea (mg/dl)	اسید اوریک Uric acid (mg/dl)	پروتئین کل Total protein (g/dl)	تری گلیسیرید Triglyceride (mg/dl)	کراتینین Creatinine (mg/dl)	گلوکز Glucose (mg/dl)
شاهد (بدون تزریق) Control (no injection)	489.8	39.38	3.16	87.12	0.64	351.98
تزریق آب مقطر Injection of distilled water	342	33.5	2.93	97.08	0.76	408.24
تزریق یک میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 1 µg/ml of synbiotic	437.6	38.28	2.55	58.22	0.74	343.08
تزریق دو میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 2 µg/ml of synbiotic	384.10	33.70	2.99	73.50	0.34	290.10
تزریق چهار میکروگرم در میلی لیتر سین بیوتیک Injection 4 µg/ml of synbiotic	542.5	35.85	2.34	56.73	0.42	295.78
میانگین خطای استاندارد SEM	54.44	2.37	0.20	6.47	0.10	17.52
سطح احتمال P-value	0.82	0.92	0.73	0.20	0.58	0.19

در این آزمایش تزریق داخل تخمی یک میکروگرم محلول سین بیوتیک موجب بهبود افزایش وزن در هفته سوم، افزایش مصرف

بحث

خوراک در هفته های دوم، سوم و پنجم گردید و همچنین افزایش ضریب تبدیل خوراک را در هفته سوم باعث شد. به طور مشابهی، بهبود افزایش وزن توسط تعدادی از محققین به دنبال مصرف پروبیوتیک، پری بیوتیک یا سین بیوتیک در طیور گزارش شده است. برای مثال، متقی طلب و حاجی حسینی (۲۳) نشان دادند که جوجه های تولیدی از تخم مرغ های تیمار شده با تزریق اسید آمینه در کیسه زرده، میانگین وزن بالاتری را نسبت به سایر گروه ها داشتند. همچنین جوجه های تولیدی از تخم مرغ های تزریق شده با اسید آمینه در کیسه زرده وزن بالاتری را طی ۲ هفته اول پرورش در مقایسه با سایر تیمارها داشته و مصرف خوراک در این گروه از جوجه ها در هفته دوم به طور معنی دار بالاتر بود. ضریب تبدیل خوراک این گروه از جوجه ها در هفته اول پرورش در مقایسه با سایر تیمارها کاهش معنی داری را نشان داد.

امیری و همکاران (۴) گزارش کردند که تزریق دکستروز ۲۰ درصد به تخم مرغ های بارور سبب افزایش وزن بدن در مقایسه با گروه شاهد (بدون تزریق) شد. موسوی و همکاران (۲۴) گزارش کردند که تزریق جداگانه اسید آمینه بیشترین تأثیر را بر وزن جوجه یک روزه می گذارد و وزن جوجه های حاصله از تیمارهای تحت تزریق اسید آمینه نسبت به گروه شاهد ۵/۴ درصد بیشتر است، همچنین تزریق کربوهیدرات (عمده کربوهیدرات آن ها ساکارز، مالتوز و دکستروز بود) و اسید بوتیریک نیز وزن جوجه های تغریخ شده را به میزان ۳ درصد افزایش داد. تزریق اسید آمینه در هفته اول جوجه کشی (روز ۷) توسط اهتا و همکاران (۲۶) مورد بررسی قرار گرفت. برخلاف نتیجه به دست آمده در آزمایش حاضر، گزارش کردند که تزریق اسید آمینه موجب افزایش وزن نسبی جوجه ها گردید. در گزارشی دیگر مقدم و همکاران (۲۲) گزارش کردند که تجویز پروبیوتیک از طریق تزریق به تخم مرغ موجب کاهش ۲/۶۲ درصدی خوراک مصرفی گردید که می تواند دلیلی بر بهبود ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه های افشانه و شاهد باشد. یونی و همکاران (۳۵) ترکیبی از لاکتوز، مالتوز و دکستروز را به درون تخم مرغ های نطفه دار تزریق نمودند و گزارش کردند که استفاده از کربوهیدرات ها موجب افزایش وزن جوجه های تغریخ شده می گردد. در مطالعه دیگری اهتا و همکاران (۲۷) در روز ۷ انکوباسیون ۰/۵ میلی لیتر محلول حاوی اسید آمینه را با استفاده از سرسوزن به طول ۱۳ میلی متر به داخل تخم مرغ تزریق نمودند و مشاهده کردند که تزریق اسید آمینه سبب افزایش وزن جوجه ها نسبت به وزن تخم مرغ ها گردید. اهتا و همکاران (۲۷) دریافتند که تزریق اسید آمینه به اتاقک هوایی تخم مرغ های بارور در هفته اول انکوباسیون، میزان اسید آمینه جنین، آلبومین، مایعات آلتوتوئیس و آمینوتیک و وزن جنین را در روز ۱۹ انکوباسیون افزایش می دهد. اهتا و همکاران (۲۷) مشاهده کردند که با تزریق مواد مغذی در تخم مرغ سطوح اسیدهای آمینه پلاسمای جوجه یک روزه در مقایسه با لیزین

کاهش می یابد که در نتیجه این امر می تواند باعث تجمع اسیدهای آمینه در بافت ها و تولید پروتئین بیشتر شود که متعاقباً به افزایش بیشتر وزن روزانه منجر خواهد شد. آل-مورانی (۳) نشان داد که تزریق ترکیب اسید آمینه به درون تخم مرغ های مادر گوشتی سبب افزایش وزن جوجه های گوشتی در زمان تغریخ و ۵۶ روزگی می شود. فویه و همکاران (۱۴) گزارش کردند که تزریق داخل تخم مرغ کربوهیدرات سبب افزایش وزن تغریخ شد اما تأثیر آن بر وزن بدن در سن ۳ و ۷ روزگی معنی دار نبود. اگر تزریق مواد مغذی به درون تخم مرغ یک نوع تغذیه اولیه به حساب بیاید (۳۴)، همچنین آواد و همکاران (۱۰) گزارش کردند که اضافه کردن مکمل سین بیوتیک به جیره جوجه های گوشتی سبب بهبود افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک و راندمان لاشه نسبت به گروه شاهد شد. مهری و همکاران (۲۰) در بررسی اثرات سطوح ۰، ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ گرم در کیلوگرم سین بیوتیک (بایومین ایمبو) در جیره جوجه های گوشتی گزارش کردند که افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک کل دوره پرورش در سطح ۱ و ۱/۵ گرم سین بیوتیک در کیلوگرم جیره بیشتر از گروه شاهد بود. کنان و همکاران (۱۹) گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسپرووژنز به جیره جوجه های گوشتی موجب بهبود وزن بدن، کاهش مصرف خوراک و بهبود بازده خوراک گردید.

تعدادی از محققین نیز متفاوت با نتایج تحقیق اخیر عدم تأثیر افزودنی های مختلف را بر عملکرد طیور مختلف گزارش کرده اند. اما نتایج بهانجا و همکاران (۷) و متقی طلب و حاجی حسینی (۲۳) با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. در مطالعه ای که توسط متقی طلب و همکاران (۲۳) صورت گرفت، نشان داد که تزریق آل-کارنیتین در سطوح ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میکروگرم به ازای هر تخم مرغ سبب افزایش وزن تولد جوجه های هج شده شد.

ابرشنوی و سلطان مسعود (۱) گزارش کردند که استفاده از پری بیوتیک (مانان اولیگوساکارید)، پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس) و سین بیوتیک (ترکیب لاکتوباسیلوس و مانان اولیگوساکارید) تأثیر معنی داری بر ضریب تبدیل خوراک و مصرف خوراک نداشتند. باین حال سین بیوتیک باعث افزایش معنی دار وزن بدن جوجه های گوشتی در مقایسه با سایر تیمارها شد. آکینلی و همکاران (۲) گزارش کردند که افزودن بایومین ایمبو به عنوان یک سین بیوتیک در جیره جوجه های گوشتی اثر معنی داری بر مصرف خوراک، افزایش وزن، وزن نهایی و ضریب تبدیل خوراک نداشته است. شریفی و همکاران (۳۰) گزارش کردند که استفاده از سطوح مختلف سین بیوتیک تأثیر معنی داری بر صفات عملکردی، میانگین وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک در بلدرچین ژاپنی نداشت. اردوغان و همکاران (۱۳) گزارش کردند که استفاده از سین بیوتیک پلاس هیچ تأثیری بر مصرف خوراک، افزایش وزن، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک نداشت. میدیلی و همکاران (۲۱) گزارش کردند که پری بیوتیک (بیومس)،

درآوری وجود دارد. اهتا و همکاران (۲۷) گزارش کردند که تزریق اسیدآمینه در روز هفتم جنینی به کیسه زرده تخم مرغ های بارور تأثیری بر نرخ جوجه درآوری ندارد.

نتایج آزمایش اخیر نشان داد که تزریق آب مقطر یا سین بیوتیک تأثیری بر فراسنجه های مختلف خونی و آنزیم های خون ندارد. به طور مشابیهی، عشایر زاده و همکاران (۵) گزارش کردند که مصرف خوراکی پرو بیوتیک (پری مالاک)، پری بیوتیک (بیولکس) و سین بیوتیک (پری مالاک و بیولکس) اثر قابل توجهی بر غلظت آلبومین، پروتئین کل، لیپوپروتئین با چگالی بالا و لیپوپروتئین با چگالی پایین خون جوجه های گوشتی نداشت. به طور مخالفی، ابراهیم نژاد و همکاران (۱۱) گزارش کردند که تزریق ۰/۵ میلی لیتر گلوز ۲۰ و ۲۵ درصد در روز هفتم انکوباسیون به آلبومین جنین سبب افزایش گلوز خون جوجه های یک روزه می شود. بهانجا و همکاران (۷) نیز نشان دادند که تزریق گلوز سبب افزایش گلوز خون جوجه های یک روزه می گردد. ابر شنوی و مسعود سلطان (۱) گزارش کردند که استفاده از پری بیوتیک (مانان اولیگوساکارید) پرو بیوتیک (لاکتوباسیلوس) و سین بیوتیک (لاکتوباسیلوس و مانان اولیگوساکارید) در جیره جوجه های گوشتی باعث کاهش تری گلیسرید، کلسترول و LDL می شود. مهری و همکاران (۲۰) گزارش کردند که تغییر غلظت تری گلیسرید و کلسترول سرم همبستگی مثبت بالایی با مقدار آن ها در بافت گوشت دارد. اگرچه بیشتر محققان کاهش سطح آن را با استفاده از پرو بیوتیک گزارش کرده اند. سیرویدیس و همکاران (۳۲) گزارش کردند که افزودن ۰/۳ درصد پری بیوتیک به جیره جوجه های گوشتی، سبب افزایش پروتئین سرم در کل دوره آزمایش در مقایسه با تیمار شاهد شد. کنان و همکاران (۱۸) اثرات مانان اولیگوساکاریدها را بر پروفایل چربی خون مورد آزمایش قرار دادند و گزارش کردند که مانان اولیگوساکاریدها باعث کاهش کلسترول سرم خون می شود. ال-نکتی و همکاران (۱۲) نشان دادند که ترکیب ژل رویال با فومانیزین موجب بهبود معنی دار سطوح کلسترول، تری گلیسرید، کراتینین، اسید اوریک، ALT و AST می شود.

نتیجه گیری کلی

اگرچه تزریق سین بیوتیک به داخل تخم بلدرچین تأثیری بر وزن اولیه و خصوصیات کیفی جوجه های تازه تفریخ شده نداشت اما موجب کاهش جوجه درآوری گردید. اگرچه تزریق ۱ میکروگرم سین بیوتیک به داخل کیسه هوایی تخم بلدرچین ژاپنی موجب بهبود افزایش وزن می گردد اما افزایش مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک را به دنبال دارد. تزریق سطوح بیشتر از ۲ میکروگرم سین بیوتیک به داخل کیسه هوایی بلدرچین های ژاپنی موجب افزایش مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک گردید. همچنین تزریق سطوح مختلف سین بیوتیک تأثیری بر خصوصیات لاشه، اندام های داخلی، آنزیم های

پروبیوتیک (بیوپلاس) و ترکیب این دو هیچ تأثیری بر وزن بدن، افزایش وزن روزانه و خوراک مصرفی ندارد ولی باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک می شوند. یئو و کیم (۳۷) گزارش کردند که استفاده ۰/۱ در صد از پروبیوتیک حاوی لاکتوبا سیلوس در جیره غذایی جوجه های گوشتی در سن ۲۱ روزگی تأثیری در مقدار خوراک مصرفی ندارد. اوینگ و همکاران (۲۸) گزارش کردند که تغذیه پروبیوتیک های حاوی استریتوکوکوس فاسیوم برای جوجه های گوشتی تأثیر معنی داری بر افزایش وزن نداشته است.

تفاوت نتایج تحقیقات اخیر می تواند ناشی از تفاوت های مربوط به تغییرات شرایط محیطی، سطح تغذیه ای بکار گرفته شده، میزان مصرف خوراک پس از محدودیت خوراک، ساختار ژنتیکی، جنس و شدت محدودیت و گرسنگی باشد.

تزریق سین بیوتیک در تحقیق اخیر تأثیری بر خصوصیات لاشه بلدرچین های ژاپنی نداشت. تحقیقات زیادی در این زمینه عدم تأثیر مصرف پروبیوتیک، پری بیوتیک یا سین بیوتیک را بر خصوصیات لاشه گزارش کرده اند. به طور مثال، شریف و همکاران (۳۱) گزارش کردند که سین بیوتیک باعث افزایش وزن نسبی لاشه و وزن بورس فابر سیوس و تیموس جوجه های گوشتی در مقایسه با شاهد می شود. قهری و همکاران (۱۵) گزارش کردند که سین بیوتیک باعث افزایش معنی دار وزن لاشه جوجه های گوشتی می شود. وانگ و همکاران (۳۶) گزارش کردند که وزن نسبی لاشه، سینه، ران، بال و نیز چربی محوطه بطنی تفاوت معنی داری بین پروبیوتیک، پری بیوتیک و ترکیب پروبیوتیک و پری بیوتیک با تیمار شاهد وجود نداشت. دنلی و همکاران (۱۰) تغییر را در بازده لاشه، اوزان نسبی کبد، چربی محوطه بطنی، روده و نیز طول روده پرندگان تغذیه شده با پروبیوتیک پروتکسین نسبت به شاهد مشاهده نکردند. جین و همکاران (۱۷) نشان دادند استفاده از لاکتوباسیلوس اثر معنی داری بر وزن اندام های گوارشی (کبد، طحال، بورس و سنگدان) داشته است.

بر اساس نتایج این پژوهش تزریق سین بیوتیک و آب مقطر موجب کاهش جوجه درآوری در تحقیق حاضر گردید اما تأثیری بر فراسنجه های کیفی جوجه های یک روزه نداشت. تاکنون هیچ تحقیقی در رابطه با تأثیر تزریق سین بیوتیک بر جوجه درآوری و وزن جوجه یک روزه صورت نگرفته است. موسوی و همکاران (۲۴) نشان دادند که تزریق محلول های اسیدآمینه، کربوهیدرات و اسید بوتیریک تأثیری بر درصد جوجه درآوری نداشت. به خوبی مشخص شده است که سوراخ کردن تخم و انجام عمل تزریق داخل تخم مرغی موجب کاهش پرنده های تفریخ شده در پرندگان مختلف می گردد. برای مثال، امیری و همکاران (۴) با تزریق اسیدهای آمینه و دکستروز ۱۰ و ۲۰ درصد به داخل کیسه زرده تخم مرغ مشاهده کردند که تزریق این مواد در داخل تخم مرغ سبب کاهش نرخ هچ می شود. البته برخلاف نتایج تحقیق اخیر، گزارش هایی در رابطه با عدم تأثیر تزریق مواد مختلف بر جوجه

منابع

- 1- Abeer El-Shenway, M., and A. Mossad Soltan. 2015. Effect of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance, carcass traits and some serum biochemical alterations in broiler chicken. *Journal of Animal Science Advances*, 35: 1480-1492.
- 2- Akinleye, S. B., E. A. Lyayi, and K. D. Afolabi. 2008. The performance, haematology carcass traits of broilers as affected by diets supplemented with or without biomin a natural growth promoter. *World Journal of Agricultural Science*, 4 (4): 467-470.
- 3- Al-Murrani, W. K. 1982. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. *British Poultry Science*, 23, 171-174.
- 4- Amiri, N., M. Moeini, S. Tasharofi, and M. Eslami. 2014. Investigating the effects of different nutrient injections into the fertile egg yolk sac, along with 36 hours of fasting after hatching, on hatchability, growth performance and some blood parameters of broiler chicks. *Iranian Journal of Animal Sciences*, 46(1):17- 27. (In persian).
- 5- Ashayerizadeh, A., N. Dabiri, K. H. Mirzadeh, H. Roshanfekr, and M. Mamooee. 2009. Effect of dietary antibiotic, prebiotic and probiotic as growth promoters on growth performance, carcass characteristics and haematological indices of broiler chicks. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 52-57.
- 6- Awad, W. A., K. Ghareeb, S. Abdel-Raheem, and A. Bohm. 2009. Effect of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1):49-56.
- 7- Bhanja, S., A. Mandal, S. Agarwal, S. Majumdar, and A. Bhattacharyya. 2007. Effect of in ovo injection of vitamins on the chick weight and post -hatch growth performance in broiler chickens. In: *Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition*, Strasbourg, France, 26-30 August. pp. 143-146.
- 8- Bozkurt, M., K. Kucukyilmaz, A. U. catll, and M. Cinar. 2009. The effect of single or combined dietary supplementation of prebiotics, organic acid and probiotics on performance and slaughter characteristics of broiler body weight, carcass yield and carcass quality. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 39(3): 197-205.
- 9- Collins, M. D., and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69. 1052 – 1057.
- 10- Denli, M., F. Okan, and C. Kemal. 2003. Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2).89-91
- 11- Ebrahimnezhad, Y., M. Salmanzadeh, H. Aghdamshahryar, R. Beheshti, and H. Rahimi. 2011. The effects of in ovo injection of glucose on characters of hatching and parameters of blood in broiler chickens. *Annals of biological research*, 2: 347-351.
- 12- El-Nekeety, A. A., W. El-Kholy, N. F. Abbas, A. Ebaid, H. A. Amra, and M. A. Abdel-Wahhab. 2007. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*, 50: 256-269. {PubMed}
- 13- Erdogan, Z., S. Erdogan, O. Aslantas, and S. Celik. 2010. Effects of dietary supplementation of synbiotics and phytobiotics on performance, caecal coliform population and some oxidant/antioxidant parameters of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5): 40-48.
- 14- Foye, O. T., Z. Uni, and P. R. Fekret. 2006. Effect of in ovo feeding egg white protein, I-Hydroxy-IMethyl butyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science*, 85: 1185-1192.
- 15- Ghahri, H., T. Tooloei, and B. Soleimani. 2013. Efficacy of antibiotic, probiotic, prebiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, intestinal histomorphology and immune response in broiler chickens. *Global Journal of Animal Scientific Research*, 25-41.
- 16- Gibson, G. R, and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulationof the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125: 1401-1412
- 17- Jin, L. Z., Y. w. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures. *Poultry Science*, 1259-1265.
- 18- Kannan, M., R. Karunakaran, V. Balakrishnan, and T. G. Prabhakar. 2005. Influnce of prebiotic supplementation on

- lipid of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 994-997.
- 19- Kannan, D., K. Viswanathan, and B. Mohan. 2007. The effect of feeding virginiamycin and lactobacillus sporogenes on broiler production performance characters. *Journal of Veterinary and Animal Science*, 106:1080.
- 20- Mehri, M., H. Ghasemi, and H. Moradi Shahrababak. 2013. Synbiotic effect (BIOMIN IMBO) on performance, serum lipids and humoral immune responses in broiler chicks. *Animal Production Research*, 2(3): 59-66. (In persian).
- 21- Midilli, M., M. Alp, N. Kocabagli, Ö. H. Muglali, N. Turan, H. Yilmaz, and S. Çakir. 2008. Effects of dietary probiotic and prebiotic supplementation on growth performance and serum IgG concentration of broilers. *South African Journal of Animal Science*, 38: 21-27.
- 22- Moghaddam, A., M. Karimi Tarshizi, and Sh. Rahimi. 2008. Effect of different methods of administration of probiotic in hatchery on growth performance and immune system plates in broiler chickens. *Veterinary research journal*, 65(2): 91-96. (In persian).
- 23- Moteghitalab, m., and M. Haji Hosseini. 2005. Egg injection technology: Effects of amino acid injection in eggs on chicken hatchability and chickens' economic characteristics. *National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran*, 1-3. (In persian).
- 24- Mousavi, N., M. Shiwarzad, M. Chamani, H. Lotfelahyan, and A. A. Sadeghi. 2011. Effects of Injection of Amino Acid, Carbohydrate, and Butyric Acid on Hatchery Eggs on Intestinal Morphology and Performance of Broiler Chickens. *Iranian Journal of Animal Sciences*. 153- 160. (In persian). *Iranian Journal of Animal Sciences*, 42(2): 153-160. (In persian).
- 25- National Research Council (NRC). 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th revised ed National Academy Press. Washington, D.C.
- 26- Ohta, Y., N. Tsushima, K. Koide, M. T. Kidd, and T. Ishibashi. 1999. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. *Poultry Science*, 78: 1493-1498.
- 27- Ohta, Y., M. T. Kidd, and T. Ishibashi. 2001. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in ovo administration of amino acids. *Poultry Science*, 80: 1430-1436.
- 28- Owings, W. G., D. L. Reynolds, R. J. Haslak, and P. R. Ferket. 1990. Influence of dietary supplementation with *Streptococcus faecium* M-74 on broiler weight, feed conversion, carcass characteristics and intestinal microbial colonization. *Poultry Science*, 1257- 1264.
- 29- Salmanzadeh, M., J. Ghanouni Bostanabad, and Sh. Arva. 2014. The effects of in ovo injection of Butyric acid into Quails Breeder eggs on hatchability, growth performance, development of the gastrointestinal tract, and carcass traits of Japanese Quails. 126 page. Original Article.
- 30- Sharifi, M. R., M. Shams-Shargh, B. Dastar, and S. Hassani. 2011. The effect of dietary protein levels and synbiotic on performance parameters, blood characteristics and carcass yields of Japanese quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *Italian Journal of Animal Science*, 17-21.
- 31- Sherief, M. A, and M. S. A. Sherief. 2011. The effect of single or combined dietary supplementation of mannan oligosaccharide and probiotics on performance and slaughter characteristics of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 854-862.
- 32- Sirvydis, V., R. Bobiniene, D. Gudaviciute, R. Cepulienė, V. Semaska, D. Vencius, and I. Kepaliene. 2006. Influence of a prebiotic feed additive on some biochemical indices of blood and intestinal microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 57-62.
- 33- Tona, K., F. Bamelis, B.D. Ketelaere, V. Bruggeman, V. M. Moraes, J. Buyse, O. Onagbesan, and D. Decuypere. 2003. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poultry Science*, 82:736-741.
- 34- Uni, Z., and P. Ferket. 2004. Methods for early nutrition and their potential. *World's Poultry Science Journal*, 60:101-111
- 35- Uni, Z., P. R. Ferket, E. Tako, and O. Kedar. 2005. In ovo feeding improve energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84:764-770.
- 36- Wang, X., Y. Z. Farnell, E. D. Peebles, A. S. Kiess, K. G. S. Wamsley, and W. Zhai. 2016. Effect of prebiotics, probiotics and their combination on growth performance, small intestine, morphology, and resident *Lactobacillus* of male broilers. *Poultry Science*, 1-9.
- 37- Yeo, J., and K. L. Kim. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic. A probiotic, or yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chick. *Poultry. Science*. 76. 381-385.



The effects of *in ovo* injection of synbiotic on hatchability, chick quality, blood indices and performance of newly hatched chicks of Japanese Quail

Shadih Asaadi¹, Mohsen Daneshyar^{2*}, Younes Alijoo³

Submitted: 25-06-2019

Accepted: 24-10-2020

Asaadi, S., M. Daneshyar, and Y. Alijoo. 2021. The effects of *in ovo* injection of synbiotic on hatchability, chick quality, blood indices and performance of newly hatched chicks of Japanese Quail. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):389-404.

Introduction The embryonic stage is the most critical and sensitive period in development of organisms especially the birds. *In ovo* injection is a good instrument for feeding the essential nutrients to growing embryo in birds. The *in ovo* application of nutrients provides the further benefits to the growth and development of the growing embryo. This experiment was conducted to investigate the effects of *in ovo* injection of synbiotic solution on hatchability, quality indices, weights and blood indices of one-day old chicks in Japanese quail.

Materials and Methods Three hundred and seventy five quail eggs were allocated to five treatments of control (without injection), 2 ml injection of distilled water and injection of 1, 2 and 4 μ g synbiotic solution. On day 8 of incubation, the eggs were randomly divided to five groups each containing 75 eggs. Injection was done on day 8 of incubation into the air sac of the eggs by insulin syringes. The injection site on the top of the eggs was sterilized by ethanol 70% and a small hole was made with needle of 27G. After injection, the holes were sealed by paraffin and returned to the incubator. At the end of day 17, the unhatched eggs were opened to identify the infertile eggs or dead embryos. On hatching day, two chicks were used to determination of chick quality. All the hatched birds were weighted. Then all the hatched chicks were reared up to day 35 of age in the separate pens (five replicates pen for each treatment). The performance factors (weight gain, feed intake and feed conversion ratio) were determined during the experimental week. Moreover, the carcass characteristics (carcass, thigh and breast) internal organs (liver, gizzard, intestine and heart) were determined at the end of the experiment (35 days of age). All the experimental data were introduced to SAS (9.1) in a completely randomized design with five treatments and five replicate each. The means were further separated using Tukey-Kramer multiple comparison test.

Results and Discussion The results showed that *in ovo* injection had no effects on quality parameters of newly hatched chicks ($P>0.05$). Moreover, synbiotic injection to the quail eggs caused a decrease in hatchability ($P<0.05$). Furthermore, the synbiotic injection did not affect the weight of day old chicks ($P>0.05$). No effect of synbiotic injection was observed during weeks 1, 3, 4 and 5 ($P>0.05$). In week 2, injection of distilled water and synbiotic caused higher weight gain as compared to control ($P<0.05$) whereas there were no significant differences between the other treatments. Distillated water or synbiotic injection did not affect feed consumption during weeks 1 and 4 ($P>0.05$) but changed the feed intake during weeks 2, 3 and 5 ($P<0.05$). During week 2, 1 μ g synbiotic injection increased the feed intake as compared to the other treatments whereas no significant differences were observed between the others during this week. During week 3, injection of 1 and 2 μ g synbiotic caused the higher feed intake in comparison to other treatments and the highest feed intake belonged to the birds with 2 μ g synbiotic injected eggs. In week 5, injection of 1 and 2 μ g synbiotic caused a higher feed intake but only the effect of 2 μ g synbiotic injection was significant ($P<0.05$). Moreover, no effects of *in ovo* injection of synbiotic were indicated for carcass characteristics (carcass, breast and thigh), internal organs (liver, heart, intestine and gizzard) and blood indices (urea,

1- MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

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

(*- Corresponding author email: m.daneshyar@urmia.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.81538

uric acid, glucose, triglyceride, creatinine and protein) ($P>0.05$). No significant differences were observed between the treatments for blood enzymes of alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase ($P>0.05$).

Conclusion According to the results of current experiment, synbiotic in ovo injection to quail eggs had no effects on weight and quality of one day old chicks but caused the lower hatchability. In ovo injection of 1 μg synbiotic to the air sac of the quail eggs improved the weight gain of hatched chicks after hatch but causes the higher feed intake and feed conversion ratio. Injection of higher synbiotic more than 2 μg to the air sac of quail eggs increases the feed intake and feed conversion ratio of quail chicks. Moreover, synbiotic injection did not affect carcass characteristics, internal organs, blood enzymes and indices of quails.

Keywords: Chick quality, Growth performance, In ovo injection, Japanese quail, Probiotic and prebiotic.



مقاله علمی - پژوهشی

اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین A به جیره‌های بر پایه گندم بر عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی

صغری حاتمی^۱، محمدرضا اکبری^{۲*}، فریبرز خواجهلی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۰۳

حاتمی، ص.، م. ر. اکبری، و ف. خواجهلی. ۱۴۰۰. اثر افزودن سطوح مختلف ویتامین A به جیره‌های بر پایه گندم بر عملکرد، قابلیت هضم مواد مغذی و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۱۶-۴۰۵.

چکیده

جهت ارزیابی اثر افزایش سطح ویتامین A در جیره‌های بر پایه گندم بر عملکرد، سیستم ایمنی، و هضم مواد مغذی در جوجه‌های گوشتی، ۲۰۰ قطعه جوجه‌خروس سویه راس ۳۰۸ در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل جیره‌های بر پایه گندم حاوی ویتامین A در سطوح ۱۵۰۰، ۴۵۰۰، ۷۵۰۰، ۱۰۵۰۰ و ۱۳۵۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم (IU/kg) بود. جهت بررسی پاسخ ایمنی، تزریق گلبول‌های قرمز خون گوسفند (SRBC) و آزمون حساسیت بازوفیلی پوستی (CBH) انجام شد. هضم‌پذیری مواد مغذی در ۲۱ روزگی اندازه‌گیری شد. در سن ۴۲ روزگی، ۲ پرنده از هر تکرار انتخاب و پس از خون‌گیری، کشته شد. جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته شیرابه هضمی، محتویات رژنوم و ایلئوم نمونه‌گیری شد. برای بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی، غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در نمونه‌های سرم اندازه‌گیری شد. سطوح مختلف ویتامین A تأثیری بر عملکرد، پاسخ CBH و قابلیت هضم مواد مغذی نداشت. ویتامین A در سطح ۱۳۵۰۰ IU/kg تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC را افزایش داد. سطوح متوسط ویتامین A (۴۵۰۰ و ۷۵۰۰) سبب کاهش غلظت MDA سرم شد. سطوح متوسط و بالای ویتامین A (۷۵۰۰ تا ۱۳۵۰۰) سبب کاهش ویسکوزیته محتویات رژنوم و همچنین کاهش وزن نسبی کل دستگاه گوارش شد. ویتامین A در سطح ۴۵۰۰ IU/kg چربی بطنی را کاهش داد. ویتامین A در سطح ۷۵۰۰ IU/kg شاخص تولید را افزایش داد. به طور کلی با توجه به اثرات مثبت ذکر شده در فوق و همچنین با توجه به شاخص تولید و هزینه انجام شده به ازاء هر کیلوگرم افزایش وزن و تولید گوشت، استفاده از سطح ۷۵۰۰ IU قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: چربی لاشه، دفاع آنتی‌اکسیدانی، ویتامین A، ویسکوزیته، هضم‌پذیری.

مقدمه

است که باعث افزایش ویسکوزیته مواد هضمی در روده کوچک شده که به دنبال آن کاهش هضم و جذب مواد مغذی (خصوصاً چربی) و کاهش بازدهی خوراک بروز می‌کند (۱۳). گندم از نظر محتوای ویتامین A فقیر است (۲۹). به علاوه، کاهش قابلیت هضم چربی جیره در نتیجه NSP موجود در گندم، منجر به کاهش جذب ویتامین A از جیره می‌شود. ویسکوزیته شیرابه هضمی سبب ایجاد تغییرات منفی در بافت پوششی و تکثیر سلول‌های مخاطی روده می‌شود (۷، ۲۸). خرم‌آبادی و همکاران (۱۷) بیان کردند که گندم به تنهایی حاوی

ذرت عمده‌ترین غله مورد استفاده در تهیه جیره‌های طیور بوده و به نوعی مهمترین منبع تأمین انرژی در این جیره‌ها به شمار می‌رود. در ایران نیز ذرت وارداتی به طور گسترده‌ای به عنوان منبع انرژی در جیره طیور خصوصاً جوجه‌های گوشتی استفاده می‌شود، ولی در شرایطی که واردات آن دچار اشکال شده یا قیمت آن بالا باشد، گندم جایگزین مناسبی محسوب می‌شود. یکی از مشکلات استفاده از گندم در جیره، وجود پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (NSP) در این غله

۳-استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
(Email: akbari-m@agr.sku.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v13i3.87540

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲-استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

آگلوتیناسیون مشاهده شد به عنوان تیتراژ آنتی بادی تولید شده بر علیه SRBC گزارش شد.

به منظور بررسی پاسخ ایمنی سلولی، تست حساسیت بازوفیلی پوستی (CBH) در سن ۴۱ روزگی مطابق روش تشریح شده توسط محمدی و اکبری (۲۰) انجام شد. به طور خلاصه، دو پرنده از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب و میزان ۰/۱ میلی لیتر از محلول PHA-P (بهار افشان، تهران، ایران) در PBS (با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر) به پای راست هر پرنده، بین انگشت سوم و چهارم تزریق شد. جهت تصحیح برای پاسخ به PBS تنها، به طور همزمان در هر پرنده میزان ۰/۱ میلی لیتر محلول PBS به پوست بین انگشت سوم و چهارم پای چپ تزریق شد. پس از گذشت ۱۲ و ۲۴ ساعت از تزریق، میزان تورم حاصل با استفاده از میکرومتر دیجیتالی اندازه گیری شد. پاسخ CBH از تفاضل میزان ضخامت پوست پای راست بعد از تزریق PHA از ضخامت پوست پای چپ بعد از تزریق PBS محاسبه شد.

جهت بررسی قابلیت هضم ظاهری (TTAD) پروتئین خام (CP) و عصاره اتری (EE)، در سن ۱۸ روزگی اکسید کروم (Cr_2O_3) به میزان ۰/۳ درصد به عنوان یک مارکر خارجی به خوراک مصرفی جوجه ها اضافه شد. پس از طی یک دوره عادت پذیری، در سن ۲۱ روزگی و برای مدت ۲۴ ساعت (هر ۶ ساعت یک بار) فضولات هر یک از واحدهای آزمایشی به صورت جداگانه نمونه گیری شد. در انتهای ۲۴ ساعت، فضولات جمع آوری شده از هر واحد آزمایشی مخلوط شده و یک نمونه همگن گرفته شد و جهت انجام آزمایشات قابلیت هضم در دمای $20^{\circ}C$ منجمد شد. از خوراک حاوی اکسید کروم نیز نمونه گیری صورت گرفت. نمونه های خوراک و فضولات سپس برای اندازه گیری CP (روش شماره 201.11) و EE (روش شماره 920.39) مطابق با دستورالعمل AOAC (۲) مورد استفاده قرار گرفت. درصد اکسید کروم در نمونه های خوراک و فضولات با استفاده از روش تشریح شده توسط فنتون و فنتون (۱۲) اندازه گیری شد. در نهایت TTAD برای CP و EE با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$TTAD (\%) = 100 - 100 \times \left(\frac{\% \text{ chromium in feed}}{\% \text{ chromium in excreta}} \times \frac{\% \text{ nutrient in excreta}}{\% \text{ nutrient in feed}} \right)$$

در پایان دوره آزمایش (سن ۴۲ روزگی) ۲ قطعه جوجه به صورت تصادفی از هر واحد آزمایشی انتخاب و پس از خون گیری کشته شد. پس از برش ناحیه شکم، اندام های گوارشی خارج شده و توزین شدند. بورس فابریسیوس، طحال، کبد و چربی

مقادیر ناچیزی ویتامین A بوده و عدم استفاده از ویتامین A در مکمل های ویتامینی مورد استفاده در جیره های برپایه گندم سبب کاهش رشد، افزایش ویسکوزیته شیرابه دستگاه گوارش و اثرات منفی بر بافت پوششی روده می شود. با توجه به این که ویتامین A از جمله ویتامین های مهم در تولید و نگهداری بافت پوششی است (۵)، بنابراین در شرایط استفاده از جیره هایی که ویسکوزیته محتویات روده را افزایش می دهند (نظیر جیره های برپایه گندم)، احتمالاً نیاز به ویتامین A جهت نگهداری بافت پوششی روده افزایش می یابد. لذا به نظر می رسد استفاده از سطوح بالاتر ویتامین A در جیره های برپایه گندم تا حدودی بتواند کمبود ذاتی این ویتامین در گندم و کمبود ویتامینی ناشی از هضم نامناسب چربی را جبران و در جلوگیری از اثرات ضد تغذیه ای حاصل از این غله، مطلوب واقع شود. در این پژوهش، اثر افزودن ویتامین A در سطوح مختلف به یک جیره برپایه گندم بر عملکرد، هضم پذیری مواد مغذی، پاسخ های ایمنی و دفاع آنتی اکسیدانی جوجه های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار مورد استفاده قرار گرفت. جیره پایه برای دوره آغازین (صفر تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) بر اساس توصیه NRC (۲۱) و با استفاده از گندم به عنوان غله اصلی تهیه شد (جدول ۱). برای تهیه جیره پایه از مکمل ویتامینی فاقد ویتامین A استفاده شد. تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش عبارت بودند از: (۱) جیره پایه + ۱۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A در هر کیلوگرم، (۲) جیره پایه + ۴۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A در هر کیلوگرم، (۳) جیره پایه + ۷۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A در هر کیلوگرم، (۴) جیره پایه + ۱۰۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A در هر کیلوگرم، و (۵) جیره پایه + ۱۳۵۰۰ واحد بین المللی ویتامین A در هر کیلوگرم که برای دوره های آغازین (صفر تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تهیه شدند. در طی آزمایش مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک به صورت دوره ای (آغازین، رشد و کل دوره پرورش) اندازه گیری و محاسبه شد.

جهت بررسی پاسخ ایمنی همورال، در این آزمایش از گلبول های قرمز خون گوسفند (SRBC) به عنوان آنتی ژن استفاده شد. محلول ۲ درصد SRBC در سن ۲۸ روزگی به ماهیچه ران دو پرنده از هر تکرار تزریق شد. هفت و ۱۴ روز پس از تزریق، خون گیری از سیاهرگ بال همان پرندگان انجام گرفت (۱۴). میزان تیتراژ آنتی بادی علیه SRBC در سرم به دست آمده، با استفاده از روش سنجش مستقیم هماگلوتیناسیون تعیین گردید (۱۴). جهت بیان نتایج، لگاریتم بر مبنای دو معکوس ضریب رقت در آخرین چاهکی که در آن

محوطه بطنی نیز هر یک به صورت جداگانه توزین شدند. سپس روده بار یک جدا شده و طول و وزن دثودنوم، ژژنوم، و ایلئوم اندازه‌گیری شد. در نهایت وزن کل لاشه آماده طبخ و بخش‌های

جدول ۱- اجزای مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه

Table 1- Ingredients and chemical composition of basal diet

مواد خوراکی (درصد) Ingredients (%)	دوره آغازین (۱ تا ۲۱) Starter (1-21)	دوره رشد (۲۲ تا ۴۲) Grower (22-42)
گندم Wheat	53.47	60.86
کنجاله سویا Soybean meal	36.60	29.92
روغن سویا Soybean oil	6.07	5.87
کربنات کلسیم (صدف) Calcium carbonate	1.31	1.4
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.44	1.05
بی کربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.16	0.14
نمک Salt	0.27	0.17
دی‌ال- متیونین DL-methionine	0.18	0.09
مکمل ویتامینی (عاری از ویتامین A) ^۱ Vitamin premix (no vitamin A) ¹	0.25	0.25
مکمل معدنی ^۲ Mineral premix ²	0.25	0.25
ترکیب شیمیایی (درصد) Chemical composition (%)		
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) Metabolizable energy (kcal/kg)	3000	3100
پروتئین خام Crude protein	21.56	19.37
کلسیم Calcium	0.937	0.874
فسفر قابل دسترس Available phosphorus	0.422	0.34
لیزین Lysine	1.15	0.99
متیونین+سیستئین Methionine + cysteine	0.84	0.71

^۱تامین کننده در هر کیلوگرم جیره: ۰/۰۵ میلی‌گرم ویتامین D3، ۴ میلی‌گرم ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین K3، ۱/۸ میلی‌گرم تیامین، ۶/۶ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۹/۸ میلی‌گرم نیاسین، ۲۹/۷ میلی‌گرم پنتوتنات، ۱/۱۸ میلی‌گرم پریدوکسین، ۱ میلی‌گرم اسیدفولیک، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم کوبالامین، ۰/۱ میلی‌گرم بیوتین، ۵۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید.

^۲تامین کننده در هر کیلوگرم جیره: ۷۶ میلی‌گرم منگنز، ۹۲/۵ میلی‌گرم روی، ۴۰ میلی‌گرم آهن، ۴ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۰/۶۴ میلی‌گرم ید.

^۱Provides per kg of diet: cholecalciferol, 0.05 mg; all-rac- α -tocopherol acetate, 4 mg; menadione (menadione sodium bisulphate), 2 mg; thiamine (thiamine mononitrate), 1.8 mg; riboflavin, 6.6 mg; Niacin, 9.8 mg; Ca-pantothenate, 29.7 mg; pyridoxine, 1.18 mg; folic acid, 1 mg; Cobalamin, 0.015 mg; D-biotin, 0.1 mg; choline chloride, 500 mg.

^۲Provides per kg of diet: 76 mg Mn (as MnO₂); 92.5 mg Zn; 40 mg Fe (as FeSO₄·7H₂O); 4 mg Cu (as CuSO₄·5H₂O); 0.64 mg I (as NaI); 0.2 mg Se (as Na₂SeO₃·5H₂O).

مصرفی برای گروه مصرف کننده پایین ترین سطح ویتامین A در نظر گرفته شد. شاخص تولید (Production index) برای تیمارهای مختلف آزمایشی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Production index} = \left(\frac{\% \text{ liveability} \times \text{average live weight (kg)}}{\text{FCR} \times \text{production period (day)}} \right) \times 100$$

داده‌های حاصل از هر یک از بخش‌های آزمایش با استفاده از روش مدل‌های خطی عمومی (GLM)، نرم‌افزار SAS (۲۳) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. معنی‌داری اختلاف میان میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن امتحان گردید (۱۰).

به منظور اندازه‌گیری ویسکوزیته شیرابه هضمی، پس از جمع‌آوری محتویات ژنوم و ایلئوم و قرار دادن لوله‌های حاوی محتویات درون یخ، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور $\times 500$ g، شیرابه محتویات جدا شده و با استفاده از دستگاه ویسکومتر دیجیتالی (Brookfield DV-II+pro, USA) ویسکوزیته هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

به منظور بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی سرم خون، غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) در نمونه‌های سرمی حاصل از نمونه‌گیری در سن ۴۲ روزگی، بر اساس روش تشریح شده توسط سیاه‌تیری و همکاران (۲۵) اندازه‌گیری شد.

هزینه نسبی خوراک مصرفی به ازاء واحد وزن زنده و همچنین واحد وزن لاشه آماده طبخ، به صورت درصدی از هزینه خوراک

جدول ۲- اثر سطوح مختلف ویتامین A در جیره بر عملکرد جوجه‌های گوشتی

Table 2-Effect of different vitamin A levels in diet on performance of broiler chickens

عملکرد Performance	دوره (روز) Period (d)	سطوح ویتامین A (واحد بین‌المللی) (IU) Vitamin A levels (IU)					SEM	P-value
		1500	4500	7500	10500	13500		
خوراک مصرفی (گرم) Feed intake (g)	1-21	978 ^a	959 ^{ab}	925 ^{bc}	878 ^c	907 ^c	15.21	0.002
	22-42	2824	2927	2879	2753	2710	105.32	0.59
	1-42	3856	3783	3852	3587	3661	112.29	0.38
افزایش وزن (گرم) Weight gain (g)	1-21	644	656	658	593	588	21.91	0.09
	22-42	1358	1429	1488	1326	1392	85.44	0.71
	1-42	2002	2086	2146	1915	1985	93.75	0.47
ضریب تبدیل خوراک FCR (g/g)	1-21	1.51	1.46	1.4	1.49	1.53	0.039	0.24
	22-42	2.16	1.97	1.96	2.04	1.98	0.08	0.41
	1-42	1.93	1.81	1.79	1.87	1.84	0.04	0.30
شاخص تولید Production index	1-42	221 ^b	267 ^{ab}	276 ^a	235 ^{ab}	247 ^{ab}	14.82	0.04
هزینه نسبی خوراک (%) Feed cost (%) ¹	Per kg LW	100	93.8	92.7	97.5	96.2	-	-
	Per kg carcass	100	94.0	96.3	98.0	99.1	-	-

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشانه وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($p < 0.05$).

¹ هزینه خوراک مصرفی که به صورت درصدی از هزینه خوراک برای پایین‌ترین سطح ویتامین A (۱۵۰۰ IU) بیان شده است؛ Per kg LW: به ازاء هر کیلوگرم وزن زنده؛ Per kg carcass: به ازاء هر کیلوگرم وزن لاشه آماده طبخ.

^{a,b} Within each row, mean values with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

¹Feed cost has been expressed as the percent of the lowest level of vitamin A (1500 IU); Per kg LW: per kg live weight; Per kg carcass: per kg ready to cook carcass weight.

مصرف‌کننده جیره حاوی ۱۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم و کمترین مصرف خوراک در گروه‌های مصرف‌کننده جیره‌های حاوی ۱۰۵۰۰ IU و ۱۳۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم بود. به عبارت دیگر، در دوره آغازین تیمارهای ۴ و ۵ در مقایسه با تیمار ۱، مصرف خوراک کمتری داشتند ($p < 0.05$). در عین حال، میزان مصرف خوراک در دوره رشد (۲۱ تا ۴۲ روزگی) و کل دوره پرورش (۱ تا ۴۲ روزگی)، در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به مصرف خوراک، افزایش وزن، ضریب تبدیل خوراک، شاخص تولید و همچنین هزینه نسبی خوراک مصرفی به ازاء واحد وزن زنده و همچنین واحد وزن لاشه آماده طبخ، در تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۲ قابل مشاهده است. میزان خوراک مصرفی در دوره آغازین بین تیمارهای آزمایشی متفاوت بود ($p < 0.05$)، به نحوی که بیشترین مصرف خوراک در گروه

وزن نسبی طحال و بورس فابریسیوس در جدول ۳ آورده شده است. افزودن ویتامین A در سطح ۱۳۵۰۰ IU در هر کیلوگرم جیره سبب بهبود تیترا آنتی بادی علیه SRBC در ۷ روز پس از تزریق شد ($p < 0.05$). مشابه با این یافته، کاراداس و همکاران (۱۶) با افزودن بتا-کاروتن به جیره جوجه‌های گوشتی، بهبود پاسخ آنتی‌بادی علیه ویروس نیو کاسل را گزارش کردند. بهبود پاسخ‌های ایمنی در جوجه‌های گوشتی با افزودن پیش‌سازهای ویتامین A (کاروتنوئیدها) به جیره گزارش شده است (۱۵). همچنین، بهاری و همکاران (۴) گزارش کردند که با افزایش غلظت ویتامین A از ۶۰۰۰ به ۱۲۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک، افزایش معنی‌داری در عکس‌العمل سیستم ایمنی هومورال مشاهده نشد؛ اما با افزایش سطح این ویتامین به ۱۸۰۰۰ واحد بین‌المللی در کیلوگرم خوراک، بیشترین تولید آنتی‌بادی بر ضد SRBC مشاهده شد. راس (۲۲) نشان داد که تولید آنتی‌بادی در جوجه‌هایی که ویتامین A کافی دریافت نکرده بودند کمتر از جوجه‌هایی بود که با مقدار مناسب ویتامین A تغذیه شدند. همچنین این محققین نشان دادند که افزودن ویتامین A به جیره می‌تواند باعث افزایش تولید سیتوکین از نوع لمفوکین، تکثیر لنفوسیت‌ها، افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و فاگوسیتوز شود. به علاوه، اسکالان و داناقو (۲۷) نشان دادند که افزایش سطح ویتامین A در خوراک باعث افزایش تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس آبله و نیوکاسل می‌شود. از سوی دیگر، نشان داده شده است که کمبود ویتامین A باعث افزایش تلفات ناشی از بیماری نیوکاسل می‌شود (۲۶).

افزودن ویتامین A به جیره‌های بر پایه گندم در سطوح مورد استفاده در این آزمایش، تأثیری بر پاسخ CBH در ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق PHA نداشت ($p > 0.05$). پاسخ CBH در طیور به عنوان یک پاسخ ایمنی سلولی در نظر گرفته شده و معمولاً به عنوان معیاری آسان جهت بررسی ایمنی سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). عدم تأثیر سطوح مختلف ویتامین A بر پاسخ CBH در این آزمایش می‌تواند نشان دهنده اهمیت کمتر این ویتامین در پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلولی در مقایسه با تولید آنتی‌بادی باشد (۲۴).

افزودن ویتامین A در سطوح ۴۵۰۰ IU و ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم جیره سبب کاهش غلظت MDA در سرم شد ($p < 0.05$). میزان MDA که یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدها در بدن به شمار می‌رود، به عنوان شاخصی از آسیب اکسیداتیو مورد توجه است. کاهش غلظت MDA در نتیجه بالا بردن سطح ویتامین A در جیره نشان دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانی این ویتامین می‌باشد. در توافق با نتایج این پژوهش، کاراداس و همکاران (۱۶) نیز گزارش کردند که استفاده از مکمل بتا کاروتن در جیره سبب افزایش قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی در پلاسما و کبد جوجه‌های گوشتی شده است. اثر سطوح مختلف ویتامین A در این آزمایش بر وزن نسبی طحال و بورس فابریسیوس

علت این امر احتمالاً می‌تواند به وجود ذخایر ویتامین A در کیسه زرده در اوایل دوره رشد نسبت داده شود. با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد که وجود ذخایر زرده‌ای ویتامین A در اوایل دوره رشد، نیاز به ویتامین A در این دوره را نسبت به دوره‌های بعدی کاهش می‌دهد، به این معنی که تأمین سطوح بالاتر ویتامین A در جیره در اوایل دوره رشد می‌تواند سریع‌تر منجر به بروز علائم مسمومیت با این ویتامین و کاهش مصرف خوراک در این دوره شود. گزارش شده است که سطوح بالای ویتامین A، به طور منفی پاسخ‌های مرتبط با وضعیت ویتامین D_3 (نظیر سطح کلسیم پلاسما، خاکستر استخوان، ریکتر و رشد) در جوجه‌های گوشتی را تحت تأثیر قرار داده است (۱). این امر به احتمال زیاد در نتیجه رابطه تضاد موجود بین ویتامین‌های A و D_3 بوده است.

سطوح مورد استفاده ویتامین A در این آزمایش، تأثیری بر افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های آغازین، رشد و همچنین کل دوره پرورش نداشت ($p > 0.05$). در عین حال، از نظر عددی تیمار ۳ (گروه مصرف‌کننده جیره حاوی ۷۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم) در مقایسه با سایر گروه‌ها، بیشترین افزایش وزن بدن و کمترین ضریب تبدیل خوراک را در هر یک از دوره‌های پرورش و همچنین کل دوره پرورش، به خود اختصاص داد (جدول ۲). به علاوه، تیمارهای ۴ و ۵ (به ترتیب، حاوی ۱۰۵۰۰ IU و ۱۳۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم) تمایل به کاهش مصرف خوراک و افزایش وزن، و همچنین افزایش ضریب تبدیل خوراک داشتند (جدول ۲). لذا به نظر می‌رسد که افزایش سطح ویتامین A در جیره‌های بر پایه گندم به بیش از ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم، احتمالاً تأثیری در بهبود عملکرد نداشته و حتی می‌تواند منجر به بروز تأثیرات منفی بر عملکرد شود. این امر می‌تواند به رابطه تضاد موجود بین ویتامین‌های محلول در چربی، خصوصاً ویتامین‌های A، D_3 و E نسبت داده شود، به گونه‌ای که افزایش بیش از حد یکی از این ویتامین‌ها در جیره می‌تواند به صورت منفی جذب دو ویتامین دیگر را تحت تأثیر قرار دهد (۸، ۱۹). در آزمایشی دیگر، افزودن بتا-کاروتن به صورت مکمل به جیره جوجه‌های گوشتی تأثیری بر رشد و عملکرد آنها نداشته است (۱۶).

بالاترین شاخص تولید در گروه مصرف‌کننده جیره حاوی ۷۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم مشاهده شد که تفاوت آن با گروه مصرف‌کننده جیره حاوی ۱۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم معنی‌دار بود ($p < 0.05$). این امر می‌تواند به دلیل حصول ضریب تبدیل کمتر و افزایش وزن بیشتر در گروه مصرف‌کننده جیره حاوی ۷۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم باشد. همچنین کمترین هزینه نسبی خوراک به ازاء تولید هر کیلوگرم وزن زنده و وزن لاشه به ترتیب در گروه‌های مصرف‌کننده جیره حاوی ۷۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم و ۴۵۰۰ IU ویتامین A در هر کیلوگرم بدست آمد (جدول ۲).

نتایج مربوط به تست SRBC، پاسخ CBH، غلظت MDA و

معنی‌دار نشد ($p > 0.05$). بر خلاف این یافته، دی‌ویس و سل (۹) رشد کمتر تیموس و بورس فابریسیوس را در اثر کمبود ویتامین A در

جدول ۳- اثر سطوح ویتامین A در جیره بر پاسخ SRBC ($\log_2$ معکوس ضریب رقت)، پاسخ CBH (میکرومتر)، غلظت مالون دی‌آلدهید (میکرو مول/لیتر) و وزن اندام‌های ایمنی در جوجه‌های گوشتی

Table 3- Effect of different vitamin A levels in diet on antibody titers against SRBC ($\log_2$ of reciprocal dilution factor), CBH response (μm), malondialdehyde ($\mu\text{mol/l}$) and immune organ weights in broiler chickens

	سطوح ویتامین A (واحد بین‌المللی) (IU)					SEM	P-value
	1500	4500	7500	10500	13500		
پاسخ SRBC							
۷ روز پس از تزریق 7 days post injection	4.39 ^b	5.00 ^{ab}	4.82 ^{ab}	5.25 ^{ab}	6.25 ^a	0.48	0.05
۱۴ روز پس از تزریق 14 days post injection	4.50	4.67	4.82	5.50	5.25	0.52	0.45
پاسخ CBH							
۱۲ ساعت پس از تزریق 12 hrs post injection	708	682	637	454	509	133.1	0.35
۲۴ ساعت پس از تزریق 24 hrs post injection	628	653	593	464	499	150.8	0.71
مالون دی‌آلدهید Malondialdehyde ($\mu\text{mol/l}$)	0.63 ^a	0.42 ^b	0.36 ^b	0.45 ^{ab}	0.46 ^{ab}	0.07	0.05
وزن نسبی طحال (%) Spleen (%)	0.117	0.104	0.121	0.114	0.128	0.015	0.91
وزن نسبی بورس (%) Bursa of Fabricius (%)	0.142	0.146	0.170	0.193	0.172	0.035	0.54

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ردیفه نشانه وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($p < 0.05$).

^{a,b} Within each row, mean values with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

مواد در دستگاه گوارش می‌شود (۶). افزایش ویسکوزیته محتویات روده، قادر است به طور مستقیم و از طریق تأثیر بر انتشار اجزای محلول در فاز آبی حفره روده و نیز به واسطه افزایش ضخامت مؤثر لایه آب ساکن در جدار مخاطی روده، قابلیت هضم تمامی مواد مغذی را کاهش دهد (۱۸). به طور کلی، چنانچه عمل هضم به واسطه کیفیت اجزای تشکیل دهنده جیره، فعل و انفعالات میکروبی و یا عوامل ضد تغذیه‌ای، به طور مداوم تحت شرایط نامطلوبی قرار داشته باشد، آنگاه واکنش دستگاه گوارش، افزایش اندازه (سطح) و تولید بیشتر آنزیم‌های گوارشی خواهد بود. کاهش وزن نسبی مشاهده شده برای کل دستگاه گوارش و ایلئوم در نتیجه افزایش سطح ویتامین A در جیره، می‌تواند به دلیل اثرات سطوح بالاتر ویتامین A در جهت کاهش ویسکوزیته محتویات هضمی ایجاد شده باشد. به طوریکه، کاهش ویسکوزیته محتویات هضمی سبب حذف مکانیسم‌های سازگاری ذکر شده در فوق شده و در نتیجه وزن دستگاه گوارش نیز کاهش یافته است. در تطابق با این یافته، خرم آبادی و همکاران (۱۷) نیز بیان کردند که کمبود ویتامین A در جیره بر پایه گندم سبب افزایش ویسکوزیته محتویات گوارشی شده در حالی که افزودن ویتامین A به جیره در سطوح مازاد بر احتیاجات، دارای اثرات کاهشی

نتایج مربوط به طول، وزن نسبی و ویسکوزیته محتوای روده باریک در جدول ۴ آورده شده است. افزودن ویتامین A به جیره بر پایه گندم تأثیر معنی‌داری بر طول بخش‌های مختلف روده باریک و وزن نسبی دئودنوم و ژژنوم نداشت ($p > 0.05$). در عین حال، افزودن ویتامین A به جیره در سطوح ۴۵۰۰ IU و ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم سبب کاهش وزن نسبی ایلئوم در مقایسه با سطح ۱۵۰۰ IU در هر کیلوگرم شد ($p < 0.05$). همچنین افزودن ویتامین A به جیره در سطوح بالاتر از ۱۵۰۰ IU در هر کیلوگرم سبب کاهش وزن نسبی کل دستگاه گوارش شد ($p < 0.05$). به علاوه، افزایش سطح ویتامین A در جیره بر پایه گندم به بیش از ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم باعث کاهش میزان ویسکوزیته محتویات ژژنوم شد ($p < 0.05$). البته، افزایش سطح ویتامین A در جیره تأثیر معنی‌داری بر میزان ویسکوزیته محتویات ایلئوم نداشت ($p > 0.05$).

پس از خورده شدن دانه گندم، بخش پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای محلول در آب نظیر آرابینوزایلان‌ها، بتاگلوکان‌ها و پکتین، حل شده و محلول چسبناکی تولید می‌کنند که موجب افزایش ویسکوزیته مواد هضمی می‌شود. افزایش ویسکوزیته به دلیل جذب آب توسط این ترکیبات باعث افزایش ماندگاری و کاهش سرعت عبور

همکاران (۱۷) نیز بیان کردند که بیشترین وزن نسبی روده در گروه مصرف‌کننده جیره فاقد ویتامین A مشاهده شده است. این تأثیر می‌تواند به دلیل کاهش رشد سایر بافت‌ها در مقایسه با دستگاه گوارش به دلیل کمبود ویتامین A و همچنین رشد جبرانی بافت‌های دستگاه گوارش در جهت حداکثر کردن جذب باشد.

بر ویسکوزیته محتویات دستگاه گوارش بوده است. گزارش شده که کمبود رتینول در جیره باعث ایجاد تغییرات نامطلوب در سلول‌های بافت پوششی در حیوانات شده به طوری که در اثر این کمبود، پرزهای کراتینه جایگزین سلول‌های نرمال استوانه‌ای در بافت پوششی می‌شوند؛ که با اضافه کردن ویتامین A به جیره این تغییرات بهبود یافته است (۵). در تطابق با یافته‌های پژوهش حاضر، خرم آبادی و

جدول ۴- اثر سطوح ویتامین A در جیره بر طول، وزن نسبی (گرم/۱۰۰ وزن زنده) و ویسکوزیته محتویات روده باریک جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی
Table 4- Effect of different vitamin A levels in diet on intestinal length, relative weight (g/100 body weight), and viscosity in broiler chickens on day 42

	سطوح ویتامین A (واحد بین‌المللی) (IU)					SEM	P-value
	1500	4500	7500	10500	13500		
طول روده (cm) Intestinal length (cm)							
دئودنوم Duodenum	36.5	35.4	36.2	34.7	37.4	1.96	0.38
ژژنوم Jejunum	81.7	86.2	83.5	80.2	85.3	3.47	0.64
ایلئوم Ileum	57.6	55.7	55.2	56.5	59.7	3.15	0.87
وزن روده (%) Intestinal weight (%)							
دئودنوم Duodenum	1.00	0.86	0.81	0.91	0.99	0.124	0.22
ژژنوم Jejunum	1.83	1.56	1.69	1.85	1.81	0.221	0.82
ایلئوم Ileum	1.15 ^a	0.84 ^b	0.81 ^b	0.94 ^{ab}	0.90 ^{ab}	0.114	0.05
وزن کل دستگاه گوارش (%) Total GI weight (%)	9.56 ^a	6.91 ^b	6.93 ^b	7.32 ^b	6.73 ^b	0.531	0.03
ویسکوزیته محتویات (cp) Viscosity (cp)							
ژژنوم Jejunum	5.45 ^a	5.18 ^a	3.71 ^b	4.02 ^{ab}	3.65 ^b	0.445	0.04
ایلئوم Ileum	6.76	5.36	4.11	5.09	4.90	0.897	0.51

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشانه وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است ($p < 0.05$).

^{a,b} Within each row, mean values with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

کمبود ویتامین A در جیره سبب کاهش وزن نسبی سینه در مقایسه با سایر تیمارها شد که این کاهش به موازات افزایش وزن نسبی بال‌ها بود. ویتامین A دارای نقش‌های گسترده‌ای در بدن بوده و از طریق تأثیر بر هسته سلول در رشد و نمو طبیعی بافت‌ها و اندام‌های بدن موثر است (۵). بیشتر بودن چربی محوطه بطنی در گروه دارای کمترین سطح ویتامین A در جیره را می‌توان به اثرات این ویتامین در رشد و توسعه بافت‌ها نسبت داد، به این صورت که کمبود ویتامین A از طریق ایجاد نقص در رشد و نمو بافت‌ها احتمالاً منجر به کاهش استفاده از انرژی در رشد بافت‌ها شده و در نتیجه مازاد انرژی به صورت چربی در لاشه ذخیره شده است.

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف ویتامین A در جیره بر قابلیت هضم ظاهری CP و EE در جدول ۶ آورده شده است. افزودن سطوح

نتایج مربوط به تأثیر افزایش سطح ویتامین A در جیره بر پایه گندم بر بازدهی لاشه و وزن نسبی اندام‌ها در جدول ۵ آورده شده است. تفاوتی بین تیمارها در بازدهی لاشه و همچنین وزن نسبی سینه، بال‌ها، کبد، پیش‌معه و سنگدان مشاهده نشد ($p > 0.05$). در عین حال، افزودن ویتامین A به جیره در سطوح ۱۰۵۰۰ IU و ۱۳۵۰۰ IU در هر کیلوگرم سبب افزایش وزن نسبی ران‌ها در مقایسه با سطح ۱۵۰۰ IU در هر کیلوگرم شد ($p < 0.05$). همچنین، افزودن ویتامین A به جیره در سطح ۴۵۰۰ IU در هر کیلوگرم سبب کاهش وزن نسبی چربی محوطه بطنی در مقایسه با سطح ۱۵۰۰ IU در هر کیلوگرم شد ($p < 0.05$). خرم آبادی و همکاران (۱۷) گزارش کردند که کمبود ویتامین A در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به کاهش بازدهی لاشه در ۴۲ روزگی شد. آنها همچنین گزارش کردند که

مختلف ویتامین A به جیره بر پایه گندم تأثیری بر قابلیت هضم ظاهری CP و EE در جوجه های گوشتی نداشت ($p < 0.05$). خرم آبادی و همکاران (۱۷) گزارش کردند که کمبود ویتامین A در جیره های بر پایه گندم (جیره عاری از ویتامین A افزودنی) باعث افت شدید در قابلیت هضم پروتئین خام و چربی خام در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی شد.

جدول ۵- اثر سطوح ویتامین A در جیره بر بازدهی و خصوصیات لاشه (گرم/۱۰۰ وزن زنده) جوجه های گوشتی در ۴۲ روزگی

Table 5- Effect of different vitamin A levels in diet on carcass yield and characteristics (g/100 body weight) in broiler chickens on day 42

	سطوح ویتامین A (واحد بین المللی) (IU) Vitamin A levels					SEM	P-value
	1500	4500	7500	10500	13500		
بازدهی لاشه (%) Carcass yield							
کل لاشه Whole carcass	73.4	73.5	71.8	72.9	72.4	1.02	0.35
ران ها Legs (drumsticks + thighs)	17.2 ^b	19.6 ^{ab}	19.5 ^{ab}	21.5 ^a	20.5 ^a	0.81	0.05
سینه Breast	22.0	22.7	23.1	22.4	22.2	0.75	0.91
بال ها Wings	7.9	7.7	7.5	8.0	7.7	0.35	0.25
وزن اندام ها (%) Organs weight							
پیش معده Proventriculus	0.43	0.44	0.40	0.48	0.41	0.04	0.75
سنگدان Gizzard	1.65	1.68	1.50	1.69	1.64	0.13	0.88
کبد Liver	2.25	2.43	2.35	2.15	2.27	0.15	0.68
چربی محوطه بطنی Abdominal fat	1.76 ^a	1.23 ^b	1.31 ^{ab}	1.67 ^{ab}	1.35 ^{ab}	0.14	0.04

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ردیف، نشانه وجود تفاوت معنی دار بین گروه های آزمایشی است ($p < 0.05$).

^{a,b} Within each row, mean values with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

در عین حال، این محققین گزارش کردند زمانی که سطح ویتامین A جیره به بیش از سطوح رایج در جیره های معمولی (۹۰۰۰ IU) در کیلوگرم افزایش یافت، بهبود در قابلیت هضم پروتئین خام و چربی خام مشاهده شد. آردست (۳) سطوح مختلف ویتامین های A و D₃ را به یک جیره بر پایه گندم اضافه کرد و گزارش نمود که افزایش سطح ویتامین A در جیره تأثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی نداشته در حالی که افزایش سطح ویتامین D₃ در جیره باعث بهبود قابلیت هضم چربی خام شد.

جدول ۶- اثر سطوح ویتامین A در جیره بر قابلیت هضم ظاهری پروتئین خام و عصاره اتری در جوجه های گوشتی در سن ۲۱ روزگی

Table 6- Effect of different vitamin A levels in diet on apparent digestibility of crude protein and ether extract in broiler chickens measured on day 42

قابلیت هضم مواد مغذی (%) Nutrients digestibility (%)	سطوح ویتامین A (واحد بین المللی) (IU) Vitamin A levels					SEM	P-value
	1500	4500	7500	10500	13500		
عصاره اتری Ether Extract	86.1	85.92	88.2	87.0	86.3	1.30	0.31
پروتئین خام Crude protein	77.1	75.4	77.0	78.4	77.8	0.91	0.27

سطح ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم به جیره های بر پایه گندم در تغذیه جوجه های گوشتی، تأثیری بر عملکرد جوجه های گوشتی نداشته ولی

نتیجه گیری کلی

یافته های این پژوهش نشان می دهد که افزودن ویتامین A در

همورال (تولید آنتی‌بادی)، به سطوح بالاتر ویتامین A نیاز است. همچنین با توجه به نتایج این پژوهش، کاربرد ویتامین A در سطوح بالاتر از احتیاجات در جیره می‌تواند در کاهش چربی لاشه جوجه‌های گوشتی مؤثر واقع شود.

می‌تواند در دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، کاهش ویسکوزیته محتویات ژژنوم و کاهش وزن نسبی دستگاه گوارش نقش داشته باشد. همچنین افزودن ویتامین A در سطح ۷۵۰۰ IU در هر کیلوگرم جیره سبب بهبود شاخص تولید و کاهش هزینه تولید به ازاء واحد وزن زنده و وزن لاشه شد. در عین حال، به نظر می‌رسد جهت تقویت سیستم ایمنی

منابع

1. Aburto, A., and W. M. Britton. 1998. Effects and interactions of dietary levels of vitamins A and E and cholecalciferol in broiler chickens. *Poultry Science*, 77(5):666-673.
2. AOAC International. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC International, Washington, DC.
3. Azardast, O. 2017. Effect of additional supplementation of a wheat-based diet with vitamins A and D3 on performance and digestibility of nutrients in broilers. MSc thesis. Shahrekord University, Shahrekord, Iran. (In Persian)
4. Bahari, R., M. Shivazad, and F. Eftekhari. 2006. Effect of vitamin A and vitamin E on humoral immune response of commercial layer chicks and khorasan region native chick. *Journal of Agricultural Sciences*, 12(1):191-202. (In Persian)
5. Berdanier, C. D. 1997. Advanced Nutrition: Micronutrients. CRC Press, Boca Raton, USA.
6. Buchanan, N. P., L. B. Kimbler, A. S. Parsons, G. E. Seidel, W. B. Bryan, E. E. Felton, and J. S. Moritz. 2007. The effect of non-starch polysaccharides enzyme addition and dietary energy restriction on performance and carcass quality of organic broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(1):1-12.
7. Choct, M., and G. Annison. 1992. Anti-nutritive effect of wheat pentosans in broiler chickens: roles of viscosity and gut micro flora. *British Poultry Science*, 33(4):821-834.
8. Combs, G. F. 1976. Differential effects of high dietary levels of vitamin A on the vitamin E-selenium nutrition of young and adult chickens. *The Journal of Nutrition*, 106(7):967-975.
9. Davis, C. Y., and J. L. Sell. 1983. Effects of all-trans retinol and retinoic acid nutrition on the immune system of chicks. *The Journal of Nutrition*, 113(10):1914-1919.
10. Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11(1):1-42.
11. Erf, G. F. 2004. Cell-mediated immunity in poultry. *Poultry Science*, 83(4):580-590.
12. Fenton, T. W., and M. Fenton. 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Canadian Journal of Animal Science*, 59(3):631-634.
13. Gous, R. M., and P. A. Iji. 2001. Evaluating the route of administration of an exogenous microbial enzyme for broiler chicken. *Journal of Applied Poultry Research*, 10(2):150-153.
14. Haghighi, H. R., J. Gong, C. L. Gyles, M. A. Hayes, B. Sanei, P. Parvizi, H. Gisavi, J. R. Chambers, and S. Sharif. 2005. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(12):1387-1392.
15. Kalislar, S. 2019. The important of beta carotene on poultry nutrition. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 33(3):256-263.
16. Karadas, F., S. Erdugan, D. Kor, G. Oto, and M. Uluman. 2016. The effects of different types of antioxidants (Se, vitamin E and carotenoids) in broiler diets on the growth performance, skin pigmentation and liver and plasma antioxidant concentrations. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18(1):101-116.
17. Khoramabadi, V., M. R. Akbari, F. Khajali, H. Noorani, and E. Rahmatnejad. 2014. Influence of xylanase and vitamin A in wheat-based diet on performance, nutrients digestibility, small intestinal morphology and digesta viscosity in broiler chickens. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 36(4):379-384.
18. Lazaro, R., M. A. Latorre, P. Medel, M. Gracia, and G. G. Mateos. 2004. Feeding regimen and enzyme supplementation to rye-based diets for broilers. *Poultry Science*, 83(2):152-160.
19. March, B. E., E. Wong, L. Seier, J. Sim, and J. Biely. 1973. Hypervitaminosis E in the chick. *The Journal of Nutrition*, 103(3):371-377.
20. Mohammadi, B., and M. R. Akbari. 2017. Effects of zinc oxide nanoparticles on immune system function, antioxidant status, and performance of broiler chickens fed wheat-based diets. *Journal of Animal Science Researches*, 27(1):103-114. (In Persian).
21. National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
22. Ross, A. C. 1992. Vitamin A status: relationship to immunity and the antibody response. *Experimental Biology and Medicine*, 200(3):303-320.
23. SAS Institute. 2002. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.

24. Sepehri Moghaddam, H., and M. Emadi. 2014. The effect of threonine and vitamin A on immune system in broiler chickens. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(3):756-763.
25. Siahtiri, S., M. R. Akbari, F. Khajali, and H. Hassanpour. 2015. Effect of dietary dried or fresh ground garlic on growth performance and pulmonary hypertensive response in broiler chickens fed on high energy diets and reared at high altitude. *Journal of Research in Animal Nutrition*, 1(2):29-37. (In Persian)
26. Sijtsma, S. R., C. E. West, Jan H. W. M. Rombout, and A. J. Van Der Zijpp. 1989. Effect of Newcastle disease virus infection on vitamin A metabolism in chickens. *The Journal of Nutrition*, 119(6):940-947.
27. Sklan, D., and S. Donoghue. 1982. Vitamin E response to high dietary vitamin A in the chick. *The Journal of Nutrition*, 112(4):759-765.
28. Van Der Klis, J. D., M. W. A. Verstegen, and A. Van Voorst. 1993. Effect of a soluble polysaccharide (carboxy methyl cellulose) on the absorption of minerals from the gastrointestinal tract of broilers. *British Poultry Science*, 34(5):985- 997.
29. Whitehead, C. C. 2002. Vitamins in feedstuffs. Pages 181-190 in *Poultry Feedstuffs: Supply, Composition and Nutritive Value*. J. M. McNab and K. N. Boorman, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.



Evaluation of performance, nutrients digestibility, and immune system responses in broiler chickens fed on wheat-based diet supplemented with different levels of vitamin A

Soghra Hatami¹, Mohammad Reza Akbari^{2*}, Fariborz Khajali³

Submitted: 30-06-2020

Accepted: 24-10-2020

Hatami, S., M. R. Akbari, and F. Khajali. 2021. Evaluation of performance, nutrients digestibility, and immune system responses in broiler chickens fed on wheat-based diet supplemented with different levels of vitamin A. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):405-416.

Introduction Wheat is one of the important ingredients for preparing poultry diets. However, wheat contains some anti-nutritional factors such as non-starch polysaccharides (NSP) which enhance digesta viscosity and thus decrease nutrients digestion and absorption. These negative effects could damage performance and feed efficiency. Increase in digesta viscosity also imposes negative effects regarding intestinal epithelium. Vitamin A (vitA) is an important nutrient in maintaining the health of intestinal epithelium. Since wheat is deficient in vitA content and also wheat-based diets (WBD) can cause less vitA absorption from the intestinal lumen (by disturbing lipid digestion and absorption), it seems that supplementation of the WBD with vitA would be effective in mitigating some of the anti-nutritional effects of the WBD.

Materials and Methods In this study, the effect of a WBD supplemented with different levels of vitA on performance and immune system of broiler chickens were investigated. Five dietary treatments were prepared as follow: 1) WBD supplemented with 1500 IU vitA/kg (control); 2) WBD supplemented with 4500 IU vitA/kg; 3) WBD supplemented with 7500 IU vitA/kg; 4) WBD supplemented with 10500 IU vitA/kg; and 5) WBD supplemented with 13500 IU vitA/kg. Two hundred Ross 308 male day-old broiler chicks in a completely randomized design with four replicates of ten chicks per each were used. Feed intake (FI), body weight gain (BWG), and feed to gain ratio (FCR) were recorded periodically during the experiment. Sheep red blood cells (SRBC) antigen (2%) was injected to thigh muscle of two birds from each replicate on day 28. Seven and 14 days after injection, blood samples were collected and antibody titers against SRBC were measured. In order to evaluate cutaneous basophil hypersensitivity (CBH) response, on day 41, eight chicks per treatment were randomly selected and phytohemagglutinin (PHA-P) was injected (100 µg) subcutaneously into toes web of each bird. 12 and 24 hours after injection, the thickness of the web was measured and CBH response was calculated. At the end of the experimental period (day 42), two chickens from each replicate were selected randomly and euthanized. Abdominal cavity was opened and digestive organs as well as the spleen, bursa of Fabricius, liver, and abdominal fat pad were excised and weighted. The small intestinal parts including duodenum, jejunum, and ileum were excised, weighted, and measured in length. Afterward, the whole carcass and carcass parts were weighted. The weight of each organ was then expressed compared to the live body weight. For the viscosity measurement, jejunal and ileal contents were collected and centrifuged (500 ×g, 15 min). The supernatants were then used for the viscosity measurement. Serum malondialdehyde (MDA) was measured as an indicator of lipid peroxidation. For measurement of total tract apparent digestibility (TTAD) of nutrients, chromium oxide (Cr₂O₃) was used in diets as an external marker. On day 21, samples of excreta were collected every 6 hour (four samples during

1- M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3- Professor, Department of Animal Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

(*- Corresponding author email: akbari-m@agr.sku.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.87540

24 hours) and pooled. Feed and excreta samples were then analyzed for crude protein (CP) and ether extract (EE). Chromic oxide concentration in feed and excreta samples was measured and TTAD of CP and EE were then calculated. The collected data were analyzed using the general linear model (GLM) procedure of the SAS software.

Results and Discussion In starter period, supplementing the WBD with 10500 or 13500 IU vitA/kg, significantly reduced FI compared to groups consuming 1500 or 4500 IU vitA/kg of diet. This could be attributed to vitA reservoir in yolk sac at the life beginning which increases the probability of vitA toxicity with higher levels of vitA in early growth period. No significant difference was found for FI among treatment groups during grower period (22-42 days of age) as well as entire period (1-42 days of age) of the experiment. VitA at different levels used in this study, had no significant effect on BWG and FCR during starter, grower, and the entire period of the experiment. The highest production index was seen in the group receiving the diet supplemented with 7500 IU vitA/kg. Furthermore, the lowest relative feed cost per kg of live weight or carcass weight were seen in groups receiving diet supplemented with 7500 and 4500 IU vitA/kg, respectively. Feeding WBD containing 13500 IU vitA/kg caused a significant increase in anti-SRBC titer on 7 days after injection, compared to control group. According to this result, it seems that high level of dietary vitA (13500 IU/kg) would be effective in stimulating antibody-mediated immunity in broiler chickens. Improvement in humoral immune responses of broiler chickens by supplemental vitA has been reported in other studies. No significant difference was seen regarding CBH response on 12 and 24 hours after PHA injection, among treatment groups. There was no significant difference among treatment groups as for spleen and bursa of Fabricius weights. VitA at levels of 4500 and 7500 IU/kg of diet, caused a significant decrease in serum MDA concentration. Decrease in serum MDA concentration by increasing dietary vitA level indicates anti-oxidative effects of this vitamin. Supplementation of the WBD with vitA at levels used in this study had no significant effect on the length and weight of duodenum and jejunum. However, vitA at 4500 and 7500 IU/kg of diet, decreased ileum relative weight. Digesta viscosity in the jejunum was decreased by dietary vitA at levels higher than 7500 IU/kg. In addition, abdominal fat pad weight was decreased by supplemental vitA at 4500 IU/kg of diet, comparing to the control. Supplementing the WBD with different levels of vitA had no significant effect on the TTAD of CP and EE.

Conclusion The results of this study showed that supplementation of the WBD with vitA at 7500 IU/kg, would not affect performance but could stimulate humoral immune response (antibody production) and anti-oxidative defense of the broiler chickens. Also, vitA supplementation at the level of 7500 IU/kg of the diet improved production index and decreased feed cost per kg of live weight. Furthermore, it has been evidenced that higher levels of supplemental vitA (more than 1500 IU/kg as the requirements) could be effective in decreasing abdominal fat pad in broiler chickens.

Keywords: Anti-oxidative defense, Carcass fat, Digestibility, Viscosity, Vitamin A.



مقاله علمی - پژوهشی

مقایسه تأثیر لیزین هیدروکلراید و بایولیزسولفات بر عملکرد، پاسخ ایمنی، فراسنجه‌های خونی و استخوانی جوجه‌های گوشتی

حدیث حیدری^۱، علی خطیب جو^{۲*}، فرشید فتاح‌نیا^۲، محمد اکبری قرائی^۳، حسن شیرزادی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۵

حیدری، ح.، ع. خطیب جو، ف. فتاح‌نیا، م. اکبری قرائی، و ح. شیرزادی. ۱۴۰۰. مقایسه تأثیر لیزین هیدروکلراید و بایولیزسولفات بر عملکرد، پاسخ ایمنی، فراسنجه‌های خونی و استخوانی جوجه‌های گوشتی. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۲۸-۴۱۷.

چکیده

در آزمایش حاضر تأثیر بایولیز سولفات در مقایسه با لیزین هیدروکلراید بر عملکرد، پاسخ ایمنی، فراسنجه‌های خونی و استخوانی جوجه‌های گوشتی مورد مقایسه قرار گرفت. تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس-۳۰۸ (مخلوط مساوی نر و ماده) در قالب طرح کاملاً تصادفی به پنج تیمار دارای پنج تکرار و ۸ قطعه در هر تکرار اختصاص داده شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: (۱) ۱۰۰ درصد لیزین مکمل جیره از ال-لیزین هیدروکلراید تامین شد (جیره پایه یا شاهد)، (۲) ۷۵ درصد لیزین مکمل جیره توسط ال-لیزین هیدروکلراید و ۲۵ درصد توسط بایولیز سولفات تامین شد، (۳) ۵۰ درصد لیزین مکمل جیره توسط ال-لیزین هیدروکلراید و ۵۰ درصد توسط بایولیز سولفات تامین شد، (۴) ۲۵ درصد لیزین مکمل جیره توسط ال-لیزین هیدروکلراید و ۷۵ درصد توسط بایولیز سولفات تامین شد، (۵) ۱۰۰ درصد لیزین مکمل جیره توسط بایولیز سولفات تامین شد. طی دوره ۴۲-۱ روزگی، مصرف خوراک و وزن بدن جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به وزن بدن جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطوح ۲۵ و ۷۵ درصد بایولیز سولفات ضریب تبدیل خوراک بالاتری داشتند ($P < 0.05$). تیترا آنتی‌بادی علیه آنفلوآنزا، درصد کلسیم و فسفر، طول، وزن و شاخص استخوان در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به مقادیر جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). به طور کلی تامین کل لیزین جیره جوجه‌های گوشتی از بایولیز سولفات در مقایسه با ال-لیزین هیدروکلراید سبب افزایش خوراک مصرفی، بهبود پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های استخوانی جوجه‌های گوشتی شد ولی بر وزن بدن تأثیر نداشت. با وجود قیمت کمتر بایولیز سولفات، گنجاندن آن در جیره منجر به کاهش نسبت درآمد به هزینه شد و از لحاظ اقتصادی به صرفه نیست.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی، استخوان، جوجه گوشتی، رشد، منبع لیزین.

مقدمه

لنفوسیت‌ها و همچنین عملکرد بهینه سیستم ایمنی در پاسخ به عفونت نقش دارد. ال-لیزین هیدروکلراید منبع رایج لیزین در جیره‌های طیور بوده و شرکت ایوونیک منبع جدیدی با نام بایولیزسولفات-۷۰ معرفی نموده است (۹). بایولیزسولفات فرم جدید و گرانوله لیزین است که حاوی اسیدهای آمینه دیگر از جمله متیونین، سیستین، ترئونین، تریپتوفان، آرژنین، ایزولوسین، لوسین و والین، فسفر و انرژی است (۸) که ممکن است بتواند نیاز به مکمل چربی، پودر گوشت و استخوان و

الگوی اسید آمینه ایده‌آل با در نظر گرفتن اسید آمینه لیزین به عنوان شاخص در طیور گوشتی توسط بیکر و همکاران بررسی و پیشنهاد شد (۴). لیزین دومین اسید آمینه محدودکننده برای طیور می‌باشد. این اسید آمینه نقش مهمی در جذب کلسیم، ساختن ماهیچه و تولید هورمون، آنزیم و آنتی‌بادی دارد و در سنتز سیتوکین‌ها، تکثیر

کنجاله سویا را نسبت به زمانی که از ال-لیزین هیدروکلراید در جیره استفاده می‌شود را کاهش داده و بتواند قیمت خوراک را نیز کاهش دهد (۹). نشان داده شده است که بایولیزسولفات نسبت به ال-لیزین هیدروکلراید با توجه به ترکیب جیره، سن و گونه حیوان، حدود ۲ تا ۱۵ درصد از نظر اقتصادی به صرفه‌تر است (۸). بایولیزسولفات حاوی حداقل ۵۴/۶ درصد ال-لیزین به صورت ال-لیزین سولفات است (۹) که می‌تواند تعادل الکترولیتی را بهبود ببخشد و بایولیزسولفات برخلاف ال-لیزین هیدروکلراید می‌تواند از کاهش مصرف خوراک جلوگیری کند. ال-لیزین هیدروکلراید کلر جیره را افزایش می‌دهد و باعث کاهش مصرف خوراک می‌شود (۸). همچنین بایولیزسولفات نیاز به مکمل بیکربنات سدیم برای تعادل الکترولیتی را می‌تواند کاهش دهد (۹). استفاده از مکمل متیونین و لیزین در جیره‌های آزمایشی طیور، منجر به افزایش استفاده از پروتئین، به همراه کاهش میزان نیتروژن دفعی می‌شود که بایولیز سولفات، مقدار نیتروژن آزاد شده به محیط برای هر کیلوگرم افزایش وزن حیوان را به نصف می‌رساند و می‌تواند دفع نیتروژن را بیش از ۲۰ درصد کاهش دهد (۹). در مطالعات انجام شده گزارش شده است که ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیز سولفات اثرات یکسانی بر عملکرد داشته‌اند (۸، ۱۷ و ۱۸) در حالیکه برخی مطالعات دیگر، گزارش داده‌اند که بایولیز سولفات در مقایسه با ال-لیزین هیدروکلراید باعث کاهش ضریب تبدیل خوراک و بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی شده است (۳ و ۷). در تمامی آزمایشات انجام شده، تأثیر ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیز سولفات بر عملکرد و خصوصیات لاشه بررسی شده است اما تاکنون آزمایشی به منظور بررسی تأثیر بایولیزسولفات در مقایسه با ال-لیزین هیدروکلراید بر پاسخ‌ایمی و فراسنجه‌های استخوانی انجام نشده است و همچنین با توجه به نتایج متناقض آزمایشاتی که تا بحال در این زمینه انجام شده است، آزمایش حاضر تأثیر بایولیز سولفات در مقایسه با لیزین هیدروکلراید بر عملکرد، پاسخ‌ایمی، فراسنجه‌های خونی و استخوانی جوجه‌های گوشتی سویه راس-۳۰۸ مورد مقایسه و بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرغداری مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ایلام و در بهمن ماه سال ۱۳۹۶ انجام شد. تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس-۳۰۸ (مخلوط مساوی نر و ماده) در قالب طرح کاملاً تصادفی به پنج تیمار با پنج تکرار و ۸ قطعه جوجه در هر تکرار اختصاص داده شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: (۱) ۱۰۰ درصد لیزین مکمل جیره از ال-لیزین هیدروکلراید (جیره پایه یا شاهد)، (۲) ۷۵ درصد لیزین مکمل جیره از ال-لیزین هیدروکلراید و ۲۵ درصد از بایولیز سولفات، (۳) ۵۰ درصد لیزین مکمل جیره از ال-لیزین هیدروکلراید و ۵۰ درصد از

بایولیزسولفات، (۴) ۲۵ درصد لیزین مکمل جیره از ال-لیزین هیدروکلراید و ۷۵ درصد از بایولیزسولفات و (۵) ۱۰۰ درصد لیزین مکمل جیره از بایولیزسولفات تامین شد. مکمل‌های ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیزسولفات از شرکت ایوونیک دگوسا به قیمت به ترتیب ۹۴۰۰ و ۷۷۰۰ تومن تهیه شد. میزان لیزین قابل دسترس ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیزسولفات به ترتیب ۷۶ و ۶۰ درصد بود. برای تعیین نیاز تغذیه‌ای جوجه‌ها در دوره‌های مختلف پرورش و همچنین آنالیز اجزاء پروتئینی جیره از قبیل ذرت، کنجاله سویا و گلوتن ذرت توسط آزمایشگاه شرکت ایوونیک (دگوسا) با استفاده از دستگاه NIR انجام شد و جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت - سویا با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA انجام و تهیه شدند (جدول ۱). برای تعیین نیازمندی‌های مواد مغذی جوجه‌ها در دوره‌های مختلف پرورش و همچنین برآورد مواد مغذی اجزای جیره از راهنمای نیازمندی‌های غذائی سویه راس-۳۰۸ (۲۰۱۴) در دوره‌های آغازین (۱-۱۰ روزگی)، رشد (۱۱-۲۴ روزگی) و پائنی (۲۵-۴۲ روزگی) استفاده شد و جیره‌نویسی با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA انجام شد (جدول ۲). میانگین مصرف خوراک و افزایش وزن در دوره‌های مختلف پرورشی و کل دوره پرورش اندازه‌گیری شد و ضریب تبدیل خوراک نیز محاسبه شد. فاکتور بازده تولید اروپائی نیز از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

شاخص کارائی تولید اروپائی = $100 \times (\text{ضریب تبدیل خوراک} \times \text{سن فروش (روز)}) / (\text{ماندگاری} (\%) \times \text{وزن زنده (کیلوگرم)})$

ارزیابی اقتصادی افزودن ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیزسولفات به صورت قیمت تمام شده جیره‌ها به ازاء هر کیلوگرم افزایش وزن و شاخص نسبت درآمد به هزینه خوراک انجام شد. پس از خون‌گیری از سه قطعه جوجه از هر تکرار در سن ۴۲ روزگی، نمونه خون به داخل لوله‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد اتیلن دی‌آمین‌تترااستیک اسید (EDTA) به منظور جدا سازی سرم خون منتقل شد و گلوکز، آلومین، کلسترول، پروتئین کل، اوریک اسید و کراتینین خون با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالیزور BT1500 اندازه‌گیری شدند. شمارش هتروفیل، لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت نمونه‌های خونی از طریق مشاهده و شمارش آنها بعد از رنگ آمیزی گیمسا در زیر میکرو سکوپ نوری و با استفاده از دستگاه سل کانتر انجام شد. برای بررسی پاسخ ایمنی هومورال اولیه و ثانویه در روزهای ۲۸ و ۳۵ دوره پرورش به دو پرندۀ از هر تکرار میزان، ۰/۵ میلی‌لیتر گلوبول قرمز خون گوسفندی ۲/۵ درصد در عضله سینه هر پرندۀ تزریق شد. سپس ۷ روز بعد از تزریق دوم از پرندگان مذکور خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون به میکروتیوب‌های حاوی ۰/۱ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد اتیلن دی‌آمین‌تترااستیک اسید (EDTA) منتقل شدند. برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه گلوبول قرمز خون گوسفندی از روش رقیق سازی متوالی (سنجش

همانگونه که تیناسیون) استفاده شد (۶). همچنین، تیتراژ آنتی بادی علیه بیماری آنفلوآنزا و نیوکاسل با روش همگلوآگوتیناسیون (HI) تعیین شد. طول و عرض استخوان درشتنی پای چپ جوجه‌های گوشتی با استفاده از دستگاه کولیس دیجیتال و وزن استخوان توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. ماده خشک و خاکستر استخوان نیز

جدول ۱- پروفیل آمینواسید و استاندارد شده بر اساس قابلیت هضم ایلئومی (SID) اسیدهای آمینه اقلام خوراکی
Table 1- Amino acid profile and standardized ileal digestible (SID) amino acid of ingredients

آنالیز	ذرت		کنجاله سویا		کنجاله گلوتن ذرت	
	کل	SID	کل	SID	کل	SID
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/K)	3320.00		2297.00		3694.00	
Metabolizable Energy (Kcal/K)						
پروتئین خام %	7.96		45.00		59.55	
Crude protein (%)						
متیونین %	0.17	0.16	0.60	0.54	1.44	1.31
Methionine (%)						
سیستین %	0.18	0.16	0.66	0.52	1.03	0.84
Cystine (%)						
متیونین + سیستین %	0.35	0.33	1.27	1.07	2.48	2.16
Methionine + Cystine (%)						
لیزین %	0.24	0.22	2.77	2.47	0.87	0.70
Lysine (%)						
ترئونین %	0.28	0.25	1.75	1.54	1.94	1.61
Threonine (%)						
تریپتوفان %	0.06	0.05	0.60	0.54	0.29	0.19
Tryptophan (%)						
آرژنین %	0.39	0.34	3.29	3.03	1.82	1.62
Arginine (%)						
ایزولوسین %	0.27	0.26	2.07	1.80	2.39	2.13
Isoleucine (%)						
لوسین %	0.93	0.86	3.45	3.03	9.53	8.87
Leucine (%)						
والین %	0.38	0.36	2.15	1.87	2.71	2.36
Valine (%)						
هیستیدین %	0.23	0.23	1.19	1.07	1.18	1.04
Histidine (%)						
فنیل آلانین %	0.38	0.35	2.30	2.04	3.58	3.25
Phenylalanine (%)						

نتایج و بحث

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ نشان داده شده است. طی دوره ۴۲-۱ روزگی، جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد مصرف خوراک بیشتری داشتند اما وزن بدن جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد و تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۷۵ درصد بایولیز سولفات بیشتر بود ($P < 0.05$; جدول ۳). بین ضریب تبدیل خوراک و شاخص تولید اروپائی جوجه‌های گروه شاهد و

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) سال ۲۰۰۱ و با استفاده از رویه GLM مورد تجزیه آماری قرار گرفتند و میانگین تیمارها در سطح معنی‌داری ۵ درصد و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم مقایسه شدند (۱۱). داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از مدل زیر آنالیز شدند

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \varepsilon_{ij}$$

در این رابطه، Y_{ij} = م‌شاهدات، μ = میانگین م‌شاهدات، T_j = اثر تیمار و ε_{ij} = اثر خطای تصادفی مربوط به هر مشاهده است.

تمام شده خوراک به ازاء هر کیلوگرم وزن زنده در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی بایولیزسولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود که نهایتاً منجر به کاهش معنی‌دار نسبت درآمد به هزینه در جوجه‌های تغذیه شده با بایولیزسولفات شد ($P < 0.05$). این امر می‌تواند به دلیل میزان کمتر لیزین در ترکیب بایولیزسولفات نسبت به ال-لیزین هیدروکلرید (۶۰ به ۷۶ درصد لیزین) و مصرف بیشتر آن در جیره برای تامین لیزین مورد نیاز جوجه‌های گوشتی باشد.

جوجه‌هایی تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۵۰ و ۱۰۰ درصد بایولیزسولفات تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد در حالیکه جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۲۵ و ۷۵ درصد بایولیزسولفات ضریب تبدیل خوراک بالاتر و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۷۵ درصد بایولیزسولفات شاخص تولید اروپائی کمتری داشتند ($P < 0.05$; جدول ۳). مصرف خوراک جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح مختلف بایولیزسولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود و با وجود قیمت کمتر بایولیزسولفات، هزینه

جدول ۲- مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه (گرم در کیلوگرم)

Table 2- Feed ingredient and nutrient composition of basal diet (g/kg)

ماده خوراکی (گرم بر کیلوگرم) Ingredient (g/kg)	دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1-10d)	دوره رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11-24d)	دوره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) Finisher (25-42d)
ذرت (۷۶٪ پروتئین) Corn (7.6 % CP)	537.00	624.00	697.10
کنجاله سویا (۴۴٪ پروتئین) Soybean meal (44 % CP)	350.00	334.00	264.00
گلوتن ذرت (۶۰ درصد پروتئین) Corn gluten meal (60% CP)	66.00	0.00	0.00
روغن گیاهی Vegetable oil	5.00	5.00	5.00
دی کلسیم فسفات Di-Calcium phosphate	14.00	12.20	10.00
صدف Shell	12.00	10.80	10.00
بیکربنات سدیم Sodium Bicarbonate	2.00	1.30	1.50
نمک طعام Salt	2.50	2.90	2.80
مکمل مواد معدنی ^۱ Mineral premix ¹	2.50	2.50	2.50
مکمل ویتامینه ^۱ Vitamin premix ¹	2.50	2.50	2.50
دی ال-متیونین DL- methionine	2.60	2.40	2.10
ال-لیزین هیدروکلراید L-Lysine HCL	2.60	1.30	1.5
بایولیزسولفات Biolys Sulfate	0.00	0.00	0.00
ال-ترئونین L-Threonine	0.80	0.60	0.50
ترکیب شیمیایی محاسبه شده Feed Calculated Analysis			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم) Metabolizable Energy (kcal/kg)	2960.00	3080.00	3100.00
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	23.90	20.65	18.25
ترئونین قابل هضم ایلئومی (درصد) Threonine SID ² (%)	0.79	0.68	0.61

ادامه جدول ۲

Continuation of Table 2

متیونین قابل هضم ایلئومی (درصد) Methionine SID (%)	0.58	0.49	0.44
متیونین + سیستین قابل هضم ایلئومی (درصد) Methionine + Cystine SID (%)	0.91	0.78	0.69
لیزین قابل هضم ایلئومی (درصد) Lysine SID (%)	1.26	1.09	0.97
سیستین قابل هضم ایلئومی (درصد) Cystine SID (%)	0.33	0.29	0.26
تریپتوفان قابل هضم ایلئومی (درصد) Tryptophan SID (%)	0.23	0.19	0.17
آرژنین قابل هضم ایلئومی (درصد) Arginine SID (%)	1.38	1.17	1.06
کلسیم (درصد) Calcium (%)	1.05	0.90	0.90
فسفر قابل دسترس (درصد) Available phosphorus (%)	0.50	0.45	0.45
سدیم (درصد) Sodium (%)	0.18	0.18	0.18
کلر (درصد) Chlorine (%)	0.23	0.23	0.23
تبادل آنیون-کاتیون (میلی اکی والان بر کیلوگرم) DCAB (mEq/Kg)	240.00	207.00	197.00
اسید لینولئیک (درصد) Linoleic acid (%)	1.25	1.25	1.50
فیبر خام (درصد) Fiber (%)	5.00	5.00	4.80

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامینه به ازای هر کیلوگرم جیره مواد مغذی جاری را تأمین کرد: ۱۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۵۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین- D₃، ۱۲۱ واحد بین المللی ویتامین E، ۲ میلی گرم ویتامین K₃، ۴ میلی گرم ویتامین B₁، ۴۰ میلی گرم ویتامین B₂، ۰/۷۵ میلی گرم اسید فولیک، ۰/۷۵ میلی گرم D-بیوتین، ۴ میلی گرم پیروکسین، ۸۴۰ میلی گرم کولین کلراید، ۰/۱۲۵ میلی گرم اتوکسی کوئین و هر کیلوگرم مکمل معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره مواد مغذی جاری را تأمین کرد: ۱۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۸۰ میلی گرم آهن، ۶۰ میلی گرم روی، ۸ میلی گرم مس، ۰/۵ میلی گرم ید، ۰/۵ میلی گرم ید و ۰/۳ میلی گرم سلنیوم.

^۲ قابلیت هضم استاندارد شده ایلئومی

¹Each kg of vitamin and trace mineral premix provided: vitamin A, 12000 I.U. trans retinol; vitamin D₃, 5000 I.U.; vitamin E 121 I.U.; vitamin K₃ 2 mg; vitamin B₁ 4 mg; vitamin B₂ 40 mg; folic acid 0.75 mg; vitamin B₆ 4 mg; vitamin B₁₂ 0.02 mg; D-biotin 0.75 mg; choline chloride 840 mg; ethoxyquin 0.125 mg and each kg of mineral premix provided: Fe 80 mg; Cu 8 mg; Mn 80 mg; Zn 60 mg; I 0.5 mg; Se 0.3 mg.

²SID= Standardized ileal digestibility

که اثر بایولیزسولفات و ال-لیزین هیدروکلراید بر عملکرد مرغ های تخمگذار برابر بود (۹). تأثیر تیمارهای آزمایشی بر مصرف خوراک جوجه های گوشتی را می توان به مقدار کلر بیشتر ال-لیزین هیدروکلراید نسبت به بایولیزسولفات نسبت داد و در این زمینه گزارش شده است که مصرف خوراک با افزایش تعادل الکترولیتی جیره و کاهش سطح کلر جیره افزایش می یابد (۸ و ۱۶).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر متابولیت های خونی جوجه های گوشتی در جدول ۴ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی بر غلظت کلسترول، گلوکز، کراتینین و اسید اوریک تأثیر معنی داری نداشتند

موافق با نتایج آزمایش حاضر، گزارش شده است که بایولیزسولفات باعث افزایش مصرف خوراک جوجه های گوشتی می شود (۱) در حالیکه بر خلاف نتایج آزمایش حاضر، گزارش شده است که بایولیزسولفات و ال-لیزین هیدروکلراید بر مصرف خوراک خوک های در حال رشد (۱۱)، افزایش وزن (۱، ۱۷ و ۱۸) و ضریب تبدیل جوجه های گوشتی تأثیری مشابه لیزین هیدروکلراید داشتند (۱۸). همچنین، گزارش شده است که بایولیزسولفات باعث بهبود ضریب تبدیل جوجه های گوشتی شد (۳ و ۷) و مطالعه ای به منظور بررسی اثر بایولیزسولفات در مقایسه با ال-لیزین هیدروکلراید در مرغ های تخمگذار انجام شد و نتایج نشان داد

($P > 0.05$; جدول ۴) اگر چه غلظت کراتینین در جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۲۵ و ۵۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۷۵ درصد بایولیز سولفات بالاتر بود ($P < 0.05$; جدول ۴). پروتئین کل در جوجه‌های گروه شاهد و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۲۵ درصد بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۷۵ درصد بایولیز سولفات بالاتر بود و آلبومین سرم در جوجه‌های گروه شاهد و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۷۵ درصد بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۲۵ و ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات بالاتر بود ($P < 0.05$; جدول ۴).

جدول ۳- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی

Table 3- The effect of experimental diets on broiler chickens' performance

عملکرد Performance	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets					SEM ²	P-Value
	C	Biolys25	Biolys50	Biolys75	Biolys100		
خوراک مصرفی (گرم) Feed intake (g)							
دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1-10 d)	206.25 ^b	294.07 ^a	282.50 ^a	300.00 ^a	292.25 ^a	11.73	< 0.01
دوره رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11-24 d)	997.41	1095.53	962.00	1067.25	1001.25	37.61	0.11
دوره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) Finisher (25-42 d)	2731.88 ^c	3254.43 ^a	3076.75 ^b	3096.46 ^{ab}	3162.75 ^{ab}	51.47	< 0.01
کل دوره (۱-۴۲ روزگی) Total period (1-42 d)	3935.54 ^c	4644.04 ^a	4321.25 ^b	4463.71 ^{ab}	4456.25 ^{ab}	66.37	< 0.01
افزایش وزن بدن (گرم) Body weight (g)							
دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1-10 d)	164.69 ^b	215.64 ^a	217.50 ^a	221.00 ^a	216.75 ^a	7.45	< 0.01
دوره رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11-24 d)	590.80	608.96	606.00	616.50	607.00	25.63	0.96
دوره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) Finisher (25-42 d)	1377.90 ^{ab}	1338.36 ^{bc}	1369.50 ^{ab}	1247.57 ^c	1457.50 ^a	31.02	< 0.01
کل دوره (۱-۴۲ روزگی) Total period (1-42 d)	2133.39 ^b	2162.96 ^{ab}	2193.00 ^{ab}	2085.07 ^b	2281.25 ^a	42.81	0.04
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio							
دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1-10 d)	1.25 ^b	1.36 ^a	1.29 ^{ab}	1.36 ^a	1.34 ^a	0.02	0.01
دوره رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11-24 d)	1.69	1.81	1.60	1.74	1.64	0.06	0.22
دوره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) Finisher (25-42 d)	1.98 ^d	2.43 ^{ab}	2.24 ^{bc}	2.50 ^a	2.17 ^{cd}	0.06	< 0.01
کل دوره (۱-۴۲ روزگی) Total period (1-42 d)	1.84 ^b	2.15 ^a	1.97 ^b	2.15 ^a	1.95 ^b	0.04	< 0.01
فاکتور بازده تولید اروپایی EPEF ³	275.80 ^a	240.04 ^{bc}	265.06 ^{ab}	233.28 ^c	278.40 ^a	9.91	0.01
هزینه خوراک مصرفی (تومن) Feed cost (Toman)	3240 ^c	3776 ^a	3465 ^b	3775 ^a	3439 ^b	35.4	0.01
نسبت درآمد به هزینه ICFC ⁴	1.23 ^a	1.06 ^c	1.16 ^b	1.05 ^c	1.15 ^b	0.02	0.01

^{a,b} میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

^۱C: control,

^۲SEM: Standard error of the means.

^۳EPEF: European production efficiency factor.

^۴IOFC= Income over feed cost.

جدول ۴- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی

Table 4- The effect of experimental diets on broiler chickens blood metabolites

فراسنجه‌های خونی Blood metabolites	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets					SEM ^۲	P-Value
	C	Biolys25	Biolys50	Biolys75	Biolys00		
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) Glucose (mg/dl)	229.75	272.00	251.33	251.33	243.00	16.16	0.48
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) Cholesterol (mg/dl)	87.50	112.33	101.33	100.00	105.33	6.78	0.18
اوریک اسید (میلی گرم بر دسی لیتر) Uric Acid (mg/dl)	1.52	1.80	2.13	1.70	1.83	0.17	0.24
پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر) Total protein (g/dl)	8.67 ^{ab}	9.36 ^a	6.52 ^{bc}	4.82 ^c	6.45 ^{bc}	0.87	< 0.01
کراتینین (میلی گرم بر دسی لیتر) Creatinine (mg/dl)	0.13 ^{bc}	0.16 ^{ab}	0.20 ^{ab}	0.10 ^c	0.13 ^{bc}	0.01	0.01
آلبومین (میلی گرم بر دسی لیتر) Albumin (mg/dl)	6.23 ^a	4.98 ^b	5.56 ^{ab}	6.12 ^a	5.16 ^b	0.24	< 0.01

^{a,b} میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

¹C: control,

²SEM means Standard error of the mean.

در صد بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد و جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۵۰ در صد بایولیز سولفات بالاتر بود ($P < 0.05$; جدول ۵).

همسو با نتایج حاضر گزارش شده است که جایگزینی کامل بایولیز سولفات حاوی ۵۴٪ لیزین با ال-لیزین هیدروکلراید حاوی ۷۶ در صد لیزین بر تیتراکتیو بادی علیه نیوکاسل اثر معنی‌دار نداشت (۱)، در شرایط تنش و بیماری، میزان پاسخ ایمنی مهم است. عدم تأثیر تیمارهای آزمایشی بر پاسخ ایمنی را احتمالاً بتوان به نبود تنش و نرمال بودن شرایط آزمایش حاضر نسبت داد. بایولیز سولفات حاوی اسیدهای آمینه دیگر از جمله متیونین، سیستین، ترئونین، تریپتوفان، آرژنین، ایزولوسین، لوسین و والین هم چنین فسفر و انرژی است (۸). احتمالاً بایولیز سولفات اسیدهای آمینه بیشتری را برای ساخته شدن زنجیره پروتئینی آنتی‌بادی آنفلوآنزا در اختیار جوجه‌ها قرار داده باشد و باعث افزایش تیتراکتیو بادی علیه آنفلوآنزا شده باشد.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات استخوان درشت‌نی جوجه‌های گوشتی در جدول ۶ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی بر عرض، ماده خشک و خاکستر استخوان اثر معنی‌دار نداشتند ($P > 0.05$; جدول ۶). طول استخوان درشت‌نی جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به مقادیر جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود و وزن استخوان و در صد کلسیم و فسفر جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های

همسو با نتایج حاضر گزارش شده است که غلظت کلسترول، گلوکز و کراتینین در جوجه‌های تغذیه شده با ال-لیزین هیدروکلراید و بایولیز سولفات مشابه بود در حالیکه ناهم‌سو با نتایج آزمایش حاضر، غلظت اسید اوریک پلاسمای جوجه‌های تغذیه شده با مکمل بایولیز سولفات بالاتر از گروه تغذیه شده با لیزین هیدروکلراید بود و تیمارهای آزمایشی اثرات جزیی بر غلظت آلبومین و پروتئین کل داشتند (۳). علت احتمالی تأثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت آلبومین، پروتئین کل و کراتینین سرم خون جوجه‌های گوشتی را می‌توان به این نسبت داد که بایولیز سولفات حاوی اسیدهای آمینه دیگر از جمله متیونین، سیستین، ترئونین، تریپتوفان، آرژنین، ایزولوسین، لوسین و والین هم چنین فسفر و انرژی است (۸) و ممکن است بایولیز سولفات بر تامین اسیدهای آمینه دیگر و توازن اسیدهای آمینه و در نتیجه غلظت آلبومین، پروتئین کل و کراتینین سرم خون جوجه‌های گوشتی اثر داشته باشد.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت سلول‌های خونی، تیتراکتیو بادی علیه نیوکاسل، آنفلوآنزا و گلبول قرمز خون گوسفندی جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی بر درصد لنفوسیت، هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت، تیتراکتیو بادی علیه گلبول قرمز خون گوسفندی و ویروس نیوکاسل اثر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$; جدول ۵) اما تیتراکتیو بادی علیه ویروس آنفلوآنزا در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی سطح ۱۰۰

حاوی سطوح مختلف بایولیز سولفات نسبت به جوجه‌های گروه شاهد بیشتر بود. همچنین، شاخص استخوان در جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی سطوح ۲۵ و ۱۰۰ درصد بایولیز سولفات نسبت به

جدول ۵- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی

Table 5- The effect of experimental diets on broiler chicken's immune parameters

فراسنجه‌های ایمنی Immunity parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets					SEM ^۲	P-Value
	C	Biolys25	Biolys50	Biolys75	Biolys100		
شمار سلول‌های خونی Blood cell count							
لنفوسیت (%) Lymphocyte (%)	69.25	61.80	63.60	64.60	66.80	2.47	0.28
هتروفیل (%) Heterophil (%)	27.75	35.60	33.20	33.80	29.60	2.45	0.18
نسبت هتروفیل به لنفوسیت H:L Antibody titer	0.40	0.59	0.53	0.54	0.44	0.06	0.23
نیوکاسل Newcastle	2.25	4.00	2.60	3.60	4.40	0.69	0.18
آنفلوآنزا Influenza	2.75 ^b	3.20 ^{ab}	2.60 ^b	4.40 ^{ab}	4.80 ^a	0.57	0.04
گلبول قرمز خون گوسفندی ^۳ Sheep red blood cell							
ایمونوگلوبولین G IgG	3.20	3.40	3.00	3.20	3.80	0.56	0.88
ایمونوگلوبولین M IgM	2.40	3.60	3.40	2.80	3.40	0.44	0.30
ایمونوگلوبولین کل Total Ig	5.60	7.00	6.40	6.00	7.20	0.75	0.54

^{a,b} میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

¹C: Control,

²SEM means Standard error of the mean.

³ The data represent mean $\pm$ standard errors of log₂ of the reciprocal of the last dilution exhibiting agglutination.

نداشت اما در آزمایش حاضر با تغییر آنیون جیره از طریق مکمل لیزین خصوصیات استخوان درشتنی جوجه‌های گوشتی بهبود یافت. محققین با مطالعه اثرات آنیونیک نمک‌های کلرید، سولفات و فسفات به ترتیب ۲۴۰-۴۰، ۲۴۰-۱۰۰ و ۲۴۰-۱۲۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم جیره مرغ‌های تخمگذار گزارش کرده‌اند که یون کلرید نسبت به سولفات و فسفات در کاهش pH و یون بیکربنات خون بیشتر موثر است و سولفات نیز اسیدوژنیک است اما نسبت به کلر اثرات کمتری دارد (۱۹). بالا بودن کلر جیره، باعث اسیدوز متابولیکی و افزایش ناحیه هایپر تروفیک غضروف استخوان و در نتیجه افزایش مشکلات پا از جمله بروز دیسکندروپلازی درشتنی می‌شود (۱۶) و اسیدوز متابولیکی ناشی از جیره‌های با تعادل الکترولیتی پایین می‌تواند تغییراتی در متابولیسم ویتامین D ایجاد کند و در نتیجه ساخت مواد

مخالف نتایج آزمایش حاضر، گزارش شده است که افزایش تعادل الکتریکی جیره از ۵۰- تا ۳۲۵ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم جیره بر ماده خشک و خاکستر استخوان ران جوجه‌های گوشتی اثر نداشت (۲۰). در آزمایش دیگر گزارش شده است که تراکم استخوان (خاکستر) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی (که شامل مقادیر مختلف تعادل الکتریکی جیره بودند) قرار نگرفت (۲). همچنین گزارش شده است که سطوح مختلف تعادل الکترولیتی جیره از ۲۰۰، ۲۴۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم جیره، بر وزن، طول، عرض و شاخص استخوان درشتنی جوجه‌های گوشتی تأثیر نداشت (۱۵) و عدم تعادل سدیم-کلر بر مقدار خاکستر، کلاسیم و فسفر استخوان درشتنی در بوقلمون تأثیر نداشت (۱۲). با اینکه تغییر تعادل الکترولیتی جیره در آزمایشات مختلف تأثیری بر خصوصیات استخوان جوجه‌های گوشتی

معدنی استخوان را تحت تأثیر قرار دهد (۱۳) و عدم تعادل سدیم-کالر افزایش احتمال آسیب و شکستگی استخوان را در پی دارد (۱۲).

جدول ۶- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های استخوان درشتنی جوجه‌های گوشتی

Table 6- The effect of experimental diets on broiler chicken's tibia bone parameters

فراسنجه‌های استخوانی Bone parameters	جیره‌های آزمایشی ^۱ Experimental diets					SEM ^۲	P-Value
	C	Biolys25	Biolys50	Biolys75	Biolys100		
طول (میلی متر) High (mm)	97.88 ^b	102.70 ^{ab}	103.77 ^a	106.36 ^a	107.42 ^a	1.80	0.01
وزن (گرم) Weight (g)	17.59 ^c	20.63 ^{ab}	19.66 ^b	20.92 ^{ab}	21.98 ^a	0.53	< 0.01
عرض (میلی متر) width (mm)	10.44	11.33	11.78	11.02	11.44	0.38	0.17
شاخص استخوان Bone Index	1.79 ^c	2.01 ^{ab}	1.89 ^{bc}	1.96 ^{bc}	2.04 ^a	0.04	< 0.01
ماده خشک (%) Dry matter (%)	46.62	48.63	45.77	47.18	47.32	1.67	0.81
خاکستر (%) Ash (%)	36.43	38.60	37.60	35.40	36.20	1.35	0.50
کلسیم (%) Calcium (%)	36.40 ^b	38.78 ^a	39.92 ^a	39.19 ^a	40.40 ^a	1.14	< 0.01
فسفر (%) Phosphorus (%)	18.19 ^b	19.39 ^a	19.95 ^a	19.59 ^a	20.19 ^a	0.57	< 0.01

^{a,b} میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

¹C: control,

²SEM means Standard error of the mean.

طرفی باعث بهبود ساخت مواد معدنی استخوان و رشد استخوان و به دنبال آن افزایش وزن و طول و در نتیجه شاخص استخوان و همچنین افزایش کلسیم و فسفر استخوان شده است و می‌تواند باعث کاهش مشکلات پا از جمله دیسکندروپلاژی و شکستگی استخوان درشتنی شود.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی وزن بدن جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی بایولیز سولفات ۱۰۰ در صد و ال-لیزین هیدروکلراید ۱۰۰ در صد تفاوتی با هم نداشتند اما خوراک مصرفی، پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های استخوان جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی بایولیز سولفات ۱۰۰ درصد افزایش یافت با وجود قیمت کمتر بایولیز سولفات، گنجاندن آن در جیره منجر به کاهش نسبت درآمد به هزینه شد و از لحاظ اقتصادی به صرفه نیست.

بنابراین تعادل الکترولیتی جیره نقش مهمی در عملکرد جوجه‌های گوشتی می‌تواند داشته باشد و برای رشد مناسب استخوان لازم است (۱۵). از آنجا که استخوان به عنوان یک سیستم بافر برای تعادل الکترولیتی مایعات بدن عمل می‌کند، بنابراین جیره‌های اسیدی می‌توانند باعث آزاد شدن کاتیون‌ها (از جمله کلسیم) از استخوان به خون جهت تنظیم pH شوند. اکثر کلسیم در بدن به ماتریکس مواد معدنی استخوان متصل است که نشان می‌دهد استخوان یک منبع مناسب برای دفع بیشتر کلسیم توسط کلیه‌هاست (۵). از دست دادن کلسیم باعث کاهش ساخت مواد معدنی استخوان می‌شود و می‌تواند تراکم استخوان را تحت تأثیر قرار دهد (۲). از آنجا که بایولیز سولفات فرم جدید و گرانوله لیزین است که حاوی حداقل ۵۴/۶٪ ال-لیزین به صورت ال-لیزین سولفات است (۸). بنابراین جایگزینی بایولیز سولفات با ال-لیزین هیدروکلراید احتمالاً از طریق کاهش کالر جیره و بهبود تعادل الکترولیتی جیره و جلوگیری از اسیدوز متابولیکی باعث ذخیره مناسب کلسیم در ماتریکس استخوان شده است. بایولیز سولفات از

منابع

1. Ahmad, G., T. Mushtaq, M. Aslam Mirza, and Z. Ahmed. 2007. Comparative Bioefficacy of Lysine from L-Lysine Hydrochloride or L-Lysine Sulfate in Basal Diets Containing Graded Levels of Canola Meal for Female Broiler

- Chickens. *Poultry Science*, 86(3): 525-530.
2. Arantes, U. M., J. H. Stringhini., M. C. Oliveira, P. C. Martins, P. M. Rezende, M. A. Andrade, N. S. M. Leandro, and M. B. Cafe. 2013. Effect of different electrolyte balances in broiler diets. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 15(3): 233-237.
3. Bahadur, V., S. Haldar, and T. Kumar Ghosh. 2010. Assessment of the Efficacy of L-Lysine Sulfate vis-`a-vis L-Lysine Hydrochloride as Sources of Supplemental Lysine in Broiler Chickens. *Veterinary medicine international*, 964076, 9 pages.
4. Baker, D. H., A. B. Batal, T. M. Parr, N. R. Augspurger, and C. M. Parsons. 2002. Ideal ratio (relative to lysine) of tryptophan, threonine, isoleucine, and valine for chicks during the second and third weeks post hatch. *Poultry Science*, 81(4): 485-494.
5. Bushinsky D. A. 2001. Acid-base imbalance and the skeleton. *European Journal of Nutrition*; 40(5): 238-244.
6. Cheema, M. A., M. A. Qureshi, and G. B. Havenstein. 2003. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry science*, 82(10): 1519-1529.
7. Emmert, J. L., and H. R. Pope. 2000. Comparing Biolys® 60 vs. L-lysine· HCl in broiler chickens up to 49 days of age. University of Arkansas, USA. Trial Report, 4, p.98003.
8. Fickler, J. 2001. Biolys @ 60-the innovative lysine source for animal nutrition. *Amino News, Special Issue from, Evonik Industries*, 2: 1-8.
9. Fontanillas, R., D. Höhler, S. Mack, R. Neme, and Rostagno, H.S. 2001. Performance and carcass quality of broiler chickens fed diets supplemented either with Biolys-60 or L-Lysine-HCL. *Cahiers Options Méditerranéennes*, (54), 177-180.
10. Htoo, J. K., J. P. Oliveira, L. F. T. Albino, M. I. Hannas, N. A. A. Barbosa, and H. S. Rostagno. 2016. Bioavailability of l-lysine HCl and l-lysine sulfate as lysine sources for growing pigs. *Journal of Animal Science*, 94(suppl.3), 253-256.
11. Ins, S. SAS Institute. 2001. *SAS Procedures Guide*, Version. 8.
12. Jankowski, J., K. Lichtorowicz, Z. Zdunczyk, and J. Juskiewicz. 2012. The effect of different dietary sodium levels on blood mineral concentrations and tibia mineralization in turkeys. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 15(2): 227-232.
13. Mongin, P., and B. Sauveur. 1977. Interrelationships between mineral nutrition, acid-base balance, growth and cartilage abnormalities: In *Growth and poultry meat production*. *British Poultry Science*, 4: 235-247.
14. Mushtaq, T., M. Sarwar, G. Ahmad, M. A. Mirza, H. Nawaz, M. M. Haroon Mushtaq, and U. Noreen. 2007. Influence of Canola Meal-Based Diets Supplemented with Exogenous Enzyme and Digestible Lysine on Performance, Digestibility, Carcass, and Immunity Responses of Broiler Chickens. *Poultry Science*, 86(10): 2144-2151.
15. Oliveira, M. C., U. M. Arantes, and J. H. Stringhini. 2010. Efeito do balanço eletrolítico da ração sobre parâmetros ósseos e da cama de frango. *Biotemas*, 23: 203-209.
16. Oviedo-Rondon, E. O., A. E. Murakami, A. C. Furlan, I. Moreira, and M. Macari. 2001. Sodium and Chloride Requirements of Young Broiler Chickens Fed Corn-Soybean Diets (One to Twenty-One Days of Age). *Poultry Science*, 80(5): 592-598.
17. Rodeza Kristine, S., P. Cu1 Sonia, M. Acda1 Elpidio, J. Agbisit, F. Nelia, R. Carandang Josephine, L. Centeno, and E. Florinia. 2012. Efficacy of L-Lysine Sulfate as Supplement in Swine Diets. *Animal Science*, 38(1): 11-22.
18. Rostagno, H. S. 1999. Comparison of Biolys® 60 vs. L-lysine· HCl in broiler chickens. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brazil. Trial Report, 4, p.98001.
19. Ruiz-Lopez, B., and R. E. Austic. 1993. The effect of selected minerals on the acid-base balance of growing chicks. *Poultry Science*, 72(6): 1054-1062.
20. Szabo, J., A. V. Vucskits, E. Andrasofszky, E. Berta, A. Bersenyi, L. Borzsonyi, V. Palfi, and I. Hullar. 2011. Effect of dietary electrolyte balance on production, immune response and mineral concentrations of the femur in broilers. *ActaVeterinaria Hungarica*, 59(3): 295-310.



Comparing Effect of Lysine-HCl and Biolys-Sulfate on Broiler Chickens Performance, Immune Response, Blood Metabolites and Bone parameters

Hadis Heydari¹, Ali Khatibjoo^{2*}, Farshid Fattahnia², Mohammad Akbari-Gharaei³, Hassan Shirzadi³

Submitted: 30-05-2019

Accepted: 16-12-2019

Heydari, H., A. Khatibjoo, F. Fattahnia, M. Akbari-Gharaei, and H. Shirzadi. 2021. Comparing Effect of Lysine-HCl and Biolys-Sulfate on Broiler Chickens Performance, Immune Response, Blood Metabolites and Bone parameters. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):417-428.

Introduction Commercially available feed-grade crystalline amino acids have provided an opportunity for nutritionists to formulate low CP cost-effective diets while maintaining optimal protein utilization by birds. Lysine is the first limiting amino acid in practical diets for broilers when soybean meal is not the major protein source. Lysine supplementation under such circumstances almost becomes unavoidable in particular when dietary CP contents are to be reduced and when using the concept of ideal amino acid ratio in which lysine is used as a reference amino acid. L-Lysine HCl, which contains a minimum of 78% lysine is the dominant source of lysine for addition to poultry diets. L-Lysine sulfate products have minimum lysine contents of 46.8% in Biolys60 (Degussa AG, Frankfurt, Germany) or 51% in Lysine Plus (CJ Biotech Co. Ltd., Liaocheng, Shandong, China). A recent study reported that the bioefficacy of L-lysine sulfate relative to L-lysine HCl was similar when using daily gain and feed conversion of young pigs as the response criteria. In addition, several other swine and broiler experiments had been conducted to compare the bioefficacy of lysine in L-lysine sulfate and L-lysine HCl. Most of these studies used animal performance as the main response variable. However, very little research has been conducted to determine the effects of different lysine sources on plasma metabolites and bone characteristics of broiler chickens as the response variable. Therefore, the present study was conducted to examine the comparative effects of L-lysine sulfate and L-lysine HCl in broiler chickens using growth performance, blood metabolites and bone parameters as response variables.

Materials and Methods In this experiment compared the effects of L-Lysine-hydrochloride (Lys) and Biolys-Sulfate (BioLys) on broiler chickens' performance and Immune Response. In a completely randomized design, 200 Ross-308 broiler chickens were allocated to 5 dietary treatments with 5 replicates and 8 birds in each. Dietary treatments including: 1- Control or basal diets (100% of supplemented Lys from Lys-HCl), 2- Ration 25:75 (75% of supplemented Lys from Lys-HCl and 25% from BioLys-Sulfate), 3- Ration 50:50 (50% of supplemented Lys from Lys-HCl and 50% from BioLys-Sulfate), 4- Ration 75:25 (25% of supplemented Lys from Lys-HCl and 75% from BioLys-Sulfate) and 5- Ration 100 (100% of supplemented Lys from BioLys-Sulfate). Feed ingredients (i.e., corn, corn gluten meal, and soybean meal) were analyzed for amino acid by NIRS in Evonik company representative in IRAN. The composition of basal diet and nutrient composition of feed ingredients. During the study, feed intake (FI) and body weight (BW) were determined at the end of starter, grower and finisher periods, and mortality-corrected FCR was calculated by accordingly. European production efficiency factor (EPEF) was calculated as: $EPEF = [Viability (\%) \times BW (kg) / age (d) \times FCR (kg feed/kg gain)] \times 100$.

All the birds were vaccinated intramuscularly through breast muscle with killed Newcastle disease and influenza vaccine (Cevac: New Flu-Kem) at 7 d of age, and Newcastle disease La Sota vaccine was used in the drinking water

1- Graduated MSc, Department of Animal Science, University of Ilam, Ilam, Iran.

2- Associated Professor of animal Science, Department of Animal Science, University of Ilam, Ilam, Iran.

3- Assistant Professor of animal Science, Department of Animal Science, University of Ilam, Ilam, Iran.

(*-Corresponding author email: a.khatibjoo@ilam.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.2021.38225.0

for vaccination at 14 d of age. Antibody titer against Newcastle disease, avian influenza and sheep red blood cell were detected. At the end of the experiment (42 d of age), 2 blood samples from the wing vein of 2 birds (almost near to mean body weight of each pen) were collected and blood metabolites like serum glucose, triacylglycerol, total cholesterol, albumin, uric acid and creatinine were detected. The other blood sample was used to detecting heterophil and lymphocyte percentages and heterophil to lymphocyte ratio accordingly. Finally 1 broiler from each replicate were selected and slathered, then tibia bone parameters like height, width, diameter, Ca and P percentage were detected.

Results and Discussion The results showed that from 1-42 d, broiler chickens fed the 100-diet had higher feed intake and body weight gain as compared to control group ($P < 0.05$). Dietary treatments had no effects on serum cholesterol, glucose and uric acid concentrations, spleen and thymus relative weight, heterophil and lymphocyte percentages and heterophil to lymphocyte ratio (H:L), antibody titer against SRBC and New-Castle diseases, tibia bone diameter and width, dry matter and ash percentages ($P > 0.05$). As compared to control group, broiler chickens fed diet containing 100% BioLys had higher serum total protein concentration, antibody titer against avian influenza and bone Ca and P percentages, tibia bone length, width and index ($P < 0.05$).

Conclusion In conclusion, inclusion of BioLys-Sulfate rather than L-Lysine-HCl to broiler chickens diet, increased broiler chickens feed intake and improved immune response and bone parameters but had no effect on broiler chickens body weight. In spite of cheaper cost of BioLys-Sulfate, its inclusion in broiler chickens diet decreased income over feed cost ratio and its use is not economically advisable.

Key words: Antibody, Bone, Broiler Chicken, Growth, Lysine source.



مقاله علمی - پژوهشی

تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نو ترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مهسا ضابطیان^۱، محمدرضا نصیری^{۲*}، علی جوادمنش^۳، شاهرخ قوتی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

ضابطیان، م.، م. ر. نصیری، ع. جوادمنش، و ش. قوتی. ۱۴۰۰. تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نو ترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۲۹-۴۴۰.

چکیده

همان‌طور که تحقیقات گوناگون نشان داده‌اند، در سال‌های اخیر، میزان مرگ‌ومیر بر اثر سرطان رشد چشمگیری داشته است؛ به همین دلیل است که محققان در پی تولید داروهای جدید، به ویژه داروهایی با اثرات جانبی کمتر، هستند. بر همین اساس، آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند نیز یکی از بهترین اورتولوگ‌ها برای آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاو است که آن را در القای مرگ سلول‌های سرطانی به کار می‌گیرند. آنزیم گوسفندی تنها در ۴ اسید آمینه A19S، V46F، K37Q و N103E با آنزیم گاوی تفاوت دارد. در مطالعه پیش‌رو، ابتدا شکل سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند پیش‌بینی و سپس از نظر پایداری بررسی شد. در ادامه، مشخصات فیزیکی شیمیایی این آنزیم با برنامه پرات پارام نیز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی شبیه‌سازی و با توجه به RMSD، RMSF و Gyration analyses میزان پایداری پروتئین نیز پیش‌بینی گردید. مطالعات آزمایشگاهی نیز از قبیل بررسی فرار این آنزیم از RI، میزان مقاومت آن در مقابل پی‌سین، غلظت پروتئین تولیدی، قابلیت القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی و نیز میزان فعالیت این آنزیم، انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در مجاورت پی‌سین تا ۹۰٪ دست‌نخورده باقی می‌ماند. میزان غلظت پروتئین تولیدی نیز 4.78 mg/ml بود که با استفاده از روش برادفورد تخمین زده شد. در این مطالعه فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 558±22 U/mol برآورد شد. همان‌طور که در تحقیقات گذشته نشان داده شده است، انواع RNaseA گاو و گوسفند نمی‌توانند وارد سلول شوند و در نتیجه هیچ‌گونه سمیت سلولی نشان نمی‌دهند، ولی در این مطالعه با استفاده از لیپوفکتامین، این آنزیم‌ها وارد سلول شدند و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی Hella القا کردند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها نیز به روش MTT assay اندازه‌گیری شد. براساس این تحقیق، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی فعالیت آنزیمی و توکسیتی مشابهی با آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی دارد و برای استفاده به عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها جانشین مناسبی است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، بیوانفورماتیک، سمیت سلولی، فعالیت زیستی.

مقدمه

تخریب RNA می‌کنند) و اندونوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرها را که از درون اقدام به تخریب RNA می‌کنند) جای می‌گیرند. دسته اخیر تحت عنوان ریبونوکلئازها یا به اختصار RNase شناخته می‌شوند (۲۲). آنزیم‌های ریبونوکلئاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که با شکستن

آنزیم‌های RNase براساس نحوه تخریب RNA در دو دسته اگزونوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرها را که از انتها شروع به

فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.
(Email: nassiry@um.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.2020.38319.0

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- ستاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

در این جایگاه قرار گرفته‌اند. این اسید آمینه‌ها عمل کاتالیز آنزیم را انجام می‌دهند. اسید آمینه ۳۴ نیز گلیکولیزه است (۳۲). علی‌رغم تمام موانع پیش‌رو، یک ویژگی خاص در RNase A سبب شده است که تحقیقات دربارهٔ این آنزیم به‌عنوان یک ایمونوریپونوکلئاز امیدبخش همچنان ادامه داشته باشد. این ویژگی نبود گیرندهٔ سطح سلولی برای این آنزیم در بدن است که آن را از ایمونوتوکسین‌های مشابه متمایز می‌کند (۲۳).

تاکنون، شرکت‌های تجاری بسیاری موفق به تولید آنزیم ریپونوکلئاز پانکراس گاوی شده‌اند. اما، در میان گونه‌های نشخوارکننده، گوسفندان را نیز می‌توان به‌عنوان یک گونهٔ مناسب برای تولید این آنزیم مدنظر قرار داد. باتوجه به ظرفیت نژادی گوسفند در ایران، به‌نظر می‌رسد که ما از طریق مطالعات مولکولی و فیلوژنیک ژن مربوط به آنزیم پانکراس گوسفندی بتوانیم زمینه را برای بررسی‌های بیشتر و تولید یک پروتئین نو ترکیب در آینده فراهم سازیم. نظر به اینکه مشاهدهٔ بررسی‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که برای بهبود اثرات مرگ سلولی این آنزیم هنوز اصلاحاتی در آن ایجاد نشده است، هدف از این پژوهش بررسی همین موضوع است.

مواد و روش

پیش‌بینی شکل سه‌بعدی

در ابتدا، شکل سه‌بعدی آنزیم مدنظر از سایت <http://www.rcsb.org/> به‌شمارهٔ 10.2210/pdb1YV6/pdb، ثبت شده است به‌دست آمد. به‌دلیل در دسترس نبودن ساختار RNase A گوسفندی، شکل سه‌بعدی آنزیم RNase A گوسفندی با استفاده از این اطلاعات پیش‌بینی شد؛ سپس، این ساختار سه‌بعدی ریپونوکلئاز پانکراس گوسفندی نیز به‌وسیلهٔ نرم‌افزار I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) پیش‌بینی گردید. در ادامه، صحت ساختار پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار SAVESv5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>) سنجیده شد. بدین ترتیب که ابتدا شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شده به‌وسیلهٔ پلات رامچاندرا بررسی و برای انجام دادن اصلاحات شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شدهٔ اولیه به نرم‌افزار گلمکسی به‌آدرس <http://galaxy.seoklab.org/refine> فرستاده شد و نتیجه دوباره به‌وسیلهٔ پلات رامچاندرا بررسی گردید (۱۱).

همچنین، خواص فیزیکی شیمیایی آنزیم ریپونوکلئاز گاو و گوسفند نیز به‌کمک سایت پرات پارام (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی گردید. در انتها، به‌وسیلهٔ نرم‌افزار SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) شکل سه‌بعدی آنزیم

پیوند فسفودی‌استر بین نوکلئوتیدها موجب تجزیهٔ آن‌ها می‌شوند. این ویژگی این آنزیم‌ها باعث می‌شود که در آزمایشگاه‌های زیستی کارکردهای متنوع و متعددی داشته باشند، از جمله برای استخراج DNA، آنالیز توالی RNA و نقشه‌یابی RNA، و به‌عنوان نشانگر وزنی مولکولی؛ بنابراین، تولید تجاری آنزیم‌های ریپونوکلئاز اهمیت فراوانی دارد (۶).

آنزیم‌های RNase در اکثر موجودات زنده وجود دارند، اما در نشخوارکنندگان، به‌دلیل سیستم گوارشی منحصربه‌فرد این جانداران، بیشتر تولید می‌شوند (۳). به‌طور کلی، این آنزیم‌ها در نشخوارکنندگان سه همولوگ دارند که به‌ترتیب عبارت‌اند از همولوگ مغزی، همولوگ سمينال و همولوگ پانکراسی (۴). باتوجه به اینکه دستگاه گوارش نشخوارکنندگان وابسته به تخمیر میکروبی است و این مکانیسم سبب تولید حجم زیادی از پروتئین‌ها، DNA و RNA میکروبی می‌شود، نشخوارکنندگان برای هضم این فرآورده‌های تخمیری نیازمند تولید حجم بیشتری از آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ این ترکیبات هستند که دربارهٔ RNase این موضوع ثابت شده است: مشاهدات نشان داده‌اند که سلول‌های برون‌ریز پانکراس این موجودات حجم بسیاری از آنزیم‌های RNase تولید می‌کنند (۶) که آن‌ها را، براساس میزان تولید، به‌ترتیب RNase A، B، C و D نامیده‌اند. در این بین، RNase A شناخته شده تر است (۳).

اولین بار، در سال ۱۹۴۰ آنزیم RNase پانکراتیک از پانکراس گاو به‌دست آمد؛ بعد از آن، استخراج این آنزیم از حیواناتی مانند گوسفند، موش، خوک، اسب و بز نیز صورت گرفت (۵). در سال‌های بعد، از RNase پانکراس گاوی همچنین به‌عنوان مدلی برای بررسی پیچ خوردگی پروتئین‌ها، کسب اطلاعات دربارهٔ باندهای دی‌سولفیدی و همچنین مطالعات کریستالوگرافی استفاده کردند. امروزه، این آنزیم به‌عنوان یک عامل القاکنندهٔ مرگ سلولی نیز شناخته می‌شود که این کار را با از بین بردن RNA سلولی انجام می‌دهد (۵، ۳۰). از میان تمام RNase‌های شناخته شده، فعالیت آنزیمی RNase A یا همان آنزیم پانکراس گاوی بیشتر گزارش شده است. براساس مطالعات، میزان فعالیت آنزیمی RNase پانکراتیک گوسفندی برابر با ارتولوگ^۱ گاوی آن است (۱۲)، اما مطالعات چندانی دربارهٔ این آنزیم که آن را به‌نام RNase گوسفندی می‌شناسیم صورت نگرفته است.

آنزیم RNase A گوسفند ۱۲۴ آمینواسید دارد، وزن مولکولی آن در حدود ۱۳/۷۱ دالتون است، و در ساختار خود ۴ باند دی‌سولفیدی بین سیستم‌های شمارهٔ ۲۶ با ۸۴، ۴۰ با ۹۵، ۵۸ با ۱۱۰ و ۶۵ با ۷۲ دارد. جایگاه اتصال RNase A در اسید آمینه‌های ۷، ۱۰، ۶۶ و ۸۵ است. شکل ظاهری آن نیز شبیه لوبیاست که جایگاه فعال این آنزیم در ناف لوبیا قرار دارد. دو اسید آمینهٔ هیستیدین ۱۲ و هیستیدین ۱۱۹

تولید را دارد؛ به همین دلیل، نمونه به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و سپس برای جمع‌آوری سلول‌ها در سانتریفیوژ با سرعت 12000 g در ۴ درجه انجام و محلول بالایی خارج شد. سلول‌ها برای بررسی اولیه با الکتروفورز (SDS-PAGE^۵) تأیید شدند.

تخلیص پروتئین

به دلیل وجود سیگنال پپتید PelB در توالی مدنظر بیان پروتئین در فضای پری پلاسمیک صورت گرفته بود که از همین روی برای خالص سازی پروتئین می‌بایست از روش شوک اسموتیک استفاده می‌شد (۱۱).

در انتها، به منظور القا به داخل سلول‌ها بافر هایپرتونیک (Tris- (pH=8, EDTA 1 mM, Saccharose 20%, Hcl 30mM به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر به محلول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 8000 g سانتریفیوژ شد و محلول بالایی از آن جمع‌آوری گشت. پلت به دست آمده در 25 ml 5 mM MgSO₄ hypotonic به صورت محلول به دست آمد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 8000 g سانتریفیوژ شد. در نهایت، محلول بالای به دست آمده جمع‌آوری شد و به مدت ۱۶ ساعت در محلول لایزیز (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH: 8.0 قرار گرفت.

به منظور تخلیص پروتئین از ستون Q-sepharose استفاده شد. ابتدا، ستون سه مرتبه با محلول پروتئین مدنظر شست‌وشو داده شد و ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی که شامل پروتئین می‌بود در دمای ۴ درجه از طریق ستون فیلتر شد. بعد از این مرحله، پروتئین مدنظر با غلظت‌های مختلف محلول نمکی NaCl 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2, 3 مولار از ستون شست‌وشو داده شد. محلول‌های حاصل از فیلتر کردن ستون به وسیله غلظت‌های مختلف نمکی جمع‌آوری شد و بر روی ژل SDS-PAGE وجود پروتئین مدنظر در این محلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت تا مناسب‌ترین غلظت محلول نمکی که شامل پروتئین مدنظر بود به دست بیاید. در انتها، غلظت پروتئین استخراج شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید (۱۴).

بررسی فعالیت RNase

بررسی فعالیت آنزیمی RNase A گوسفندی طبیعی با روش تری پاتی و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت (۲۶). در ابتدا، RNA مخمر با

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی هم تأیید شد. ساختار RNase A پیش‌بینی شده برای شبیه‌سازی در برنامه گرومکس Gromacs (ver 5) software Linux (ver 17) با استفاده از فورس‌فیلد CHARM بررسی گردید. مولکول مدنظر در یک مکعب که درون آن ۵۹۲۲ مولکول آب قرار گرفته بود در pH طبیعی بدن از طریق اضافه کردن ۸ مولکول کلر در فاصله ۷ آنگسترومی پروتئین مدنظر قرار گرفت. بهینه سازی انرژی در ۳۰۰ درجه کلین انجام شد. شبیه‌سازی MD^۱ میزان پایداری پروتئین را از ۱ درجه تا ۳۰۰ درجه کلین و در ۴۰ نانوثانیه بررسی کرد که در این بررسی مقادیر $rmsd^2$, $rmsf^3$ و Rg^4 به دست آمد.

تهیه سازه‌های لازم برای تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس در باکتری ایکولای BL21

در ابتدا، توالی پروتئین مدنظر با کمک نرم‌افزار clc به صورت مجازی در داخل ناقل pET21b قرار گرفت. به دلیل انتخاب سایت های برشی *HindIII* و *XbaI* که مانع عملکرد سیگنال پپتاید PelB leader موجود در وکتور می‌شوند، سیگنال پپتاید PelB leader به منظور بیان پروتئین در فضای پری پلاسمیک به ساختار مدنظر اضافه شد. سپس، ساختار طراحی شده توسط شرکت Shanghai, GenRay (China) به منظور بیان در ایکولای و بهینه سازی کدون به کار گرفته شد و توالی از طریق این شرکت سنتز شد. ابتدا، ساب کلون توالی در داخل وکتور pGH و سپس در درون وکتور pET21b بین دو آنزیم برشی *HindIII* و *XbaI* کلون شد. انتقال وکتور pET21b به همراه توالی مدنظر به داخل میزبان بیان BL21(DE3) به منظور تولید پروتئین مدنظر انجام گرفت. سپس، به وسیله کلونی PCR، انتقال وکتور تأیید شد که در نهایت کلونی مدنظر برای بیان در باکتری ایکولای نیز تأیید گرفت.

بعد از این مرحله، در محیط کشت LB، سلول‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به صورت متحرک، با سرعت 180 rpm، کشت داده شدند. در انتها، ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به ۲ لیتر محیط کشت LB که شامل 100 µg/ml ampicillin بود اضافه و کشت داده شد تا محیط کشت به غلظت مدنظر (OD 600) برسد.

همچنین، به منظور بیان پروتئین به مقدار 1.5 mM از D-l isopropyl β-thiogalactoside (IPTG) نیز به محیط کشت اضافه شد. ابتدا، نمونه‌گیری به منظور بهینه‌سازی زمان تولید به صورت ساعتی انجام گرفت که در نتیجه آن معلوم شد ساعت پنجم بیشترین میزان

4- gyration radius

5- Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

1- Molecular dynamics

2- Root mean square deviations

3- root mean-square fluctuation

گوسفندی با پلات رامچاندرا، قبل و بعد از اصلاحات اولیه، شکل سه بعدی پیش‌بینی شده را تأیید می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تمرکز اسیدهای آمینه در ناحیه پایدار افزایش یافته است و حدود ۹۸٫۴٪ از آن‌ها در قسمت‌های قرمز رنگ و آبی‌رنگ که ناحیه پایداری است متمرکز شده است (۱۵).

مقایسه ساختار سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی و گاوی نشان داده است که باوجود ۴ جهشی که در آنزیم گاوی نسبت به نوع گوسفندی در جایگاه‌های A19S، K37Q، V46F و N103E وجود دارد، این امر هیچ تأثیری بر روی گرایش و شکل سه بعدی آنزیم گوسفندی نگذاشته است و هر دو آنزیم کاملاً شبیه هم هستند (شکل ۲). همچنین، هر دو آن‌ها کاملاً با آنزیم RI براساس داده‌های بیوانفورماتیکی مهار می‌شوند. میزان شباهت این دو آنزیم به یکدیگر در حدود ۹۹٫۷۷٪ است (۳).

همان‌طور که بیان شد، طی این تحقیق، مطالعات و بررسی‌های آنزیمی هم درباره آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند صورت گرفت. این مطالعات بیوانفورماتیکی نشان داد که تفاوت در ۴ آمینواسید تأثیری بر نحوه اتصال به RI ندارد؛ با این حال، از آنجاکه بنابه نظر محققان این‌گونه مطالعات به یک شاهد تأیید شده نیاز دارد، به این منظور از داده‌های کریستالوگرافی آنزیم گاوی برای بررسی‌های بیشتر و افزایش قابلیت اطمینان استفاده شد. این داده‌ها نشان از درست بودن اطلاعات آنزیم گوسفندی داشت (شکل ۳) که البته این نتایج از طریق شبیه‌سازی MDS^۲ نیز تأیید شدند (شکل ۴) (۳۵).

تولید آنزیم طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مطالعات نشان داده‌اند که وجود سیگنال پیتاید PelB باعث تولید پروتئین در فضای پری‌پلاسمیک می‌شود که فضای مناسب‌تر و خلوت‌تری نسبت به فضای سیتوپلاسمیک دارد (۱۲، ۲۴). ژن RNase A که ۳۶۹ جفت باز دارد و بین ۲ سایت برشی *XbaI* و *HindIII* قرار گرفته است به وسیله هضم دوتایی در داخل کلونینگ سایت pET-21b قرار می‌گیرد. طی این تحقیق، با استفاده از کیت اتصال، توالی مدنظر به داخل *E. coli* BL21 (DE3) انتقال داده شد و سپس از طریق کلونی PCR انتقال سازه تأیید شد (شکل ۵). تولید پروتئین طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند به اندازه ۱۳٫۷ کیلودالتون هم با SDS-PAGE تأیید شد. تخلیص این پروتئین به وسیله شوک اسمزی و ستون Q-Sepharose انجام گرفت و سپس از طریق الکتروفورز تأیید شد (شکل ۶). این مطالعات از تولید پروتئین به صورت کامل در سلول‌های مدنظر و فضای سیتوپلاسمی حکایت داشتند. با کمک روش برادفورد میزان غلظت پروتئین طبیعی تولیدشده نیز ۴٫۷۸ mg/ml برآورد شد.

فعالیت آنزیمی و مقاومت در برابر پیپسین

محلول اتیدیوم بروماید مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد؛ سپس، ۲ میکرولیتر از ریبونوکلئاز با غلظت ۲ میکرومول به آن اضافه شد و تغییرات غلظت فلورسنت آن به مدت ۳۰۰ ثانیه و در طول موج ۵۱۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۶). این آزمایش، همچنین، با غلظت مختلف از RI (RNase inhibitor) (Thermo, USA) نیز انجام گرفت (۱۹، ۲۰).

مقاومت در مقابل پروتئازها

ریبونوکلئاز RNase A با غلظت ۰٫۲ mg/mL پیپسین به آنزیم به نسبت ۱ به ۲ در دمای ۳۷ درجه و در داخل محلول ۵۰ mM glycine-HCl در pH ۲٫۴ قرار گرفت. از یک آنزیم تجاری ریبونوکلئاز (Qiagen, USA) به عنوان شاهد در این آزمایش استفاده شد. در زمان‌های مشخصی نمونه‌گیری انجام گرفت و همچنین به منظور تنظیم pH نمونه از محلول ۲ مولار تریس استفاده شد که در نهایت به وسیله SDS-PAGE بررسی گردید (۲۹).

آزمون MTT

به منظور بررسی فعالیت ضدسرطانی آنزیم مدنظر، رده سلولی سرطانی Hella آماده برای کشت در داخل پلیت ۹۶ خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۷٪ به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و سپس برای اطمینان یافتن از زنده بودن سلول‌ها حرکت آن‌ها بررسی گردید. بعد از این، اثر افزودن آنزیم ریبونوکلئاز بر این رده سلولی در ۷ غلظت مختلف (۲۰۰۰ ng، ۲۵۰۰ ng، ۳۰۰۰ ng، ۱۵۰۰ ng، ۱۰۰۰ ng، ۵۰۰ ng، ۱۰۰ ng) با ۳ تکرار آزمایش شد و همچنین IC₅₀ نیز محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی سلول ۲۰ ml از محلول MTT^۱ با غلظت ۵ mg/ml که با PBC رقیق شده بود به پلیت‌ها اضافه شد.

نتایج

مقایسه خصوصیات فیزیکوشیمیایی

در این مطالعه، خواص فیزیکوشیمیایی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس در گاو و گوسفند توسط نرم‌افزار پرات پرام (<https://web.expasy.org/protparam/>) بررسی و مقایسه شد (جدول ۱).

بررسی‌های بیوانفورماتیکی ساختار آنزیم ریبونوکلئاز

پانکراس گوسفند

بررسی‌های شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شده ریبونوکلئاز پانکراس

سلولی Hella

به منظور بررسی میزان سیتوکسییتی RNase از روش MTT assay استفاده شد و همچنین RNase A گاو به عنوان شاهد مدنظر قرار گرفت. در آغاز (شکل ۷)، در حضور آنزیم RNase A گاو و گوسفند، این آنزیم‌ها وارد سلول نشدند و در نتیجه هیچ فعالیت سیتوکسییتی نشان ندادند، ولی پس از تیمار با لیپوفکتامین ۳۰۰۰ (Thermo, USA) براساس روش ارائه شده سلر و همکاران در سال ۱۹۹۵- این تحقیقات در سال ۲۰۱۴ بازبینی شد- آنزیم مدنظر وارد سلول‌ها شد (۲۵). بعد از ورود آنزیم‌ها به سلول‌ها، مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی Hella القا شد. سپس، با بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها میزان فعالیت سیتوکسییتی آنزیم نیز اندازه‌گیری شد.

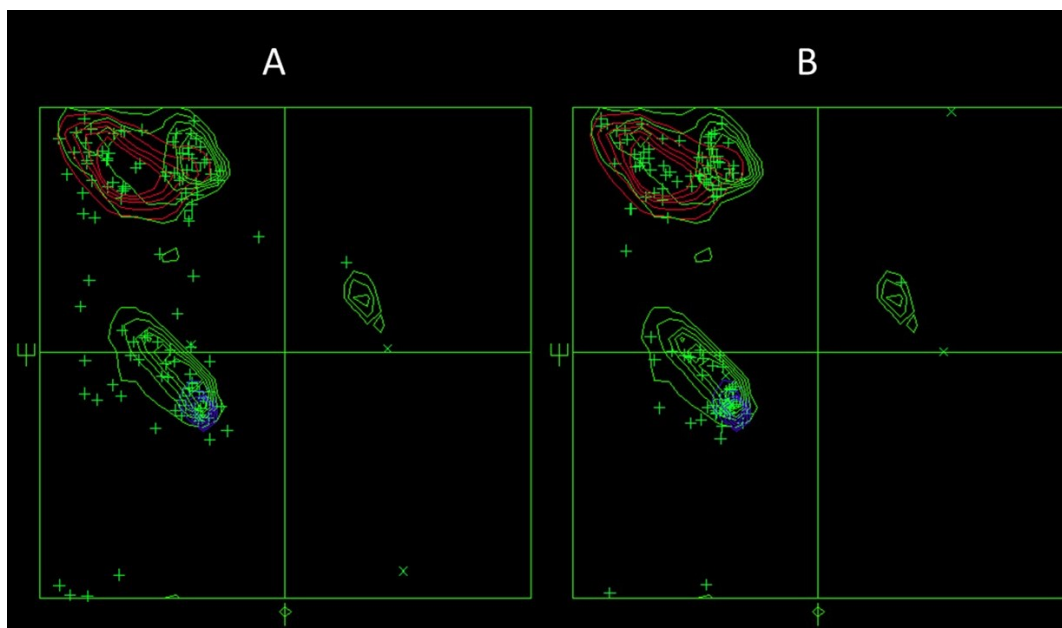
براساس مطالعه انجام گرفته برای سنجش فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 558 ± 22 U/mol تخمین زده شد. همان‌طور که روتوسکی در سال ۲۰۰۸ نشان داده است، سمیت سلولی رابطه مستقیمی با میزان فعالیت آنزیمی این آنزیم‌ها دارد (۳۰). در این مطالعه، از RNase A گاوی به عنوان شاهد استفاده شد که میزان فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده مشابه اطلاعات ارائه شده فروهر مهر و همکاران (۲۰۲۰) بود (۱۰). همچنین، در این تحقیق آنزیم تولید شده به وسیله پپسین انکوبه شد تا میزان مقاومت آن در مقابل پروتئازها اندازه‌گیری شود. آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در پپسین به میزان ۹۰٪ دست‌نخورده باقی ماند.

اثر سیتوتوکسییتی RNase گوسفند بر روی رده

جدول ۱- مقایسه خصوصیات فیزیوشیمیایی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند و گاو

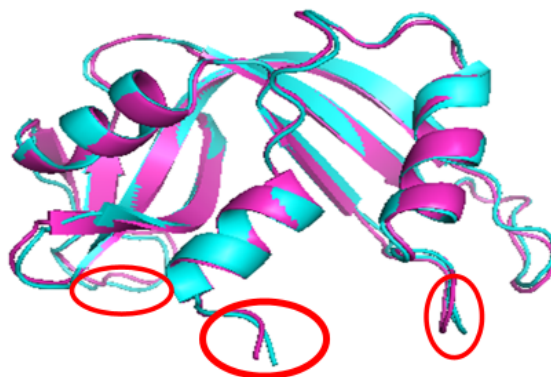
Table 1- Comparison of physicochemical properties of Ovine and Bovine pancreatic RNase A

ریبونوکلئاز پانکراس Pancreatic ribonuclease	Bovine گاو	Ovine گوسفند
تعداد اسید آمینه Number of amino acids	124	124
وزن مولکولی Molecular weight	13690.29	13707.23
نقطه ایزو الکتریک pI Theoretical pI: 8.64	8.64	8.15
مقدار بار مثبت Total number of positively charged residues	10	11
مقدار بار منفی Total number of negatively charged residues	14	13
فرمول اتمی آنزیم Formula	C575H909N171O193S12 C574H904N170O196S12	
تعداد اتم‌ها Total number of atoms	1860	1856
نیمه عمر در گولبولهای قرمز نابلق پستانداران half-life (mammalian reticulocytes, in vitro)	1.3 hr.	1.3 hr.
نیمه عمر پروتئین در سلول‌های مخمر (yeast, in vivo)	3 min.	3 min.
نیمه عمر پروتئین در <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> , in vivo)	3 min.	3 min.
شاخص پایداری The instability index	42.12	44.26
شاخص ایدوستی Aliphatic index	46.45	45.65
متوسط هیدروپاتی Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.663	-0.681



شکل ۱- پلات رامچاندرا. A- پلات رامچاندرا قبل از انجام اصلاحات B- پلات رامچاندرا بعد از انجام شدن تصحیحات

Figure 1- The Ramachandran plot (A) The Ramachandran plot of initial model (B) The Ramachandran plot of refined model



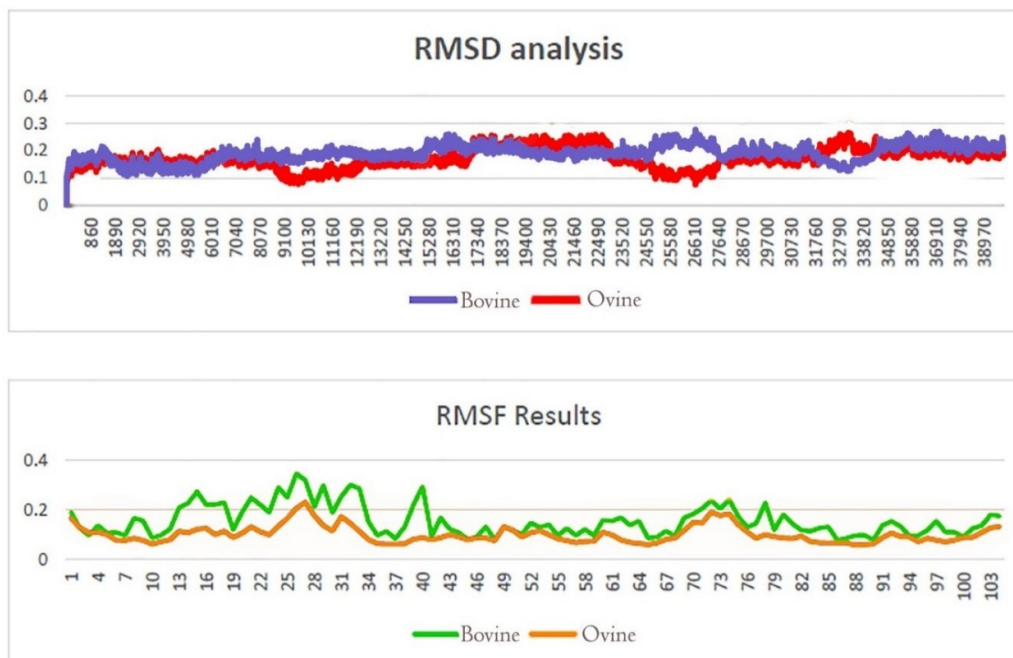
شکل ۲- هم‌ردیفی ریبونوکلئاز پانکراس گاو با ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

Figure 2- Alignment of the bovine RNase A with the ovine RNase A



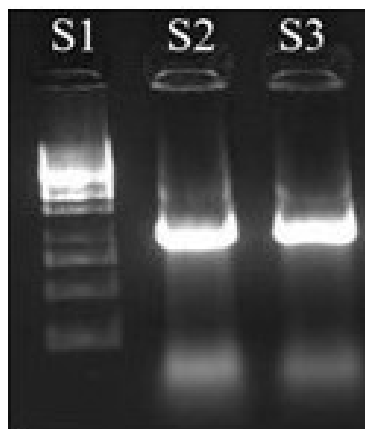
شکل ۳- ساختار سه بعدی RNase A گوسفند

Figure 3- 3D structure of the ovine RNase A



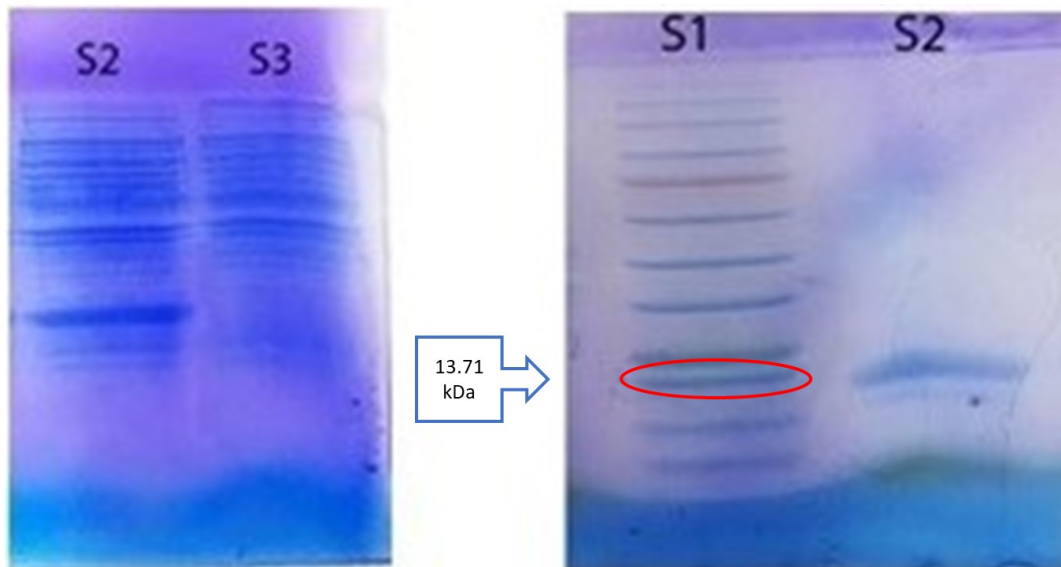
شکل ۴- RMSD و RMSF شبیه‌سازی آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی گاو و گوسفند نشان‌دهنده ثبات و تعادل ساختار این دو آنزیم است.

Figure 4- RMSD and RMSF analysis confirmed the stability of the ovine RNase.



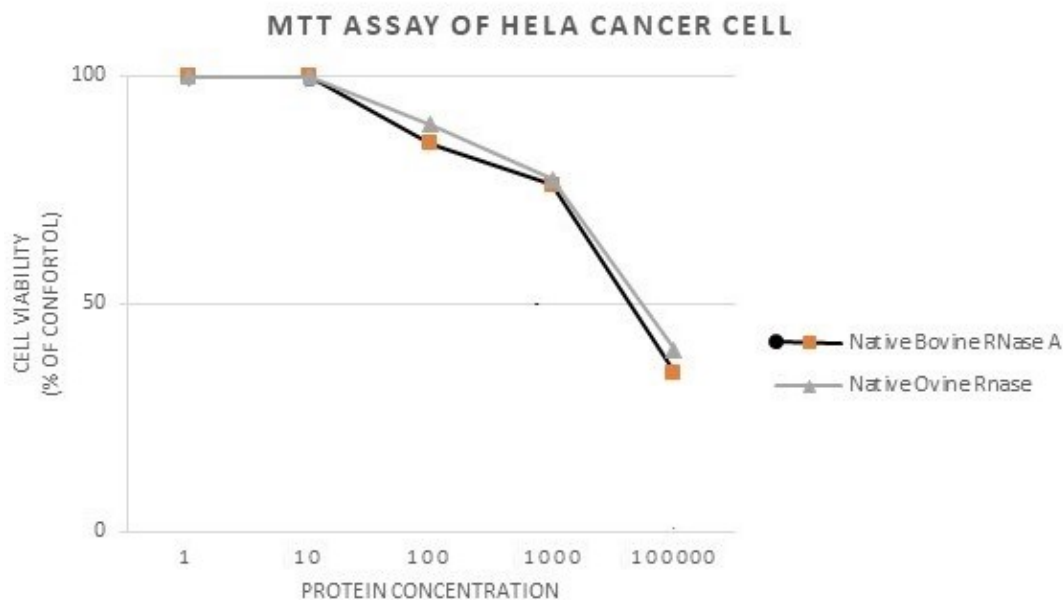
شکل ۵- نتیجه حاصل از کلونی PCR ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. S1: مارکر M100+ (شرکت ترمو، آمریکا)، S2 و S3: RNase A طبیعی

Figure 5- The colony PCR of ovine RNase A, S1: M 100+ marker (Thermo, USA), S2 and S3: Native ovine RNase A.



شکل ۶- چپ: تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، S2: پروتئین طبیعی پانکراس گوسفندی، S3: *E. coli* BL21(DE3) with pET 21b (+). راست: نتایج خالص سازی پروتئین. S1: لدر پروتئین (Thermo, USA)، S2: نتیجه خالص سازی پروتئین طبیعی گوسفند

Figure 6- Left: Recombinant protein production in *E. coli* BL21(DE3), S2: native ovine RNase A protein, S3: *E. coli* BL21(DE3) with pET 21b (+). Right: purification of the ovine RNase A. S1: protein ladder (Thermo, USA), S2: native ovine RNase A protein.



شکل ۷- نتایج MTT assay آنزیم RNase طبیعی گاو و گوسفند بر روی رده سلول های سرطانی HeLa
Figure 7- MTT assay of native and mutant ovine and bovine RNase A on HeLa cancer cell line.

ما نیز در بررسی های MDS با اندازه گیری RMSF، RMSD و Gyration curves میزان پایداری آنزیم تولید شده را بررسی کردیم. اطلاعات به دست آمده طی این تحقیق با داده های حاصل از مطالعات سال های قبل کاملاً همپوشانی و همخوانی داشت (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و

بحث

مطالعات نشان داده اند که بررسی های استاتیکی و دینامیکی راهکار مناسبی برای بررسی پایداری پروتئین ها پیش روی ما می نهند.

مطالعات و بررسی‌ها نشان داده‌اند که از آنزیم مهندسی‌شده RNase A گاو و گوسفند می‌توان به‌عنوان توکسین در ایمونوتوکسین‌ها به‌صورت فعال بهره گرفت. همان‌طور که بیان شد، RNase A طبیعی قابلیت سمیت در سطح سلول را ندارد که این، خود، یک مشخصه مثبت برای این آنزیم‌هاست، زیرا بدین ترتیب می‌تواند با اتصال به آنتی‌بادی به‌صورت انتخابی وارد سلول مدنظر شود و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی القا کند (۱۴). البته ما در این تحقیق به‌منظور بررسی سمیت RNase A طبیعی و القای مرگ از طریق آن با استفاده از لیپوفکتامین برای ورود آنزیم به سلول سمیت این آنزیم طبیعی را بررسی کردیم.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه نشان داد که آنزیم RNase A گاو و گوسفند شباهت فراوانی به یکدیگر دارند و RNase A گوسفندی قابلیت زیادی برای تولید تجاری و القای مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی دارد. همچنین، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، مانند آنزیم RNase A گاو، در خارج از سلول گیرنده سطح سلولی ندارد و وارد سلول نمی‌شود، زیرا RI آن را کاملاً مهار می‌کند. این یعنی، در صورت مهندسی‌کردن این آنزیم و تولید یک آنزیم جهش‌یافته با حفظ فعالیت آنزیمی که توانایی فرار از RI را داشته باشد، می‌توان از آن به‌عنوان یک بدیل مناسب به‌مثابه توکسین در ایمونوتوکسین‌ها استفاده کرد. آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی جانشین مناسبی برای استفاده به‌عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌هاست، زیرا فعالیت و توکسیستی مشابه آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد با گزینش شماره ۳/۴۴۴۷۴ انجام یافته است.

۳۳). در این پژوهش، با تأیید پایداری آنزیم به‌واسطه اطلاعات دینامیکی از فعال بودن آنزیم نیز اطمینان حاصل شد. مقاومت آنزیم در مقابل پپسین هم نشان از ساختار صحیح آنزیم تولیدی داشت، زیرا در سال ۱۹۸۴ اسمیت و همکاران نشان داده‌اند که آنزیم فقط با داشتن ساختار صحیح قابلیت مقاومت در حضور پپسین را خواهد داشت (۲۸). ما در مطالعات MDS آنزیم مدنظر را مدل قرار دادیم، چه‌اینکه در بررسی‌های پیشین RNase A گاوی مدل کریستالوگرافی آن مدنظر قرار گرفته است (۱۰، ۱۸ و ۲۳).

از آنجاکه آنزیم مدنظر ما شباهت بسیار زیادی به آنزیم گاوی دارد و تنها در ۴ اسید آمینه با آن متفاوت است، انتظار می‌رود که یک آنزیم مناسب با قابلیت بالا برای استفاده به‌عنوان توکسین باشد. ما در مطالعات MDS پس از بررسی RNase A گاو در شکل کریستالوگرافی ثبت‌شده RNase A گوسفند را جانشین ساختیم. این شبیه‌سازی آنزیم RNase A طبیعی گوسفند و گاو نشان از شباهت زیاد بین این دو آنزیم و میزان تعادل بالای آن‌ها در فشار ۱ اتمسفر و دمای بدن داشت که از طریق مسیرهای آزمایشگاهی نیز تأیید شد (۱۰ و ۱۸). مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام گرفته است نشان داده‌اند که بسیاری از ریبونوکلئازها، مانند آنکوناز، ریبونوکلئاز سمینال گاو و نیز ریبونوکلئاز پانکراس گاو، وقتی به‌عنوان یک ایمونوتوکسین از آن‌ها استفاده شده است، بعد از ورود به سلول‌های سرطانی مانع از تولید پروتئین در آن‌ها شده‌اند (۱، ۷، ۹، ۱۶، ۱۹، ۲۷ و ۳۰).

ساندلس و همکاران (۲۰۱۱) ۱۳ نوع پروتئین از نوع آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس قورباغه راناپیراناز تولید کردند و با این پروتئین‌ها اثرات پیوندهای بین RNase A و RI را آشکار ساختند. باتوجه به این تحقیقات، به‌نظر می‌رسد می‌توان از RNase A گوسفند یک آنزیم جهش‌یافته تولید کرد که توانایی فرار از RI را داشته باشد، زیرا همان‌طور که بررسی‌ها نشان داده‌اند RNase A گاو و گوسفند در حضور RI کاملاً غیرفعال می‌شوند (۲۹). طی یک دوره مطالعات در سال ۲۰۲۰، فروهر مهر و همکاران از RNase A گاو یک نوع آنزیم جهش‌یافته تولید کردند که قابلیت فرار از RI را داشت (۱۰).

منابع

1. Ardelt, W., K. Shogen, and Z. Darzynkiewicz. 2008. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):215-225.
2. Barnard, E. 1969. Biological Function of Pancreatic Ribonuclease. *Nature*, 221: 340- 344.
3. Becker, R. R., J. L. Halbrook, and C. Hirs.. 1973. Isolation and Characterization of Ovine Ribonuclease A, B, and C from Pancreatic Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 248:7826-7832.
4. Breukelman, H. J., N. Munnik, and R. Kleinedam. 1998. Secretory ribonuclease genes and pseudogenes in true ruminants. *Gene*, 212(2):259-68.
5. Beintema, J. J., and J. M. van der Laan. 1986. Comparison of the structure of turtle pancreatic ribonuclease with those of mammalian ribonuclease. *The Federation of European Biochemical Societies*, 194(2):338-343.
6. Claudi, M., M. Cuchillo, R. Victòria Nogués, and T. Raines. 2011. Bovine Pancreatic Ribonuclease: 50 Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. *The Journal of Biochemistry*, 50(37):7835-7841.
7. De Lorenzo, C., A. Nigro, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2002. A new RNase-based immunoconjugate selectively

- cytotoxic for ErbB2-overexpressing cells. The Federation of European Biochemical Societies, 516(1-3):208-212.
8. De Lorenzo, C., A. Arciello, R. Cozzolino, D. B. Palmer, P. Laccetti, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2004. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Research*, 64(14):4870-4874.
9. DelCardayr, S. B., M. Ribio, E. M. Yokel, D. J. Quirk, W. J. Rutter and R. T. Ruines. 1995. Engineering ribonuclease A: Production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Engineering*, 18:261-273.
10. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh. 2020. Production and introduction of a novel immunotoxin based on mutant RNase A for inducing death to Her1□positive cell lines. *Journal of Cell Physiology*, doi: 10.1002/jcp.29346
11. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh, A. 2018. Different Signal Peptides for Secretory Production of Recombinant Bovine Pancreatic Ribonuclease A in Gram Negative Bacterial System: An In silico Study. *Current Proteomics*, 15: 24-31
12. Gesteland, R. F., and J. Atkins. 1993. The RNA World. Cold SpringHarbor LaboratoryPress Plainview, NY.
13. Ghovvati, S. 2014. Engineering ScFv-FC antibody bound to RNase to target HER2 antigen. Doctoral dissertation, Ferdowsi University. (In Persian)
14. He, F. 2011. Bradford Protein Assay. *Biotechnology Innovation Organization*, 101:e45. 10.21769.45.
15. Jaydarian, A., N. Nazifi, and A. Forouharmehr. 2020. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against *Coxiella burnetii*. *Human Immunology*, 10:10-16.
16. Leich, F., N. Stohr, A. Rietz, R. Ulbrich-Hofmann, and U. Arnold. 2007. Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38):27640-27646.
17. Lomax, J. E., C. M. Bianchetti, A. Chang, G. N. Phillips, B. G. Fox, and R. T. Raines. 2014. Functional evolution of ribonuclease inhibitor: insights from birds and reptiles. *Journal of Molecular Biology*, 426(17):3041- 3056.
18. Lu, L., J. Li, M. Moussaoui, and E. Boix. 2018. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. *Frontiers in Immunology*, 9:1012.
19. Menzel, C., T. Schirrmann, Z. Konthur, T. Jostock, and S. Dubel. 2008. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood*, 111(7):3830-3837.
20. 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 onconase mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 6:280(18):17953-60.
21. Pikkemaat, M. G., B. M. Linssen, J. C. Berendsen, and D. B. Janssen. 2002. Molecular dynamics 355 simulations as a tool for improving protein stability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 15:185-192.
22. Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chemical Review*, 98:1045-1065.
23. Riccio, G., C. D. Avino, R. T. Raines, C. D. Lorenzo. 2013. A novel fully human antitumor ImmunoRNase resistant to the RNase inhibitor. *Protein Engineering, Design & Selection*, 26:243-248.
24. Rutkoski, T. J., and R. T. Raines. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of 360 ribonuclease cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3):185-9.
25. Sells, M., J. Li, and J. Chernoff. 1995. Delivery of proteins into cells using cationic liposomes. *BioTechniques*, 19(1):72-6.
26. Stigh, E., G. Aqvist, and C. B. Anfinsen. 1958. The Isolation and Characterization of Ribonucleases from Sheep Pancreas. *The Journal of Biological Chemistry*, 234:1112-1117.
27. Schirrmann, T., J. Krauss, M. A. Arndt, S. M. Rybak, and S. Dubel. 2009. Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(1):79-95.
28. Schmid, F., and H. Blaschek. 1984. An early intermediate in the folding of ribonuclease A is protected against cleavage by pepsin. *Biochemistry*, 23(10):2128- 2133.
29. Sundlass, N. K., and R. T. Raines. 2011. Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of onconase. *Biochemistry*, 50(47):10293-9.
30. Turcotte, R. F., L. D. Lavis, and R. T. Raines. 2009. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. *The Federation of European Biochemical Societies*, 276(14):3846-3857.
31. Tripathy, D. R., A. K. Dinda, A. K., and Dasgupta, S. 2013. A simple assay for the ribonuclease activity of ribonucleases in the presence of ethidium bromide. *Analytical Biochemistry*, 437(2):126-9.
32. <http://www.uniprot.org>
33. Welling, G., Scheffer, A., and Beintema, J. 1974. The Primary structure of goat and sheep pancreatic ribonucleases. North-Holland Publishing Company – Amsterdam,41:58- 61.
34. Zeiske, T., Stafford, K. A., and Palmer, A. G. 2016. Thermostability of Enzymes from Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14;12(6):2489-92



Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics

Mahsa Zabetian¹, Mohammadreza Nassiri², Ali Javadmanesh³, Shahrokh ghovati⁴

Submitted: 25-10-2020

Accepted: 26-12-2020

Zabetian, M., M. R. Nassiri, A. Javadmanesh, and S. Ghovati. 2021. Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics. *Iranian Journal of Animal Science Research* 13(3):429-440.

Introduction Obviously, the recent decades strategy in cancer therapy, anticancer drug discovery and drug improvement is to characterize, distinguish and validate the most promising cancer-related molecular targets to which new drugs can be designed. The unique features of the pancreatic RNase (RNase A) such as high activity, stability, lack of a cofactor, and small molecular size have made it the most popular enzyme in the ribonuclease family. Specifically, RNase A is involved in endonucleolytic cleavage of 3'-phosphomononucleotides and 3'-phosphooligonucleotides ending in C-P or U-P with 2', 3'-cyclic phosphate intermediates. RNase A was purified from the Bovidae family including bovine, ovine, bison, eland, goat and gnu. Although phylogenetic analyses of RNase A revealed high similarity among members of the Bovidae family, some functional mutations were also found. Several studies showed that the RNA hydrolyzing action of ribonuclease is able to induce apoptosis and cell death in cancer cells, independently. This effect could be enhanced thousands of times when ribonuclease is linked to antibodies. These enzymes show potent cytotoxic activity on cell internalization but do not show sensible immunogenicity or non-specific toxicity toward normal cells. Ovine pancreatic ribonuclease enzyme is a member of super family RNase A, it can be a good candidate as a toxin for designing new drugs. The objective of this study was to produce ovine pancreatic ribonuclease enzyme in *E. coli* and characterize its activity.

Materials and methods All structures needed for this study were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) website (<http://www.rcsb.org/>). PDB files (accession numbers: 10.2210 /pdb1YV6/pdb and 10.2210/pdb3SNF/pdb) related to natural Bovine Pancreatic RNase were selected. Gene synthesis and production of recombinant protein were conducted by using the pelB signal sequence at the beginning of the structure for periplasmic protein production. The native ovine RNase and bovine RNase A were optimized for *E. coli* host by GenRay codon optimization service and sent to GenRay Biotechnology (Shanghai, China) for synthesis. The target genes in pGH vector were sub-cloned in pUC19 and then cloned into the pET21b (+) vector between XbaI and HindIII sites. After transformation, *E. coli* cells containing recombinant pET21b (+) were cultivated in LB broth medium containing ampicillin. To extract the proteins, osmotic shock methods were applied. After that Q-sepharose chromatography was used to extract the target protein. Finally, Bradford analysis was used to determine the protein concentration. The ribonucleolytic activity of the recombinant native ovine RNase A was compared with native bovine RNase A following Tripathy et al (2013) method. To investigate the antitumor activity of recombinant proteins, HeLa cells were prepared for seeding in a 96-well flask and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 72 h.

Results and discussion The production of native ovine and bovine RNase A was confirmed by SDS PAGE. Protein purification was successfully performed using osmotic shock in the Q-Sepharose column. Although our findings confirmed protein expression, no detectable proteins other than RNase A was observed in the LB medium, indicating that almost all the proteins were expressed either inside the bacterial cell or secreted into the periplasmic

1- Ph.D student, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

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

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

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

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

DOI:10.22067/ijasr.2020.38319.0

area. According to the Bradford analysis, the concentration of the recombinant proteins extracted was 4.78 ovine RNase A. Based on our results, it was shown that the ribonucleolytic activity of native ovine RNase A was 558 ± 22 . The results showed that RNase A exhibited resistance to pepsin degradation during the whole incubation process (22 h), in the course of which 90% of RNase A remained undamaged. To determine the cytotoxic effect of ovine RNase on the HeLa cell line, MTT assay was done following incubation with ovine RNase A. The commercial RNase A was used as control. The results showed that ovine RNase A and bovine RNase A had no cytotoxic effect on HeLa cells. When RNase treatment was done by the lipofectamine 3000 (Thermo, USA), the cytotoxicity effect was observed. Several studies have shown that some ribonucleases such as onconase, bovine seminal ribonuclease and bovine pancreatic ribonuclease have a great promise as cancer immunotherapeutic agents and cause a significant reduction in the protein synthesis of tumor cells after internalization into cytosol.

Conclusion Our findings demonstrate that ovine RNase similar to bovine RNase has a great potential for use in drug design industry. We revealed that the native ovine RNase A was more stable than the native bovine RNase. In future work, we intend to fuse the engineered ovine-RNase A to dedicated recombinant antibodies for cancer therapy and investigation of engineered immuno-ribonuclease potency and cell killing effects as a fusion protein.

Keywords: Bioinformatics, Biological activity, Cytotoxicity, Ovine pancreatic ribonuclease.



مقاله علمی - پژوهشی

برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی منحنی رشد لجستیک و همبستگی مولفه‌ها در گوسفند زندی

سعید نیسی^۱، هدایت اله روشنفکر^{۲*}، جمال فیاضی^۳، مرتضی ممویی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۸

نیسی، س.، ه. روشنفکر، ج. فیاضی، و م. ممویی. ۱۴۰۰. برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی منحنی رشد لجستیک و همبستگی مولفه‌ها در گوسفند زندی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۴۱-۴۵۱.

چکیده

از مهم‌ترین صفات دام‌های اهلی که به لحاظ اقتصادی اهمیت فراوانی دارند، صفات مرتبط با رشد می‌باشند. رشد یک خصوصیت ضروری سیستم‌های بیولوژیکی و یک افزایش در اندازه بدن به ازاء واحد زمان است که به صورت ترکیبی از اثرات ژنتیکی و محیطی توصیف می‌شود. لذا پژوهش حاضر به منظور تخمین پارامترهای ژنتیکی متغیرهای منحنی رشد گوسفند زندی با استفاده از مدل‌های حیوانی مناسب انجام گرفت. پارامترهای منحنی رشد مورد بررسی شامل وزن بلوغ مجانبی (A)، نرخ رشد (B) و نرخ بلوغ (K) بودند. به منظور بررسی اثرات ثابت و برآورد پارامترهای منحنی رشد از رویه NLIN نرم افزار SAS استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از شش مدل حیوانی و روش آماری حداکثر درست‌نمایی محدود شده (REML) با نرم‌افزار Wombat و روش بیزی مبتنی بر تکنیک نمونه‌گیری گیبس با نرم‌افزار MTGSAM انجام گرفت. وراثت‌پذیری مستقیم برآورد شده با استفاده از روش REML و بیزی برای پارامتر وزن بلوغ مجانبی ۰/۰۶۴ و ۰/۱۴، نرخ رشد ۰/۱۷ و ۰/۱۶، نرخ بلوغ ۰/۱۶ و ۰/۱۸ به ترتیب برآورد شد. وراثت‌پذیری مادری پارامترهای منحنی رشد در دامنه ۰/۰۰۶ تا ۰/۰۸ و نسبت واریانس محیطی به فنوتیپی در محدوده ۰/۰۳ تا ۰/۰۵ بود. همبستگی ژنتیکی مستقیم بین پارامترهای منحنی رشد ۰/۳۲۳، ۰/۴۲۹- و ۰/۸۰۳ به ترتیب برای A-B، B-K و A-K بدست آمد. به طور کلی برآورد پارامترهای منحنی رشد می‌تواند در طراحی برنامه‌ها و استراتژی‌های انتخاب در این نژاد زندی استفاده شود. در مطالعه حاضر برآورد وراثت‌پذیری پایین پارامترهای A، B و K می‌تواند به دلیل واریانس فنوتیپی بالا و تنوع شرایط محیطی ارتباط داشته باشد. با توجه به این موضوع می‌توان گفت عوامل محیطی می‌توانند به شدت پتانسیل ژنتیکی رشد دام را محدود کنند. بنابراین بهبود شرایط محیطی و بکارگیری استراتژی‌های بهینه مدیریتی در رسیدن به منحنی رشد مطلوب بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: حداکثر درست‌نمایی محدود شده، روش بیزی، نرخ رشد، وراثت‌پذیری، همبستگی.

مقدمه

برای گوشت گوسفند در ایران، بیشتر فعالیت‌های پرورشی این حیوان در جهت هدف فوق متمرکز شده است. از سوی دیگر با کاهش تقاضای داخلی و خارجی برای گوشت گوسفندانی نظیر زندی که به عنوان گوسفند پوستی شناخته می‌شوند، نقش اقتصادی این محصول در مقابل سایر محصولات و به‌ویژه گوشت، کم‌رنگ‌تر شده و تولید

تنوع شرایط آب و هوایی در ایران، سبب ایجاد حدود ۲۷ نژاد گوسفندی گردیده است. هر یک از این نژادها در اقلیم خاصی از کشور غالب هستند و دارای وزن زنده متفاوت می‌باشند (۴). با افزایش تقاضا

۳- استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

(*) - نویسنده مسئول: (Email: roshanfekr_hd@yahoo.com)

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.81528

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.

مواد و روش ها

در پژوهش حاضر به منظور برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی منحنی رشد گوسفندان زندی از اطلاعات مربوط ۸۲۸۲ رأس بره متولد شده طی سال های ۱۳۷۰ تا ۱۳۹۲ (جمعاً ۲۲ سال) در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی جهاد کشاورزی استان تهران (ایستگاه خجیر) استفاده شد. این اطلاعات شامل شماره حیوان، شماره ی پدر و مادر حیوان، سال زایش، فصل زایش، جنس حیوان، تیپ تولد و سن مادر در هنگام زایش و رکوردهای صفات وزن بدن در سنین مختلف (تولد، شیرگیری، شش ماهگی، نه ماهگی و یکسالگی) گوسفند زندی و مقادیر آغازین، پارامترهای منحنی رشد با استفاده از مدل لجستیک برآورد شد (جدول ۱). مدل لجستیک به دلیل داشتن بیشترین دقت و کمترین خطا، به عنوان مدل برگزیده در توصیف الگوی رشد گوسفندان زندی انتخاب گردید. این مدل، می تواند یک مقایسه توصیفی از رشد را در این نژاد ایجاد نماید و برای پیش بینی میزان رشد در هر مقطع زمانی مورد استفاده قرار گیرد. پارامترهای منحنی رشد مورد بررسی در این پژوهش شامل وزن بلوغ مجانبی (A)، نرخ رشد (B) و نرخ بلوغ (K) بودند.

$$w_t = A(1 + Be^{-kt})^{-1} + \varepsilon \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در در معادله فوق: wt: وزن بدن در زمان رکورد برداری، e: عدد نپری و E: انحراف مقدار مشاهده شده از مدل تخمین زده شده است. پارامتر A: وزن بلوغ یا حد مجانب هر مدل در زمانی که سن (t) به سمت بی نهایت میل می کند می باشد. به طور کلی متوسط وزن بدن در زمان بلوغ جسمی است و مستقل از تغییرات وزن بدن در اثر تغییرات محیط خارجی می باشد. پارامتر B: ثابت انتگرالی نامیده می شود و هیچ تفسیر بیولوژیکی ندارد. پارامتر K نرخ تغییرات خطی تابع لگاریتمی بلوغ جسمی در واحد زمان یا شاخص بلوغ است و این شاخص نرخ بلوغ بعد از تولد را در منحنی رشد برآورد می کند. مقدار بزرگ K یا شیب منحنی رشد، نشان دهنده بلوغ زودرس دام است.

آماده سازی و تجزیه و تحلیل داده ها

با استفاده از برنامه Pedigree (۲۸) فایل شجره تشکیل شد. جهت آماده کردن و ویرایش اطلاعات از برنامه Excel استفاده شد. اثر عوامل ثابت مؤثر بر صفات مورد بررسی از تجزیه و تحلیل حداقل مربعات با استفاده از مدل خطی تعمیم یافته (GLM) نرم افزار SAS9.1 (۲۹) انجام گرفت. اثرات ثابت شامل اثرات ثابت سال تولد (۱۳۹۲-)

گوشت هم اکنون هدف اصلی دامداران پرورش دهنده ی این نژاد را به خود اختصاص داده است (۲۴). رشد یک صفت سودآور در حیوانات اهلی می باشد. تعریف ابتدایی رشد عبارت است از: افزایش در اندازه، تعداد و یا توده بدن در طول زمان است. با این وجود، این تعریف پدیدارشناسی و علل رشد را شامل نمی شود. رشد باید به وسیله نرخ رشد یا افزایش وزن و اندازه بدن در طی مراحل زندگی بررسی شود، زیرا که رشد یک تابع پیوسته در طول زندگی حیوان (از مرحله جنینی تا سن بلوغ) است (۶). امروزه نرخ رشد یا چگونگی تغییرات وزن بدن در مراحل مختلف زندگی به عنوان سنجهای مهم در فرآیند اصلاحی در نظر گرفته می شود (۱۷). دلیل این امر را می توان بواسطه ارتباط مستقیم این صفت با میزان تولید گوشت دانست (۲۰). به دلیل اهمیت اقتصادی وزن بلوغ، نرخ رشد و خصوصیات وابسته به آن، رابطه بین سن و وزن موضوع مهم و مورد توجه تولیدکنندگان می باشد. شناخت روابط ژنتیکی و محیطی بین وزن های مختلف، درجه بلوغ و سرعت رشد در تمام مراحل رشد برای طراحی برنامه اصلاح نژادی به منظور بهبود کارایی تولید در طول عمر حیوان ضروری است. نتایج تحقیقات نشان می دهد که متغیرهای منحنی رشد در گونه های مختلف وراثت پذیر هستند بنابراین امکان تغییر شکل منحنی رشد از طریق انتخاب براساس متغیرهای منحنی رشد وجود دارد (۸، ۱۹، ۳۱).

متخصصین علم اصلاح نژاد می بایست بطور دقیق و صحیح با استفاده از مدل ها و روش های آماری مناسب، پارامترهای ژنتیکی را برآورد نمایند؛ تا در نهایت با انتخاب حیوانات برتر (از لحاظ ژنتیکی) و استفاده از آن ها بعنوان والدین نسل بعدی، میانگین تولید را بهبود بخشند. روش های مختلفی برای تخمین مؤلفه های (کو)وار (یانس) استفاده می شود که از آن جمله می توان به حداکثر درست نمایی محدود شده^۱ (REML) و روش بیزی اشاره کرد. در روش REML پیش فرض اساسی این است که نمونه ها از یک جامعه با توزیع نرمال هستند. این روش برای اثر انتخاب در جامعه تصحیح انجام می دهد و مؤلفه های واریانس را از طریق تکرار و همگرایی بدست می آورد (۱۵). در روش بیزی برآورد یک پارامتر از طریق توزیع پسین می باشد و امکان بدست آوردن مستقیم میانگین توزیع پسین در بیشتر موارد وجود ندارد. بنابراین نمونه هایی با خصوصیات مستقل و یکسان از توزیع پسین تولید می شود (۱۰). علیرغم بررسی های انجام شده در زمینه مدل سازی منحنی رشد (۱، ۵، ۱۲، ۱۶)، تاکنون در ارتباط با برآورد پارامترهای ژنتیکی منحنی رشد گوسفند زندی گزارشی ارائه نشده است. لذا این پژوهش با هدف، بررسی اثرات ژنتیکی، محیطی و مادری برای تخمین مؤلفه های (کو)وار (یانس) و وراثت پذیری پارامترهای منحنی رشد گوسفندان زندی و همبستگی بین این پارامترها با استفاده از روش بیزی مبتنی بر نمونه گیری گیبس و روش REML انجام شد.

۱۳۷۰) جنست بره (نر و ماده)، تیپ تولد (تک قلو، دو قلو)، اثر سن مادر (۲-۷) بود. در این پژوهش برای برآورد مؤلفه‌های واریانس، روش‌های حداکثر درست‌نمایی محدود شده (REML) و آنالیز بیزی مورد استفاده قرار گرفتند. در روش REML از نرم افزار Wombat و در روش بیزی

جدول ۱- آماره توصیفی پارامترهای منحنی رشد گوسفند زندی با استفاده از تابع لجستیک
Table 1- Descriptive statistics parameters Zandi sheep using Logistics growth curve function

پارامتر Parameter	مقدار برآورد شده Estimated Amount	خطای استاندارد Standard Error	حدود اطمینان ۹۵٪ Approximate 95% Confidence Limits		تعداد مشاهدات Number of Observations	حداقل Minimum	حداکثر Maximum
			حداکثر Maximum	حداقل Minimum			
A	34.48	0.09	34.66	34.29	1182	19.5	51.83
B	7.61	0.28	8.15	7.06	1160	23/2	5.25
K	0.027	0.0004	0.028	0.026	1195	0.69	0.0044

A: وزن بلوغ مجانبی (کیلوگرم)، B: نرخ رشد از تولد تا بلوغ (کیلوگرم در روز) و K: نرخ بلوغ
A: Asymptomatic mature weight (kg), B: Growth rate (kg/day) and K: maturity rate

بردار اثرات ژنتیکی افزایشی مستقیم، $m =$ بردار اثرات ژنتیکی افزایشی مادری، $c =$ بردار اثرات محیطی دائمی مادری، $e =$ بردار اثرات باقیمانده، X, Z_1, Z_2 و W ماتریس‌های طرح هستند که مشاهدات را به ترتیب به اثرات ثابت، اثر تصادفی ژنتیکی افزایشی مستقیم حیوان، اثر ژنتیکی افزایشی مادری و اثر محیطی مادری ربط می‌دهند. در مدل‌های ۴ و ۶ کوواریانس اثرات ژنتیکی افزایشی مستقیم و مادری در نظر گرفته می‌شود.

در این تحقیق تعداد سیکل‌های نمونه‌گیری گیس ۲۰۰۰۰۰ دور، دوره قلق‌گیری (دوره‌ای که مقادیر نمونه‌گیری شده پرت بوده و با مقادیر حقیقی تفاوت دارند) ۲۰۰۰۰ و فاصله نمونه‌گیری ۲۰۰ در نظر گرفته شد. برای برآورد اجزای واریانس از شش مدل حیوانی استفاده گردید که در نماد ماتریسی در جدول ۲ نشان داده شده است (۲۴). در این رابطه‌ها: $y =$ متغیر پاسخ و بردار هر یک از مشاهدات پارامترهای منحنی رشد (A، B و K) برای هر حیوان، $b =$ بردار اثرات ثابت، $a =$

جدول ۲- شش مدل حیوانی تک متغیره
Table 2- Six Different Animal Models

مدل Model	P_i/K	فرم ماتریسی Models Matrix Notations
1	1	$a + e, y = Xb + Z$
2	2	$a + Wc, y = Xb + Z$
3	2	$a + Z_2m + e, COV(a,m)=0, y = Xb + Z$
4	2	$a + Z_2m + e, COV(a,m) \neq 0, y = Xb + Z$
5	3	$a + Z_2m + Wc + e, COV(a,m)=0, y = Xb + Z$
6	3	$COV(a,m) \neq 0, a + Z_2m + Wc + e, y = Xb + Z$

P_i و K : تعداد اجزای واریانس و پارامترها در مدل
K and P_i : The number of components variance and parameters in the model

انتخاب مدل مناسب

به منظور تعیین مناسب‌ترین مدل از شش مدل حیوانی با استفاده از نرم افزار Wombat از آماره آزمون AIC استفاده شد. شاخص AIC (۲) به صورت زیر تعریف می‌شود:

(رابطه ۲)

$$AIC = -2 \log L_i + (2P_i)$$

در رابطه فوق $\log L_i$ و P_i به ترتیب لگاریتم تابع درست‌نمایی و

تعداد اجزای واریانس برآورد شده در مدل می‌باشد. انتخاب مناسب‌ترین مدل در بیزی براساس معیار آکائیکی صورت گرفت (۳).

$$\text{AIC} = n \ln(RSS/n) + 2k \quad (\text{رابطه ۳})$$

در این رابطه RSS مجموع مربعات باقیمانده، n تعداد نمونه‌ها و k تعداد پارامترهای موجود در مدل است در زمان استفاده از این روش، مدلی که حداقل مقدار را برای شاخص مذکور حاصل نماید به عنوان مدل مناسب انتخاب شد.

نتایج و بحث

میانگین حداقل مربعات پارامترهای منحنی رشد (A, B, K) گوسفند نژاد زندی به تفکیک اثرات ثابت در جدول ۳ ارائه شده است. در این مطالعه اثر ثابت سال تولد بر همه پارامترهای الگوی رشد لجستیک اثر معنی داری داشت ($P < 0.01$). تفاوت در شرایط اقلیمی، محیطی و مدیریتی با تاثیر بر کیفیت و کمیت علوفه مورد دسترسی بره و مادر بر پارامترهای منحنی رشد تاثیر می‌گذارند. در سایر مطالعات نیز اثر سال بر این صفات معنی‌دار گزارش شده است (۱، ۸، ۲۰، ۲۶ و ۳۰). جنسیت بره یکی از عوامل تاثیرگذار روی پارامترهای منحنی رشد بود به گونه‌ای که وزن بلوغ جنس نر ۱۶ درصد بیشتر از جنس ماده برآورد گردید اثر جنس توسط برخی پژوهشگران معنی‌دار گزارش شده است (۱ و ۲۶). کام و هانجو (۱۷) در پژوهش تغییرات منحنی

رشد بز نژاد آلبین از تولد تا شش ماهگی را بررسی و گزارش دادند که جنسیت اثر معنی داری بر روی پارامترهای A, B, K دارد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. تیپ تولد بره‌ها، فقط بر وزن بلوغ تاثیر معنی‌داری داشت، به این صورت که بره‌های تک قلو و دوقلو تفاوت معنی‌داری از نظر نرخ رشد و نرخ بلوغ، نشان ندادند. براساس نتایج جدول ۳، بره‌های تک قلو ۶ درصد سنگین‌تر از بره‌های دوقلو در وزن بلوغ بودند؛ این میزان کمتر از مقدار ۱۳ درصد گزارش شده برای بره‌های گو سفند مهربانی بود (۸). حجتی و همکاران (۱۳) در مطالعه ای روی گوسفند مهربان گزارش کردند که تیپ تولد بر پارامترهای A و K اثر غیرمعنی‌دار و بر پارامتر B اثری معنی‌دار داشت. سن مادر هنگام زایش فقط روی وزن بلوغ گوسفندان زندی اثری معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). سایر محققین، اثر ثابت سن مادر را در گوسفندان نژاد مهربان و هورو، بر پارامتر نرخ رشد را معنی‌دار گزارش کردند (۱ و ۸). راشدی و همکاران (۲۶) در مطالعه ای گزارش کردند سن مادر روی پارامترهای وزن بلوغ و نرخ رشد معنی‌دار شد ولی روی پارامتر K معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد که میش‌های با سن ۲ سال بدلیل کامل نشدن رشد فیزیولوژیکی، توانایی تولید شیر کمتری داشته و در نتیجه بره‌های آن‌ها وزن پایانی کمتری نسبت به بره‌های سایر مادران داشتند. همچنین مادران بالای ۶ سال به دلیل عدم توانایی دستیابی به مواد مغذی، قدرت تولید شیر کمتری داشته و بره‌های آنها از وزن پایانی کمتری برخوردار می‌باشند.

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات پارامترهای منحنی رشد لجستیک

Table 3- Least squares means logistic growth curve parameters

اثرات ثابت Fixed effect	A	B	K
میانگین Mean	33.86±0.17	3.47±0.02	0.019±0.0002
سال تولد Year of birth	**	**	**
سن مادر Age of dam	**	ns	ns
2	33.41±0.99 ^b	3.59±0.14 ^a	0.018±0.001 ^a
3	34.08±0.99 ^{bc}	3.69±0.14 ^a	0.019±0.001 ^a
4	35.06±0.99 ^a	3.68±0.14 ^a	0.018±0.001 ^a
5	34.92±1.004 ^a	3.59±0.14 ^a	0.018±0.001 ^a
6	34.73±1.02 ^{ac}	3.61±0.14 ^a	0.019±0.001 ^a
7	34.56±1.02 ^{ac}	3.66±0.14 ^a	0.018±0.001 ^a
8	34.59±1.07 ^{abc}	3.58±0.15 ^a	0.018±0.001 ^a
تیپ تولد Type of birth	**	ns	ns
تک قلو single	35.63±0.95 ^a	3.64±0.13 ^a	0.019±0.001 ^a
دوقلو twin	33.33±0.99 ^b	3.62±0.14 ^a	0.018±0.001 ^a
جنس sex	**	**	**
نر male	37.16±0.97 ^a	3.68±0.14 ^a	0.017±0.001 ^a
ماده female	31.79±0.96 ^b	3.62±0.13 ^b	0.019±0.001 ^b

نسبت به نرها بالاتر برآورد شد؛ ماده‌های با وزن تولد مشابه با نرها به

براساس نتایج ارائه شده در جدول ۳، نرخ بلوغ (K) جنس ماده

مستقیم می شود. در پژوهش حاضر برای پارامتر وزن بلوغ با توجه به پایین تر بودن معیار اطلاعات آکائیک در روش REML و بیزی به ترتیب مدل ۴ و ۵ به عنوان مدل مناسب انتخاب گردید؛ در هر دو مدل علاوه بر اثر ژنتیک خود حیوان، اثرات ژنتیکی مادری موثر می باشد. وراثت پذیری مستقیم و مادری وزن بلوغ بر اساس مدل مناسب در روش REML به ترتیب 0.064 ± 0.002 و 0.09 ± 0.004 و در روش بیزی وراثت پذیری مستقیم و مادری به ترتیب 0.14 ± 0.0003 و 0.08 ± 0.0002 برآورد گردید. در روش REML برای اثر انتخاب در جامعه تصحیح انجام می دهد و مولفه های واریانس را از طریق تکرار و همگرایی برآورد می کند. در روش بیزی برآورد یک مولفه از طریق توزیع پسین انجام می گیرد. روش بیزی با بررسی دقیق عوامل مؤثر بر صفات مدلی را انتخاب می کند که تمام عوامل مؤثر بر صفت لحاظ شوند. به نظر می رسد روش بیزی با کاهش واریانس خطا و افزایش واریانس ژنتیکی وراثت پذیری مستقیم را دقیق تر برآورد می کند و روش قدرتمندتری است.

علت نرخ بلوغ سریعتر، زودتر بالغ شده و وزن مجانبی کمتری نسبت به نرهای هم سن خود خواهند داشت. به نظر می رسد برآورد بیشتر نرخ بلوغ در جنس ماده به دلیل نقش هورمون های جنسی باشد. در جنس ماده هورمون های جنسی در سن پایین تر ترشح شده و سبب افزایش نرخ بلوغ و کاهش وزن مجانبی می شود. نتایج واریانس و مولفه های ژنتیکی وزن بلوغ (A) با استفاده از آنالیز تک صفتی و روش های آماری حداکثر درست نمایی (REML) و بیزی در جدول ۴ ارائه شده است. پارامتر A در منحنی های رشد گو سفند، نماینده وزن بلوغ یا مجانبی می باشد. حد مجانبی، زمانی که سن (t) به سمت بی نهایت نزدیک می شود تخمینی از سنگین ترین وزن حاصله توسط دام نیست و در واقع آن یک میانگین وزن مجانبی است (۱۱). وراثت پذیری مستقیم وزن بلوغ در روش آماری REML و بیزی در مدل حیوانی ۱ بزرگتر از مقادیر آن در سایر مدل ها برآورد گردید. در مدل ۱ به دلیل اینکه تنها اثر ژنتیکی خود حیوان وجود دارد، مولفه های واریانس نسبت داده شده به سایر آثار تصادفی، در مولفه واریانس ژنتیکی افزایشی ظهور پیدا کرده و باعث برآورد بالاتر مقدار وراثت پذیری

جدول ۴- پارامترهای ژنتیکی وزن بلوغ (A) گو سفندان زندی با استفاده از روش حداکثر درست نمایی (REML) و بیزی
Table 4- Genetic parameters for Growth rate maturity rate (A) using REML and Bayesian method Zandi sheep

روش آماری Statistical method	مدل Model	وراثت پذیری مستقیم Direct heritability	نسبت واریانس محیطی به فنوتیپی Proportion of environmental variance to phenotypic variance	وراثت پذیری مادری Maternal heritability	ram	Log L /RSS	معیار آکائیک AIC
حداکثر درست نمایی محدود شده REML	1	0.16±0.05	-	-	-	-2180.620	4363.24
	2	0.13±0.05	0.08±0.05	-	-	-2179.176	4362.35
	3	0.09±0.05	-	0.11±0.05	-	-2178.190	4360.38
	4*	0.064±0.02	-	0.06±0.07	0.98	-2177.072	4358.144
	5	0.09±0.04	••	0.11±0.08	-	-2178.190	4362.38
	6	0.064±0.06	••	0.06±0.11	0.99	-2177.072	4360.15
بیزی Bayesian	1	0.18±0.0005	-	-	-	12.3	-5410.92
	2	0.15±0.0004	0.08±0.0002	-	-	11.46	-5475.48
	3	0.09±0.0001	-	0.08±0.0002	0.34	11.76	-5444.79
	4	0.14±0.0003	-	0.12±0.0001	-	11.34	-5487.83
	5*	0.14±0.0003	0.03±0.0001	0.08±0.0001	-	11.06	-5516.08
	6	0.14±0.0003	0.03±0.0004	0.10±0.0001	0.12	11.09	-5512.39

*: مدل مناسب، r_{am} : همبستگی ژنتیکی مستقیم و مادری، Log L: لگاریتم تابع درست نمایی و واریانس، RSS: مجموعه مربعات باقیمانده.

* Best model, r_{am} : Direct and maternal genetic correlation, Log L: Log Likelihood, RSS: Sum of Squares Residuals.

نبود. در مطالعات دیگری مقادیر وراثت پذیری مستقیم وزن بلوغ برای گو سفندان نژاد سافولک، اسکاتیش بلک فیس و چیوس ۱، به ترتیب 0.036 ، 0.032 و 0.030 گزارش شد که بیشتر از دامنه مقادیر پژوهش حاضر بود (۱۸، ۱۹ و ۲۲) احتمالاً تفاوت مشاهده شده در تخمین پارامترهای ژنتیکی وزن بلوغ در مطالعات مختلف به دلیل تفاوت در

قوی حسین زاده (۱۲) در پژوهشی، وراثت پذیری مستقیم پارامتر A را 0.13 گزارش نمود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت. حجتی و همکاران (۱۳)، ساقی و همکاران (۱۷) و آبگاز و همکاران (۱) مقدار وراثت پذیری مستقیم پارامتر A را به ترتیب 0.29 ، 0.33 و 0.29 گزارش کردند که در دامنه مقادیر برآورد شده پژوهش حاضر

بیان ژن‌های مؤثر بر صفات مورد بررسی در سنین مختلف و یا حذف برخی از افراد جامعه باشد (۲۳).

شیب منحنی رشد غیر خطی با پارمتر نرخ بلوغ (K) در مدل‌های رشد بیان می‌شود و تخمینی از نرخ رسیدن به مقدار مجانبی منحنی رشد می‌باشد و نشان دهنده نرخ بلوغ پس از تولد می‌باشد. مولفه‌های ژنتیکی پارمتر K در جدول ۶ ارائه شده است. مقدار بالای نرخ بلوغ یا شیب منحنی رشد، نشان دهنده بلوغ زودرس دام است (۳۱). براساس شاخص AIC مدل مناسب برای پارمتر نرخ بلوغ در هر دو روش REML و بیزی مدل ۶ بود. مقدار وراثت‌پذیری مستقیم در روش‌های REML و بیزی به ترتیب 0.16 ± 0.07 و 0.18 ± 0.06 برآورد شد. مقدار وراثت‌پذیری مستقیم این صفت در روش بیزی بالاتر برآورد شد. روش بیزی با کاهش میزان واریانس خطا، دقت آزمایش را افزایش می‌دهد (۱۰). آبگاز و همکاران (۱) و ساقی و همکاران (۲۷) در مطالعات جداگانه‌ای بر روی گوسفندان هورو اتیوپی و بلوچی وراثت‌پذیری نرخ بلوغ را به ترتیب 0.14 و 0.10 گزارش کردند که از وراثت‌پذیری برآورد شده در این پژوهش کمتر بود. در پژوهش‌های دیگری، وراثت‌پذیری مستقیم پارمتر K در گوسفندان نژاد مهربان و شال به ترتیب 0.45 و 0.19 گزارش شد که از مقدار برآورد شده در این تحقیق بیشتر بود (۸ و ۱۲). تفاوت در مقادیر وراثت‌پذیری نرخ بلوغ در تحقیقات مختلف می‌تواند به دلیل شرایط زیست محیطی، وضعیت چرای گوسفندان و مدیریت در طی سال‌های جمع‌آوری داده‌ها باشد (۱).

نژاد مورد بررسی، میزان دسترسی به علوفه برای چرا در سال‌های مختلف، شرایط آب و هوایی متغیر، تغییرات در مدیریت گله‌ها، تعداد متفاوت رکورد، تفاوت در ساختار داده‌ها، نوع مدل و روش آماری مورد استفاده برای آنالیز باشد.

اجزای واریانس پارمتر B در جدول ۵ ارائه شده است. براساس کمترین مقدار شاخص اطلاعات اکائیک، مدل‌های ۶ و ۵ به ترتیب در روش REML و بیزی به عنوان مدل مناسب جهت برآورد اجزای واریانس و کوواریانس برگزیده شد. در هر دو مدل مناسب، علاوه بر ژنتیک خود حیوان، ژنتیک مادری و محیط دائمی مادری مؤثر می‌باشد. مقدار وراثت‌پذیری مستقیم در روش REML (0.17 ± 0.07) و بیزی (0.16 ± 0.05) نزدیک به هم برآورد شد. وراثت‌پذیری مستقیم پارمتر B در مطالعه حاضر در دامنه سایر مطالعات ($0.20 - 0.16$) بوده و با آن همخوانی داشت (۱، ۹، ۲۷). وراثت‌پذیری مادری و نسبت واریانس محیطی به فنوتیپی پارمتر نرخ رشد در روش REML به ترتیب 0.12 ± 0.06 و 0.09 ± 0.03 و در روش بیزی به ترتیب 0.07 ± 0.03 و 0.01 ± 0.04 برآورد شد. سهم تأثیرات ژنتیکی و محیطی دائمی مادری در پارمتر نرخ رشد پایین است، این امر نشان می‌دهد با توجه به اینکه در نرخ رشد اثرات مادری مؤثر هستند ولی اثر آن کم است و بیشتر تحت تأثیر ژنتیک خود حیوان، محیط و تغذیه است. تفاوت در مقادیر وراثت‌پذیری مستقیم حیوان برای پارمترهای منحنی رشد، می‌تواند به دلیل عوامل متعددی مانند ماهیت متفاوت مدل‌ها، وجود یا عدم وجود عوامل مادری، تفاوت در

جدول ۵- پارامترهای ژنتیکی نرخ رشد (B) گوسفندان زندی با استفاده از روش حداکثر درستنمایی (REML) و بیزی

Table 5- Genetic parameters for growth rate and maturity rate using REML and Bayesian method Zandi sheep

روش آماری Statistical method	مدل Model	وراثت‌پذیری مستقیم Direct heritability	نسبت واریانس محیطی به فنوتیپی Proportion of environmental variance to phenotypic variance	وراثت‌پذیری مادری Maternal heritability	ram	Log L /RSS	معیار آکائیک AIC
حداکثر درست نمایی محدود شده REML	1	0.13 ± 0.05	-	-	-	93.117	-188.23
	2	0.13 ± 0.05	0.01 ± 0.05	-	-	93.117	-190.234
	3	0.13 ± 0.05	-	-	-	93.116	-190.232
	4	0.17 ± 0.07	-	0.03 ± 0.08	-0.756	93.537	-191.074
	5	0.13 ± 0.05	0.02 ± 0.08	-	-	93.117	-192.234
	6 ¹	0.17 ± 0.07	0.03 ± 0.09	0.16 ± 0.12	-0.99	93.657	-193.14
بیزی Bayesian	1	0.17 ± 0.0003	-	-	-	0.24	-9829.47
	2	0.13 ± 0.0001	0.03 ± 0.0006	-	-	0.24	-9831.79
	3	0.14 ± 0.0001	-	0.01 ± 0.0002	-	0.24	-9798.11
	4	0.12 ± 0.0001	-	0.01 ± 0.0002	0.022	0.25	-9776.80
	5 ¹	0.16 ± 0.005	0.04 ± 0.0001	0.03 ± 0.0007	-	0.23	-9861.02
	6	0.17 ± 0.005	0.04 ± 0.0001	0.04 ± 0.0003	-0.67	0.23	-9860.52

۱: مدل مناسب، ram: همبستگی ژنتیکی مستقیم و مادری، Log L: لگاریتم تابع درستنمایی و واریانس، RSS: مجموعه مربعات باقیمانده.

¹ Best model, ram: Direct and maternal genetic correlation, Log L: Log Likelihood, RSS: Sum of Squares Residuals.

جدول ۶- پارامترهای ژنتیکی نرخ بلوغ (K) گوسفند نژاد زندی با استفاده از روش حداکثر درستنمایی (REML) و بیزی

Table 6- Genetic parameters for growth rate and maturity rate using REML and Bayesian method Zandi sheep

روش آماری Statistical method	مدل Model	وراثت‌پذیری مستقیم Direct heritability	نسبت واریانس محیطی به فنوتیپی Proportion of environmental variance to phenotypic variance	وراثت‌پذیری مادری Maternal heritability	ram	Log L /RSS	معیار آکائیک AIC
حداکثر درست نمایی محدود شده REML	1	0.16±0.05	-	-	-	1434.448	-2870.89
	2	0.13±0.05	0.05±0.05	-	-	1434.919	-2870.838
	3	0.15±0.06	-	0.03±0.04	-	1434.692	-2873.384
	4	0.17±0.07	-	0.06±0.07	-0.30	1434.741	-2873.482
	5	0.15±0.06	0.05±0.07	-	-	1434.918	-2875.836
	6 ¹	0.16±0.07	0.05±0.09	0.006±0.11	-0.58	1434.985	-2875.97
بیزی Bayesian	1	0.23±0.0001	-	-	-	0.023	-12968.32
	2	0.16±0.0003	0.06±0.0001	-	-	0.023	-12966.32
	3	0.15±0.0004	-	0.04±0.0008	-	0.0241	-12911.68
	4	0.17±0.0004	-	0.05±0.0004	-0.217	0.0237	-12930.64
	5	0.16±0.0005	0.04±0.0005	0.04±0.0001	-	0.0230	-12969.50
	6 ¹	0.18±0.0006	0.04±0.0001	0.04±0.0005	-0.479	0.0228	-12979.94

¹: مدل مناسب، ram: همبستگی ژنتیکی مستقیم و مادری، Log L: لگاریتم تابع درستنمایی و واریانس، RSS: مجموعه مربعات باقیمانده.

¹ Best model, ram: Direct and maternal genetic correlation, Log L: Log Likelihood, RSS: Sum of Squares Residuals.

تری نسبت به حیوانات با وزن بلوغ کمتر دارند (۹). همبستگی منفی بین وزن بلوغ و نرخ بلوغ، به این معنی است که با افزایش نرخ بلوغ، وزن بلوغ کاهش می‌یابد؛ بنابراین حیوانات زودرس نسبت به حیواناتی که دیرتر به سن بلوغ می‌رسند، در بزرگسالی وزن کمتری دارند. همبستگی فنوتیپی و باقیمانده بین پارامتر A و B ضعیف تخمین زده شد؛ این همبستگی‌ها تنها در بین نرخ رشد و نرخ بلوغ مثبت و بالا بود. به عبارت دیگر حیوانات با وزن بلوغ بالا به طور کلی نرخ رشد بالاتری نسبت به حیوانات با وزن بلوغ کمتر دارند. احتمالاً به دلیل شرایط محیطی (نوع چرا، شرایط آب و هوایی و مدیریت)، عوامل ژنتیکی نتوانستند اثرات خود را بر فنوتیپ حیوان اعمال کنند. بطاعی و همکاران (۸) در پژوهشی روی گوسفندان مهربان، همبستگی ژنتیکی بین نرخ رشد و نرخ بلوغ را ۰/۹۵ گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی نزدیکی داشت، ولی همبستگی ژنتیکی وزن بلوغ با نرخ رشد و نرخ بلوغ در گوسفندان مهربان به ترتیب ۰/۱۲، ۰/۴- بود. آگاز و همکاران (۱) همبستگی ژنتیکی را در گوسفندان هورو بین وزن بلوغ و نرخ رشد ۰/۳۹ و وزن بلوغ با نرخ بلوغ ۰/۰۷- و بین نرخ رشد و نرخ بلوغ ۰/۲۵ گزارش کردند، که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. تفاوت در همبستگی‌های گزارش شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار ژنتیکی حیوانات

نتایج همبستگی‌های ژنتیکی، فنوتیپی و باقیمانده بین پارامترهای منحنی رشد در جدول ۷ نشان داده شده است. همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی بین پارامترهای A و B به ترتیب ۰/۳۲۳ و ۰/۰۰۷ برآورد شد. همبستگی ژنتیکی متوسط و مثبت بین پارامتر A و B بیانگر این نکته می‌باشد که وزن بلوغ می‌تواند بطور ژنتیکی مثبت و همبسته با نرخ رشد بعد از تولد باشد. این همبستگی مثبت نشان می‌دهد که پتانسیل ژنتیکی برای نرخ بلوغ بستگی به نرخ رشد دارد و رابطه مثبتی با رشد اولیه دارد (۱). به عبارت دیگر، همبستگی ژنتیکی مثبت بین پارامترهای A و B نشان می‌دهد که میش‌های سنگین در هنگام تولد، وزن بلوغ بالاتری خواهند داشت. براساس جدول ۵ همبستگی فنوتیپی بین پارامترهای وزن بلوغ و نرخ رشد ناچیز می‌باشد؛ بنابراین تغییرات فنوتیپی یکی از این پارامترها، دیگری را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۱۲). همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی پارامتر نرخ رشد (B) و نرخ بلوغ (K) به ترتیب ۰/۸۰ و ۰/۷۴ برآورد شد. همبستگی ژنتیکی و فنوتیپی بین پارامتر A و K منفی و متوسط برآورد شد. ارتباط بیولوژیکی مهمی بین پارامترهای وزن بلوغ و نرخ بلوغ در مدل‌های منحنی رشد وجود دارد. رابطه منفی بین این دو پارامتر نشان‌دهنده این است که دام‌های با وزن بلوغ کمتر، زودتر نیز بالغ خواهند شد. به عبارت دیگر حیوانات با وزن بلوغ بالا به طور کلی نرخ رشد پایین

مورد بررسی و شرایط محیطی و روش برآورد پارامترها باشد.

جدول ۷- همبستگی ژنتیکی، محیطی و فنوتیپی پارامترهای منحنی رشد گوسفند زندی

Table 7- Correlation genetic, environmental and phenotypic parameters of growth curves Zandi sheep			
پارامترها Parameters	همبستگی ژنتیکی Genetic correlation	همبستگی باقیمانده Residual correlation	همبستگی فنوتیپی Phenotypic correlation
AB	0.323	-0.053	0.007
BK	0.803	0.732	0.743
AK	-0.429	-0.296	-0.184

نتیجه گیری کلی

با توجه به وراثت پذیری پایین پارامترهای منحنی رشد گوسفند نژاد زندی، می توان نتیجه گرفت که عوامل محیطی از قبیل سطح تغذیه، بیماری، دما و استرس های محیطی نقش بسیار مهمی ایفا

می کنند. به عبارت دیگر این عوامل به شدت پتانسیل ژنتیکی رشد دام را محدود می کنند. پارامترهای منحنی رشد تحت تأثیر ژنتیک مستقیم دام و تأثیرات مادری (ژنتیکی و محیط دائمی مادری) قرار دارند، بنابراین در نظر گرفتن تأثیرات مادری در ارزیابی ژنتیکی گوسفند زندی ضروری است.

منابع

1. Abegaz, S., J. B. Van Wyk, and J. J. Olivier. 2010. Estimation of genetic and phenotypic parameters of growth curve and their relationship with early growth and productivity in Horro sheep. Archives Animal Breeding, 53(1): 85-94.
2. Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. In Selected Papers of Hirotugu Akaike (pp. 215-222). Springer, New York, NY.
3. Akaike, H. 1983. Information measures and model selection. Proceedings of the 44th session of the international statistical institute, 1: 277-291.
4. Arzani, H., J. Motamedi, A. Nikkhah, H. Azrinvand and M. GHorbani. 2013. Animal Unit Equivalent (AUE) and daily requirement energy for Torki Ghashghaei breed sheep grazing on rangelands of Fars Province . Iranian Journal of Range and Desert Research, 20(3): 433-444. (In Persian).
5. Bahreini Behzadi, M. 2015. Comparison of different growth models and artificial neural network to fit the growth curve of Lori-Bakhtiari sheep. Journal of Ruminant Research, 3(2): 125-148. (In Persian).
6. Bahreini Behzadi, M. R., A. A. Aslaminejad, A. R. Sharifi, and H. Simianer. 2014. Comparison of Mathematical Models for Describing the Growth of Baluchi Sheep. Journal of Agricultural Science and Technology, 16(1): 57-68.
7. Bassam, B. J., and G. Caetano-Anolles. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Applied biochemistry and biotechnology, 42(2-3):181-188.
8. Bathaei, S., and P. Leroy. 1998. Genetic and phenotypic aspects of the growth curve characteristics in Mehraban Iranian fat-tailed sheep. Small Ruminant Research, 29(3): 261-269.
9. Da Silva, L. S. A., A. B. Fraga, F. D. L. Da Silva, P. M. G. Beelen, R. M. D. O. Silva, H. Tonhati and C. D. C. Barros. 2012. Growth curve in Santa Ines sheep. Small Ruminant Research, 105(1-3): 182-185.
10. Deimi Ghias Abadi, P., S. Alijani, J. Shodja Ghias, and N. Pirani. 2013. Comparison of Tow Restricted Maximum Likelihood (REML) and Bayesian Statistical Methods for Estimating Genetic Parameter of Some Economically Important Traits in Fars Native Chickens. Research on Animal Production (Scientific and Research), 3:1-13. (In Persian)
11. Garnero, A. D. V., C. R. Marcondes, R. J. Gunski, H. N. Oliveira, and R. B. Lobo. 2006. Genetic trends in the expected progeny difference of the asymptotic weight of Nelore females. Genetics and Molecular Biology, 29(4): 648-652.
12. Ghavi Hossein-Zadeh, N. 2015. Bayesian estimates of genetic relationships between growth curve parameters in shall sheep via Gibbs sampling. Iranian Journal of Applied Animal Science, 5(4): 897-904.
13. Hojati, S. F., and N. Ghavi Hoseinzadeh. 2016. Genetic and phenotypic relationships between growth curve parameters in Mehraban sheep. Journal of animal production, 18(4): 687-696. (In Persian).
14. Hosseinpour mashhadi, M., M. Elahi Torshizi, and Sh. Ehtesham Gharaee. 2017. Description of Growth Curve in Male and Female Lambs of Baluchi Breed by Application of Nonlinear Growth Model. Journal of research on animal production, 8(15): 155-160. (In Persian).
15. Jasori, M., S. Alijani, N. Pirany, M. Baghernejad, and R. Jafarzadeh. 2011. EstimationOf genetic parameters of

- Holstein dairy cattle using Bayesian procedure. 4th Iranian Animal Science Congress. Tehran, Iran. pp: 3022-3025
16. Kopuzlu, S., E. Sezgin, N. Esenbuga, and O. C. Bilgin. 2014. Estimation of growth curve characteristics of Hemsin male and female sheep. *Journal of applied animal research*, 42(2):228-232.
17. Kume, K., and L. Hajno. 2011. Study of growth curve variations for kids 0-6 months old of Alpine goat breed in Albania. *Archiva zootechnica*, 13: 54-62.
18. Lambe, N. R., E. A. Navajas, G. Simm, and L. Bunger. 2006. A genetic investigation of various growth models to describe growth of lambs of two contrasting breeds. *Journal of Animal Science*, 84(10): 2642-2654.
19. Lewis, R. M., G. C. Emmans, W. S. Dingwall, and G. Simm. 2002. A description of the growth of sheep and its genetic analysis. *Animal Sciences*, 74(1): 51-62.
20. Malhado, C. H. M., P. L. S. Carneiro, P. R. A. M. Affonso, A. A. O. Souza, and J. L. R. Sarmento. 2009. Growth curves in Dorper sheep crossed with the local Brazilian breeds, Morada Nova, Rabo Largo, and Santa Inês. *Journal of Small Ruminant Research*, 84:1.16-21.
21. Mandal, A., R. Roy, and P. K. Rout. 2008. Direct and maternal effects for body measurements at birth and weaning in Muzaffarnagari sheep of India. *Small Ruminant Research*, 75(2-3):123-127.
22. Mavrogenis A. P., and A. Constantinou. 1990. Relationships between pre-weaning growth, post-weaning growth and mature body size in Chios sheep. *Animal Production*, 50(2): 271-275.
23. Maxa, J., E. Norenberg, P. Berg, and M. Milerski. 2007. Genetic parameters for body weight, longissimus muscle depth and fat depth for Suffolk sheep in the Czech Republic. *Small Ruminant Research*, 72(2-3): 87-91.
24. Meyer, K. 2006. WOMBAT-A program for mixed model analyses by restricted maximum likelihood. User notes. (Animal Genetic and Breeding Unit. In University of New England: Armidale) Meyer K, Graser HU.
25. Mohamadi, H., M. Moradi Shahrabak, and M. Sadeghi. 2011. Estimation genetic, environmental and phenotypic trends of growth traits in Zandi sheep. *Modern genetics journal*, 6(2): 49-57.
26. Rashedi, A., J. Fayyazi, A. Masoodi, and R. Abdolahi. 2018. Genetic analysis of growth curve parameters obtained by nonlinear functions in Moghani sheep using Bayesian approach. *Journal of Animal Science Researches*, 28(3): 113-126.
27. Saghi D. A., A. Aslaminejad, M. Tahmoorespur, H. Farhangfar, M. Nassiri, and G. R. Dashab. 2012. Estimation of genetic parameters for growth traits in Baluchi sheep using Gompertz growth curve function. *Indian Journal of Animal Sciences*, 82(8): 889-892.
28. Sargolzaei, M., and M. A. Edriss. 2004. Estimation of phenotypic, genetic and environmental trends of some of the growth traits in Bakhtiari sheep. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 8(1): 125-133.
29. SAS Institue. 2003. SAS /STAT Users Guide: Statistics. Release 8. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
30. Sghaier, N., A. Gaddour, O. Mabrouk, A. Mouldi, and B. H. Mohamed. 2007. Non genetic factors affecting local kid' s growth curve under pastoral mode in Tunisian arid region. *Journal of Biological Science*, 7: 1005-1016.
31. Taylor, G. 1975. Spanish versus angora in controlling browse. Pp 16-17. Presentation at the Spanish Goat Conference, San Angelo, TX. Texas A&M Res. and Ext. Center.
32. Topal, M., M. Ozdemir, V. Aksakal, N. Yildiz, and U. Dogru. 2004. Determination of the best nonlinear function in order to estimate growth in Morkaraman and Awassi lambs. *Small Ruminant Research*, 55(1-3):229-232.
33. Van Tassell, C. P., and L. D. Van Vleck. 1995. A Manual for Use of MTGSAM. A Set of FORTRAN Programs to Apply Gibbs Sampling to Animal Models for Variance Component Estimation [DRAFT]. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.



Estimation of genetic and phenotypic parameters of logistic growth curve and their inter-relationship in Zandi Sheep

Saeid Neysi¹, Hedayatollah Roshanfekar^{2*}, Jamal Fayazi³, Morteza Mamouei²

Submitted: 26-09-2019

Accepted: 19-10-2020

Neysi, S., H. Roshanfekar, J. Fayazi, and M. Mamouei. 2021. Estimation of genetic and phenotypic parameters of logistic growth curve and their inter-relationship in Zandi Sheep. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):441-451.

Introduction Growth, defined as changes of body weight over time, is an economically important trait in sheep that directly determines meat production. Increase in live weight or dimension against age has been described as growth. Changes in live weight or dimension for a period of time are explained by the growth curves. Animal breeders are interested in the genotypic and phenotypic relationships during all phases of growth. Knowledge of genotypic and phenotypic relationships among live weights, degree of maturity and growth rate during all phases of growth is necessary to formulate breeding programs to improve lifetime efficiency. Growth models are mathematical functions which are applied for describing the growth pattern. Understanding, estimating, and capturing the defining characteristics of growth processes are key components of developmental research. The aim of the present study was to estimate the genetic parameters for growth traits in Zandi sheep, by determining the most appropriate animal models to be fitted. In addition, genetic, phenotypic and environmental correlations between traits were estimated.

Materials and Methods The data used in this study were obtained from the Animal Breeding Center of Iran. The data were screened several times to remove the defective and out of range records. Growth curve parameters used in study were asymptomatic mature weight (A), Growth rate (B) and maturity rate (K). The procedure of SAS software was used for studying of fix effects. Based on body weight at different ages and using different initial values, each of the growth curve parameters was estimated using SAS software version 9.1 and NLIN procedure. Estimation of (co)variance components of growth curve parameters was conducted using Bayesian approach implemented in MTGSAM and Wombat software. The number of Gibbs sampling rounds used was 200,000 rounds. Ten percent of these numbers (20,000 rounds) was burn-in. The convergence criterion for stopping repetitions in this analysis was also considered as 10 decimals (10⁻¹⁰). Sampling intervals of 200 and Gouss-Seidel 10000 repetitions were considered. In order to find the best model incorporating the constant and random effects affecting each of the parameters of the growth pattern, the following models, with and without regard to maternal effects including maternal additive genetic effects and permanent maternal environmental effects in the model (Meyer's models) were tested.

1- MSc student, Department of Animal Science, University of Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources, Khuzestan, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science, University of Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources, Khuzestan, Iran.

3- Associate Professor, Department of Animal Science, University of Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources, Khuzestan, Iran.

(*-Corresponding author email: roshanfekar_hd@yahoo.com)

DOI:10.22067/ijasr.v13i3.81528

Results and Discussion Environmental factors such as year of birth and sex of lamb showed significant influence on growth curve parameters (A, B and k) in Zandi sheep. Estimates of direct heritability is based on best models using REML and Bayesian methods for A, B and K were 0.064 and 0.14, 0.17 and 0.16, 0.16 and 0.18 respectively. Maternal heritability was in range of 0.006 - 0.08 and Proportion of environmental variance to phenotypic variance in range of 0.03 - 0.05 parameters growth curve. Among the growth curve parameters, only A and k have biological interpretation and therefore ,relationship between them may provide necessary conclusions. Estimates of direct genetic correlation between growth curve parameters were 0.323, -0.429 and 0.803 between A-B, A-K and B-K, respectively. The positive and high genetic correlation between A and B parameters is evident as expected for common genetic and physiological mechanisms controlling these traits. Positive genetic correlation between these traits suggests that selection in one parameter of the growth curve would also improve the other parameter. Residual correlations between growth curve parameters varied form -0.296 (between A-K) to 0.732 (between B-K). Phenotypic correlations between growth curve parameters varied form -0.184 (between A-K) to 0.743 (between B-K). The phenotypic and genetic antagonism between A and k indicates that rapid reduction in growth rate after inflexion point results in lower mature weights. This finding would be helpful for improving selection by identifying the animal who reaches inflexion point earlier and attend higher mature weights later.

Conclusion Current genetic estimates for growth curve parameters in Zandi sheep could be applied in designing selection program in this breed. The low estimates of heritability for A, B and K parameters could be assigned to the high phenotypic variance arising from large environmental variation. This therefore implies that much of the improvement in these growth curve parameters could be obtained by improvement of environment rather than genetic selection. It is important to provide good environmental conditions along with optimal management strategies in the flock to achieve a desired shape of growth curve through changing the parameters of model.

Key words: Bayesian, correlation, Growth rate, Heritability, Restricted maximum likelihood.



مقاله علمی - پژوهشی

مقایسه روش‌های تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) در بررسی ساختار جمعیتی نژادهای اسب آخال تکه، عرب و کاسپین با استفاده از اطلاعات ژنومی

نسرین بابائی^۱، سید عباس رافت^۲، محمدحسین مرادی^{۳*}، محمدرضا فیضی درخشی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۷

بابائی، ن.، س. ع. رافت، م. ح. مرادی، و م. ر. فیضی درخشی. ۱۴۰۰. مقایسه روش‌های تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) در بررسی ساختار جمعیتی نژادهای اسب آخال تکه، عرب و کاسپین با استفاده از اطلاعات ژنومی. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۵۳-۴۶۲.

چکیده

ابداع روش‌های تعیین ژنوتیپ با توان بالا و مقرون به صرفه طی سالیان اخیر، امکان ارزیابی ساختار ژنتیکی و ارتباط میان جمعیت‌های یک گونه را با استفاده از اطلاعات ژنومی فراهم ساخته است. بررسی ساختار جمعیتی بر اساس نشانگرهای گسترده در سطح ژنوم، اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با روابط تکاملی و دسته‌بندی زیرجمعیت‌ها فراهم می‌کند. هدف از این تحقیق مقایسه دو روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) در بررسی ساختار و روابط بین جمعیتی سه نژاد اسب موجود در منطقه خاورمیانه شامل آخال تکه، عرب و کاسپین بود. به این منظور از داده‌های ژنومی بدست آمده از آرایه‌های Illumina 50K SNP Beadchip در ۶۱ نمونه از این نژادها استفاده شد. این تحقیق با همکاری پروژه کنسر سیوم تنوع ژنتیکی اسب (EGDC) انجام شد و کدهای مورد نیاز برای آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار R تهیه شدند. نتایج حاصل نشان داد که در هر دو روش ۱۰/۸ درصد واریانس توسط دو مؤلفه اول توجیه می‌شود و هر دو روش سه جمعیت را جدا از هم خوشه‌بندی کردند. معیار ارزیابی تعداد بهینه خوشه‌بندی برای روش DAPC، معیار اطلاعات بیزی (BIC) بود که تعداد $K=3$ بهترین نتیجه را با کمترین BIC نشان داد. روش DAPC نسبت به روش PCA با نتایج بهتری همراه بود. در تعیین شمار بهینه K بهتر از روش PCA عمل کرد و تصویر بهتری از ارتباط بین افراد ارائه داد. همچنین در انتساب افراد به گروه‌های خود هر دو روش صحت بسیار خوبی ارائه دادند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد با وجود اینکه نتایج تحقیقات گذشته این سه جمعیت را که مربوط به منطقه خاورمیانه هستند در یک خوشه از درخت همسایگی قرار می‌دهند، ولی با توجه به نتایج این پژوهش و با استفاده از روش‌های مورد استفاده در این تحقیق، سه نژاد به صورت مجزا گروه‌بندی می‌شوند و DAPC می‌تواند تصویر بهتری از روابط بین جمعیتی در نژادهای اسب ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: روش‌های DAPC و PCA، ساختار جمعیتی، نژادهای اسب خاورمیانه، نشانگرهای SNP.

مقدمه

ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات

حیوان - ات و گیاه - ان بومی به عنوان سه - سرمایه ملی و ذخایر راهبردی هر کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آن‌ها از

۴- دانشیار گروه کامپیوتر، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
(Email: Moradi.hosein@gmail.com) * نویسنده مسئول:
DOI:10.22067/ijasr.0621.39343

۱ و ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و همچنین نسبت به بسـیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (۱ و ۱۱). حفاظت از ذخایر ژنتیکی بومی و مدیریت مؤثر این منابع ژنتیکی در دام‌های اهلی مبتنی بر مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی (۹) و شناخت ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها (۸) است. تعریف ساختار جمعیتی یک گونه برای حفاظت از یکپارچگی و هویت نژادی یک گونه مهم است و یک پیش‌شرط برای مدیریت منابع ژنتیکی محسوب می‌شود (۲۴ و ۲۹). استنتاج ساختار جمعیتی، در مدیریت مؤثر منابع ژنتیکی در نژادهای بومی (۸) و به دست آوردن دیدگاهی درباره تاریخچه و سیر تکامل جوامع ضروری است. علاوه بر این معین کردن ساختارهای جمعیتی و اختصاص افراد به جمعیت‌های مربوط به خود در مطالعات پویس پیوستگی ژنومی (Genome wide association study) می‌تواند در کاهش ارتباط‌های کاذب مؤثر باشد (۲۲).

اسب یکی از کهن‌ترین گونه‌هایی است که در دشت‌های اوراسیا در حدود ۶۰۰۰-۵۰۰۰ سال قبل اهلی شده است (۱۷) و از نظر پراکنش جغرافیایی تقریباً در تمام سرزمین‌هایی که انسان در آن گام نهاده است این حیوان نیز در کنار او حضور داشته است. اسب دارای پراکنش جهانی است ولی با توجه به شرایط جغرافیایی خاص هر منطقه و کشور، نژادهای مقاوم به شرایط هر منطقه نیز شکل گرفته است. بر اساس آمارها بیش از ۵۰۰ نژاد برای این گونه دامی در سراسر جهان گزارش شده است (۱۷). شناخت ساختار ژنتیکی و روابط موجود میان نژادهای مختلف این گونه ارزشمند، می‌تواند در اولویت‌بندی برنامه‌های حفاظت ژنتیکی و اجرای برنامه‌های اصلاح‌نژادی دارای اهمیت باشد. در این تحقیق سه نژاد مهم اسب بومی آسیایی شامل آخال‌تکه، عرب و کاسپین مورد بررسی قرار گرفته است. این نژادها به ترتیب از کشورهای ترکمنستان، کشورهای عربی خاورمیانه و ایران منشأ می‌گیرند، هر چند در سایر کشورهای همجوار نیز پراکنش یافته‌اند.

امروزه اطلاعات حاصل از نشانگرهای SNP در سطح ژنوم به طور گسترده‌ای در مطالعه تنوع ژنتیکی دام‌های اهلی و ساختار جمعیتی استفاده می‌شود (۴ و ۲۷). داشتن ابزاری برای تجزیه و تحلیل ساختار جمعیتی با استفاده از این حجم اطلاعات نشانگری امری لازم است که روش‌های مختلفی برای بررسی ارتباط بین جوامع و قرار دادن افراد در جوامعی که از آن نشأت گرفته‌اند پیشنهاد شده است. روش‌های پرشماری برای تعیین ساختار ژنتیکی و لایه‌بندی جمعیت وجود دارد. یکی از شیوه‌های آماری برای آزمون ارتباط بین جمعیت‌ها و اختصاص افراد به آن‌ها با استفاده از ماتریس فاصله، استفاده از تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA: Principal Component Analysis) است (۸) که قادر به تعیین ساختار جمعیتی می‌باشد (۱۵). تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی توسط پیرسون در سال ۱۹۰۱ پیشنهاد شد (۱۶). پایه کار این روش به این صورت است که در

صفحه‌ی مختصات محورهای اصلی X و Y را طوری تغییر می‌دهد که مسیری در فضا پیدا شود تا مؤلفه‌های اصلی مربوط به داده‌ها در طول آن مسیر قرار گیرند. هر محوری که بزرگتر باشد نشان‌دهنده آن است که واریانس بیشتری در میان داده‌ها در این جهت است و به همین دلیل آن را نخستین مؤلفه‌ی اصلی گویند. هدف از تجزیه مؤلفه‌های اصلی آن است که واریانس موجود در داده‌های چندمتغیره را به مؤلفه‌هایی تجزیه کند که نخستین مؤلفه تا آنجا که ممکن است علت بیشترین واریانس موجود در داده‌ها باشد. دومین مؤلفه علت بیشترین واریانس ممکن پس از مؤلفه‌ی اول و الی آخر باشد (۱۶). تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC: Discriminant Analysis of Principal Components) روش چند متغیره است که برای شناسایی و توصیف خوشه‌های افرادی که به طور ژنتیکی با هم ارتباط دارند، طراحی شده است. این روش زمانی که گروه‌های پیشین وجود ندارند، k-means پی در پی و انتخاب مدل را برای استنباط ژنتیکی خوشه‌ها استفاده می‌کند. تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی منجر به استخراج اطلاعات غنی از داده‌های ژنتیکی شده و انتساب دام‌ها به جمعیت را فراهم می‌کند. این رویکرد سریع‌تر از روش‌های خوشه‌بندی بیزی بوده و با طیف وسیعی از داده‌ها قابل اجراست (۵). یکی از مزایای DAPC سازگارپذیری بالای آن است. در واقع DAPC بر مدل ژنتیک جمعیت خاصی وابسته نیست و در نتیجه فرض تعادل هاردی واینبرگ و تعادل پیوستگی (لینکاژی) ندارد. به این ترتیب برای انواع موجودات صرف‌نظر از پلوئیدی بودن و نرخ نوترکیبی آن‌ها، کاربرد دارد (۵ و ۶).

هدف این تحقیق بررسی ساختار جمعیتی اسب‌های آخال‌تکه، عرب و کاسپین موجود در منطقه خاورمیانه با استفاده از داده‌های Illumina 50K SNP Beadchip و جداسازی این جمعیت‌ها با روش‌های تجزیه مؤلفه اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) بود. این تحقیق با همکاری پروژه کنسرسیوم تنوع ژنتیکی اسب (Equine Genetic Diversity Consortium) انجام شده است. با توجه به پراکنش گسترده سه اسب آخال‌تکه (ترکمن)، عرب و کاسپین در ایران نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه درک بهتر و مدل کردن معماری ژنتیکی نژادهای اسب ایرانی نیز فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ:

در این مطالعه جهت بررسی ساختار جمعیتی برخی از نژادهای اسب آسیایی از اطلاعات ژنومی مجموع ۶۱ حیوان مربوط به نژادهای آخال‌تکه (۱۹ رأس)، عرب (۲۴ رأس) و کاسپین (۱۸ رأس) استفاده شد. داده‌های این تحقیق از پروژه کنسرسیوم تنوع ژنتیکی اسب

Equine Genetic Diversity Consortium) تهیه شد که نحوه جمع‌آوری و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در مقاله (۱۷) ارائه شده است، اما به طور خلاصه نمونه‌های مو یا بافت از حیوانات جمع‌آوری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه‌یافته Pure gene (Qiagen) از بافت انجام شد و حدود ۱ میکروگرم DNA برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. تعیین ژنوتیپ نیز با استفاده از آرایه‌های Illumina SNP50KBead Chip که امکان تعیین ژنوتیپ ۵۲۶۰۳ جایگاه نشانگری SNP را فراهم می‌کند، بر اساس دستورالعمل استاندارد ایلومینا انجام شد.

ویرایش داده‌ها:

در این تحقیق برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در آنالیزهای نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه اعمال شد. ابتدا حیوانات با بیش از ۵٪ ژنوتیپ از دست رفته از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شدند و سپس SNP‌هایی که در مجموع حیوانات دارای فراوانی آلل نادر و نرخ خوانش (درصدی از نمونه‌ها که برای آن نشانگر تعیین ژنوتیپ شده‌اند) به ترتیب کمتر از ۲ درصد و ۹۵ درصد بودند (۱۰)، حذف شدند. در نهایت برای SNP‌های باقی مانده، آن‌هایی که خارج از تعادل هاردی واینبرگ بودند، به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند (۲۶). برای بدست آوردن سطح معنی‌داری در این آزمون از تصحیح

بنفرونی ($\beta = \frac{\alpha}{n}$) استفاده شد. که در این فرمول n تعداد آزمون و همان تعداد نشانگرهای SNP ($n=5000$) و خطای نوع اول $\alpha=0.05$ در نظر گرفته شدند که در نتیجه سطح احتمال معنی‌داری $\beta=10^{-6}$ خواهد شد. باید توجه کرد که هرچند عدم تعادل هاردی واینبرگ در جایگاه‌های مختلف الزاماً نشان‌دهنده خطای تعیین ژنوتیپ نیست و عوامل مختلفی همچون انتخاب، رانش و جهش نیز می‌توانند باعث انحراف از تعادل شوند، با این وجود همانطور که در مقاله Teo et al., (۲۶) به تفسیر بیان شده است انحراف‌های شدید از این تعادل به احتمال زیاد به دلیل خطای تعیین ژنوتیپ و اشتباه در مراحل اتصال پرایمرها در هنگام ژنوتیپ نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌های SNP Chip اتفاق می‌افتد (۱۰). در نهایت اطلاعات ژنوتیپی جهت وارد شدن به مراحل بعدی آنالیز، به فرمت ۰، ۱ و ۲ (سه دسته ژنوتیپ) با نرم‌افزار plink (۱۹) تبدیل شدند.

آنالیزهای آماری

تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA):

هدف از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی آن است که واریانس موجود در داده‌های چند متغیره را به مؤلفه‌هایی تجزیه کند که اولین مؤلفه

اصلی تا آنجا که ممکن است علت بیشترین واریانس موجود در داده‌ها را توجیه کند. دومین مؤلفه نیز به ترتیب بیشترین واریانس ممکن بعد از مؤلفه اول و الی آخر را توجیه نماید. به علاوه در این روش هر مؤلفه مستقل از مؤلفه‌های دیگر است، یعنی بین هر مؤلفه و مؤلفه‌های دیگر همبستگی وجود ندارد. به این منظور، ابتدا ماتریس واریانس-کواریانس متغیرهای مستقل محاسبه می‌شود. سپس بردار و مقدار ویژه این ماتریس محاسبه شده و بر اساس مقادیر ویژه با اندازه بزرگ، بردار ویژه مربوطه به آنها انتخاب و به عنوان ضرایب ترکیب خطی متغیر اصلی جهت تشکیل توابع مؤلفه اصلی استفاده می‌شود بطوریکه این توابع از یکدیگر مستقل باشند. هر کدام از این توابع بخشی از واریانس متغیرهای مستقل را توجیه می‌کنند که خود تعیین‌کننده تعداد توابع مورد نیاز جهت حفظ حداکثری اطلاعات موجود در متغیرهای اصلی و همچنین میزان کاهش ابعاد داده‌ها می‌باشد (۳) در نهایت، با استفاده از این توابع مقدار آنها برای هر یک از مشاهدات محاسبه و از این داده‌های جدید برای تعیین و ترسیم الگو داده‌ها استفاده می‌شود. مراحل مختلف تجزیه‌ی PCA در این تحقیق، در محیط R و با به کارگیری تابع Princomp انجام شد.

بررسی ساختار جمعیت با استفاده از روش تجزیه‌ی چند متغیره تشخیص مؤلفه‌های اصلی (DAPC):

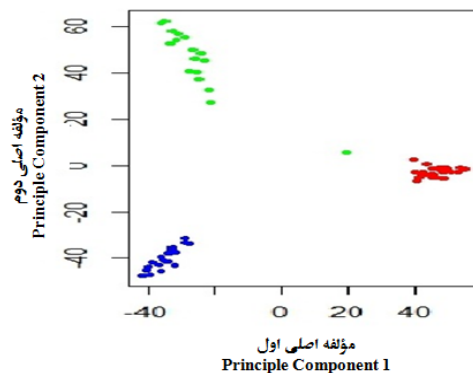
به‌منظور تشخیص تمایز و تنوع ژنتیکی در بین و داخل گروه‌ها، تجزیه‌ی تشخیص مؤلفه‌های اصلی (DAPC) که یک روش پارامتری و غیر مبتنی بر مدل می‌باشد، با بسته آماری adegenet مربوط به نرم‌افزار R اجرا شد. شناسایی تعداد بهینه خوشه با اجرای پی‌درپی و با افزایش K و راه‌حل‌های مختلف خوشه‌بندی در مقایسه با معیار اطلاعات بیزی (BIC: Bayesian Information Criterion) اجرا شد. در عمل بهترین BIC توسط نقطه حداقل در منحنی ارزش BIC به عنوان تابعی از K نشان داده شد. این تابع در آغاز داده‌ها را با PCA تبدیل می‌کند، سپس الگوریتم K-means با افزایش مقادیر K اجرا می‌شود (۵).

نتایج و بحث

مراحل مختلف ویرایش داده‌ها بر روی ۵۲۶۰۳ جایگاه نشانگری SNP در ۶۱ نمونه از نژادهای مختلف اسب اجرا شد. بعد از کنترل کیفیت اولیه، هیچ نمونه‌ای در جریان تعیین ژنوتیپ با بیش از ۵ درصد داده گم شده حذف نشد، مجموع تعداد ۱۱۸۳۰ نشانگر SNP به دلیل فراوانی آللی نادر و سه SNP به دلیل انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ کنار گذاشته شدند. در نهایت، مجموع ۶۱ حیوان با ۴۰۷۷۰ نشانگر SNP مراحل مختلف کنترل کیفیت را با موفقیت گذرانده و برای مراحل بعدی آنالیز داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل مؤلفه‌ی اصلی (PCA)

برای بررسی چگونگی تفکیک نژادها و ارزیابی اختلاف ژنتیکی میان جمعیت‌ها گراف مؤلفه‌های اصلی برای سه جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق ترسیم شد (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ مشاهده

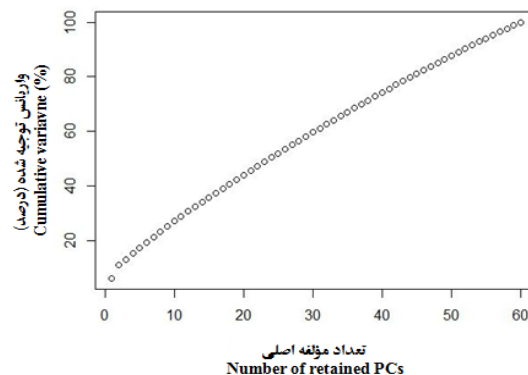


شکل ۱- تجزیه PCA مربوط به سه نژاد اسب مورد مطالعه در این تحقیق بر اساس دو مؤلفه اصلی اول: افراد با نقطه‌های آبی، قرمز و سبز رنگ به ترتیب نشان‌دهنده نژادهای آخال‌تکه، عرب و کاسپین هستند.

Figure 1- PCA analysis based on the first two principal components in the three horse breeds investigated in this study: individuals with blue, yellow and red dot colors are showing Akhal-Take, Arabian and Caspian breeds, respectively.

متمایز از هم هستند. برای توجیه ۱۰۰ درصد واریانس ۶۰ مؤلفه اول مورد نیاز است (شکل ۲).

دو مؤلفه اول ۱۰/۸ درصد واریانس را توجیه می‌کنند. ۵۳ مؤلفه‌ی اول ۹۰/۳ درصد واریانس را در این جمعیت‌ها توجیه می‌کند که بالا بودن واریانس توجیهی نشان‌دهنده‌ی این است که این جمعیت‌ها



شکل ۲- واریانس تجمعی توصیفی توسط مؤلفه‌های اصلی: محور X تعداد مؤلفه اصلی و محور Y میزان واریانس توجیه شده را نشان می‌دهد.

Figure 2- Cumulative variance explained by different number of principal components: The X axis is showing the number of principal components and the Y axis is standing for the variance explained.

تاثیرگذار بوده‌اند، درحالی‌که در تحقیق حاضر این سه جمعیت با توجه به اینکه از سه منطقه جغرافیایی متفاوت منشأ گرفته‌اند در سه جمعیت مجزا خوشه‌بندی می‌شوند. این نتیجه از روش PCA همراه با نتایج محققانی همچون پاچو و همکاران (۱۴)، نومیرو و همکاران (۱۳) و ریچ و همکاران (۲۱) بود. آن‌ها بیان داشتند که روش PCA قادر به

در بررسی تنوع ژنتیکی در نژادهای مختلف اسب دنیا با داده‌های SNP در سطح ژنوم، پترسون و همکاران (۱۷) نشان دادند که نژادهای خاورمیانه، آخال‌تکه، عرب و کاسپین در یک محدوده از درخت همسایگی (Neighbor Joining) قرار می‌گیرند و همچنین گزارش شد که اسب‌های مغولی در گسترش این نژادها در سراسر آسیا

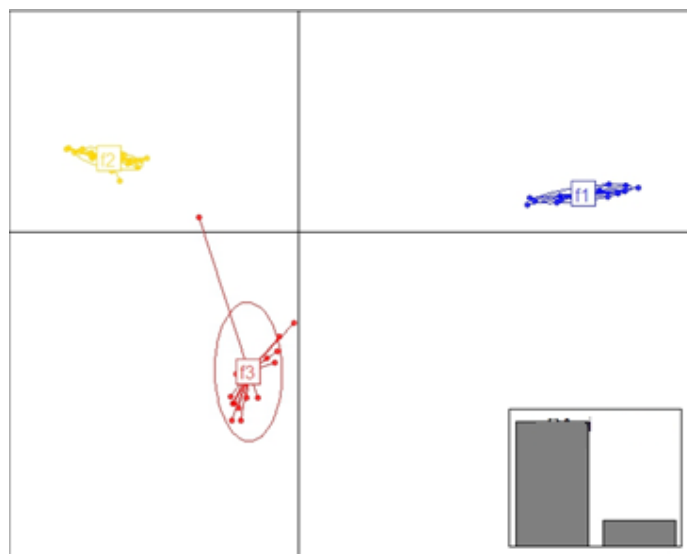
انجام آنالیزهای مرتبط با ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها کافی می‌باشد. گزارشات قبلی ثابت کرده‌اند که اندازه کوچک نمونه تنها می‌تواند موجب ایجاد ارباب کوچکی در برآورد معیارهایی نظیر ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها و تفرق جمعیتی شود، اما میزان این ارباب در مورد معیاری مانند تنوع آلی بسیار بیشتر است (۲۵، ۲۸) به همین خاطر در این تحقیق از این داده‌ها در بررسی ساختار ژنتیکی نژادهای اسب خاورمیانه استفاده شد.

تجزیه‌ی تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC)

شکل ۳ چگونگی خوشه‌بندی جمعیت‌های مختلف اسب مورد مطالعه در این تحقیق را با استفاده از روش DAPC با استفاده از دو مؤلفه تشخیصی اول نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد که دو تابع تشخیصی اول حدود ۱۰/۸ درصد واریانس را توجیه می‌کند.

شناسایی مهاجرت‌ها و جمعیت‌های ایزوله شده بوسیله عوامل مختلف هستند. روش PCA به عنوان جایگزینی برای روش‌های خوشه‌بندی بیزی نیز پیشنهاد شده است (۸).

پنج نشانگر SNP مهم که در مؤلفه اول بیشترین اهمیت را داشتند chr1.36821928، chr1.40927347، chr1.13788925، chr1.30146112 و chr1.12056924 با ضرایب به ترتیب ۰/۰۱۰۷۹، ۰/۰۱۱۲۹، ۰/۰۱۱۴۳، ۰/۰۱۲۳ و ۰/۰۱۴۵۷ بودند و همچنین پنج نشانگر SNP نیز که کمترین اثر را در مؤلفه اول داشتند به ترتیب chr1.26309054، chr1.41719058، chr1.41492293، chr1.40502663 و chr1.14466144 با ضرایب ۰/۰۱۰۸۱، ۰/۰۱۰۴، ۰/۰۱۰۳، ۰/۰۱۰۲ و ۰/۰۰۹۵ بودند. هرچند تعداد نمونه‌های اسب به کار گرفته شده در این مطالعه به دلیل بالا بودن هزینه‌های تعیین ژنوتیپ و تأمین داده‌ها از پروژه کنسرسيوم تنوع ژنتیکی اسب ممکن است نسبتاً کم به نظر بیاید، اما باید دقت داشت که نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که این تعداد نمونه برای



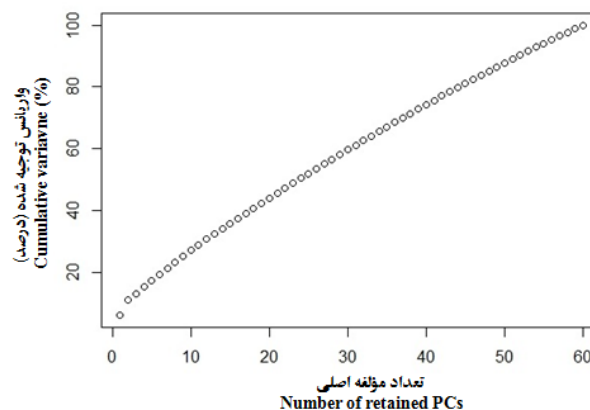
شکل ۳- تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی تشخیصی مربوط به نژادهای اسب مورد مطالعه در این تحقیق: خوشه‌ها با رنگ‌های مختلف مشخص شده‌اند و افراد با نقطه‌های آبی، زرد و قرمز رنگ به ترتیب نشان‌دهنده نژادهای آخال‌تکه، عرب و کاسپین هستند.

Figure 3- DAPC analysis for three breeds of horse evaluated in this study: Clusters are marked with different colors and individuals with blue, yellow and red dot colors are showing Akhal-Take, Arabian and Caspian breeds, respectively.

در ارزیابی گروهی است، لذا از آنجا که در اکثر تحقیقات در نظر است برای پی بردن به ساختار جمعیت با تعیین تعداد خوشه‌ها (گروه) بدون دانش قبلی اقدام شود، در این تحقیق، برای بررسی زیر جمعیت‌ها جدا از تاثیر مکان جغرافیایی از روش تجزیه تشخیصی مؤلفه اصلی (DAPC) نیز استفاده شد. در این روش محقق نظری در خصوص تعداد زیرجمعیت‌ها نمی‌دهد بلکه این روش آماری است که تعداد زیر جمعیت‌ها را پیشنهاد می‌دهد. رویکرد روش‌های ساختاری بر این

هر دو روش PCA و DAPC در این تحقیق باعث تفکیک صحیح جمعیتی در نژادهای اسب مورد مطالعه شدند. نابیلو و همکاران (۱۲) نیز در مطالعه‌ی ساختار جمعیتی گوسفندان ایرانی نتایج مشابهی را گزارش کردند. با این وجود، روش DAPC تداوم بالایی در تخمین ساختار جمعیتی و استنباط احتمالات عضویت افراد به هر گروه نشان داده است (۱۸). از آنجا که روش PCA فاقد برخی از ویژگی‌های ضروری برای بررسی ساختار جمعیت‌های بیولوژیکی از جمله ناتوانی

حیوانات را در سه گروه متمایز خوشه‌بندی کند. همچنین با توجه به خوشه‌هایی که تعیین می‌کند و مرکز هر خوشه را مشخص می‌کند تصویر واضح‌تری از گروه‌های دام‌ها نسبت به روش PCA که پیش‌تر اشاره گردید، نمایان می‌سازد. سزارامن (۲۳) نیز نشان داد که در استنباط و تفسیر ساختار ژنتیکی از روش‌های پر شمار بررسی ساختار جمعیتی، روش DAPC با توجه به برتری‌هایی همچون تفسیر بهتر زیر جمعیت‌ها و انتساب خوشه‌ها بهتر از روش PCA عمل می‌کند. تابع *find. Cluster* شکلی از واریانس تجمعی تو صیف شده توسط مقادیرهای ویژه مؤلفه‌های اصلی DAPC را توصیف می‌کند. نتایج نشان داد که ۶۰ مؤلفه اول صد در صد واریانس را توجیه می‌کنند (شکل ۴).



شکل ۴- واریانس تجمعی توصیفی توسط مؤلفه‌های اصلی در روش DAPC: محور X تعداد مؤلفه اصلی و محور Y میزان واریانس توجیه شده را نشان می‌دهد.

Figure 4- Cumulative variance explained by different number of principal components for DAPC method: The X axis is showing the number of principal components and the Y axis is standing for the variance explained.

تالشی، نجدی و پارس را با استفاده از روش DAPC مورد بررسی قرار داد. بر اساس نتایج حاصل تعداد سه خوشه ژنتیکی بر اساس روش *K-means* در بین گاوهای بومی ایران نشان داده شد. جمعیت‌های مازندرانی و تالشی در انطباق با توزیع جغرافیایی این نژادها، در خوشه یکسانی قرار گرفتند. همچنین، نژادهای پراکنده شده در مناطق کوهستانی شمال غرب کشور (سرابی و کردی) و نژادهای مناطق جنوبی کشور (سیستانی، کرمانی، پارس و نجدی) دو گروه ژنتیکی متمایز دیگر را تشکیل دادند. بر اساس نتایج این تحقیق روش DAPC روشی مناسب برای بررسی ساختار جمعیتی نژادهای بومی گزارش شده است.

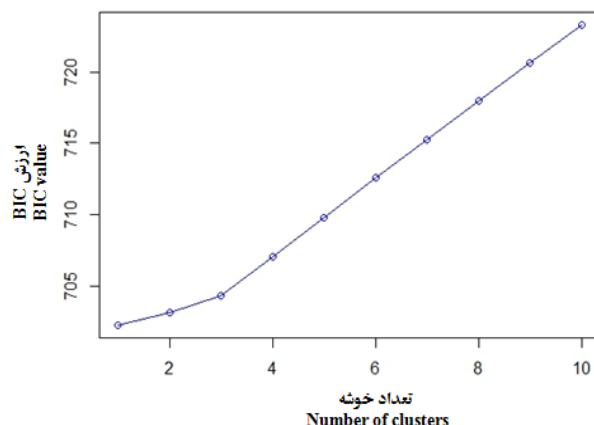
همانطور که قبلاً اشاره شد پترسون و همکاران (۱۷) در بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای اسب دنیا گزارش کردند که نژادهای آخال‌تکه، عرب و کاسپین در یک خوشه قرار می‌گیرند و بیان شد که جمعیت اسب مغولی و توا در گسترش اسب‌ها در سراسر آسیا و اروپا تاثیرگذار

فرض استوارند که نشانگرها با هم مرتبط نبوده و جمعیت‌ها دارای آمیزش تصادفی هستند (۶). لذا استفاده از روش مستقل از مدل همانند روش راحت‌تری برای جمعیت‌های متمرکز محسوب می‌شوند. همچنین در تصحیح لایه‌بندی جمعیتی، روش DAPC به علت اینکه واریانس بین گروهی را افزایش و واریانس داخل گروهی را کاهش می‌دهد بهتر از روش PCA عمل می‌کند. نرخ انتساب صحیح یا صحت روش DAPC در انتساب افراد به گروه‌ها از ۸۰ در صد تا ۹۷ در صد بسته به تعداد تکرار متفاوت بوده است (۶). از سوی دیگر، این روش موجب کاهش زمان محاسباتی مورد نیاز جهت استخراج اطلاعات از داده‌های حجیم می‌شود (۷). شکل ۳ حاکی از این است که روش DAPC قادر است تا تمام

شکل ۵ مقادیر BIC را با افزایش مقادیر k نشان می‌دهد، طبق این شکل، کمترین مقدار BIC برای $k=3$ بدست آمد که بعد از این تعداد، BIC افزایش می‌یابد و به طور واضح نشان می‌دهد که این تعداد خوشه بهتر است در نظر گرفته شود. بعد از $K=3$ کمترین مقدار BIC برای خوشه ۴ است و رفته رفته این مقدار افزایش پیدا می‌کند. این معیار با توجه به شکل‌های بالا وجود یک خوشه را تایید می‌کند و اگر بخواهیم به چند خوشه تقسیم‌بندی کنیم نهایت سه خوشه با توجه به شکل با BIC بالاتر از $K=3$ قابل تفکیک هستند. علاوه بر این، DAPC احتمالات اعضای هر فرد را برای گروه‌های مختلف براساس توابع تشخیصی جایگشتی فراهم می‌آورد و می‌توانند نزدیکی دام‌ها به خوشه‌های مختلف را تفسیر کنند (۵). احتمالات عضویت دام‌ها، خوشه‌های ژنتیکی صریح و واضحی را فراهم می‌آورد. کریمی (۷) با هدف بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاوهای بومی ایران بر اساس اطلاعات ژنومی، تعداد ۹۰ رأس گاو از هشت جمعیت مختلف از گاوهای بومی کشور شامل نژادهای سرابی، سیستانی، کردی، کرمانی، مازندرانی،

با معیار ارزیابی، $BIC K=3$ بهترین نتیجه را نشان دهد. در این تحقیق روش DAPC در بررسی ساختار جمعیتی نسبت به روش PCA بهتر گزارش شده است و در کنترل کیفیت و تصحیح لایه‌بندی جمعیتی در بررسی‌های پیوستگی به عنوان جایگزینی برای PCA پیشنهاد شده است (۲).

هستند که این نتایج می‌تواند ناشی از سطح بالای تنوع درون نژادی در این جمعیت‌ها باشد. لذا برای ارزیابی ارتباط بین خوشه‌های مختلف، باید یک روش مناسب بر تنوع بین گروه‌ها تمرکز کند و تنوع درون گروهی را نادیده بگیرد که تجزیه‌ی تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) این کار را انجام می‌دهد. در مطالعه بر روی گاومیش‌های ایران روش‌های تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های (PCA) و تجزیه و تحلیل تشخیصی مؤلفه‌های اصلی (DAPC) اجرا شد. روش DAPC توانست



شکل ۵- تعداد خوشه‌ها برای جمعیت‌های اسب مورد مطالعه در این تحقیق بر اساس معیار اطلاعات بیزی: محور X تعداد خوشه و محور Y ارزش BIC را نشان می‌دهد.
Figure 5- Number of clusters for the horse populations investigated in this study based on Bayesian Information Criterion (BIC): The X axis is showing the number of clusters and the Y axis is standing for BIC values.

متمایز هستند اما در مجموع روش DAPC به دلیل به تصویر کشیدن تفاوت بین گروهی با زمان محاسباتی کمتر، و عدم نیاز به پیش‌فرض‌هایی درباره مدل ژنتیک جمعیت‌های مورد مطالعه، تصویر واضح‌تری از ساختار جمعیتی نژادها با استفاده از اطلاعات ژنومی ارائه می‌دهد و روش DAPC در تعیین تعداد بهینه K کارآمدتر عمل می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه پروژه کنسرسیوم تنوع ژنتیکی اسب (EGDC) و به خصوص خانم دکتر پترسون و همکاران ایشان به خاطر در اختیار قرار دادن اطلاعات ژنوتیپی نژادهای مورد مطالعه در این تحقیق کمال تشکر را دارند.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق دو روش تجزیه مؤلفه اصلی (PCA) و تجزیه تشخیصی مؤلفه اصلی (DAPC) برای تفکیک نژادی و شناسایی روابط بین جمعیتی نژادهای اسب آخال‌تکه، عرب و کاسپین مورد مقایسه قرار گرفتند که با توجه به پراکنش گسترده این سه نژاد در ایران نتایج این تحقیق می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه درک بهتر ساختار ژنتیکی این نژادها فراهم آورد. این تحقیق با همکاری پروژه کنسرسیوم تنوع ژنتیکی اسب (EGDC) و با استفاده از اطلاعات حاصل از تراشه‌های ژنومی انجام شد. نتایج نشان داد که هرچند هر دو روش PCA و DAPC توانستند سه جمعیت را به سه نژاد خوشه‌بندی کنند و مشاهده شد که این سه نژاد کاملاً از هم

منابع

1. Askari, N., A. M. Mohammadi, and A. Baghizadeh. 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9: 222-229.
2. Azizi, Z., H. Moradi-Shahrbabak, and M. Moradi-Shahrbabak. 2017. Comparison of PCA and DAPC methods for analysis of Iranian Buffalo population structure using SNPchip90k data. *Iranian Journal of Animal Science*, 2:153-161. (In Persian).
3. Dodds, K. G., B. Auvray, S. N. Newman, and J. C. McEwan. 2014. Genomic breed prediction in New Zealand sheep. *BMC Genetics*, 15:92.
4. Epps, C. W., J. A. Castillo, A. Schmidt-Küntzel, P. du Preez, G. Stuart-Hill, M. Jago, and R. Naidoo. 2013.

- Contrasting historical and recent gene flow among African buffalo herds in the Caprivi Strip of Namibia. *Journal of Heredity*, 104(2): 172-181.
5. Jombart, T., and C. Collins. 2015. A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0. 0. Imp Coll London-MRC Cent Outbreak Anal Model, 43.
 6. Jombart, T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1): 94.
 7. Karimi, K. 2017. Investigation of the population structure in Iranian native cattle using discriminant analysis of principal components. *Research on Animal Production*, 8:184-193. (In Persian).
 8. Liu, N., and H. Zhao. 2006. A non-parametric approach to population structure inference using multi locus genotypes. *Human Genomics*, 2(6): 353.
 9. Mohammadi, A., M. R. Nassiry, J. Mosafer, M. R. Mohammadabadi, and G. E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics*, 45(2): 198-202.
 10. Moradi, M. H., A. Nejati-Javaremi, M. Moradi-Shahrabak, K. G. Dodds, and J. C. McEwan. 2012. Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13: 10.
 11. Moradi, M. H., J. Rostamzadeh, A. Rashidi, Kh. Vahabi, and H. Farahmand. 2013. Analysis of genetic diversity in Iranian Mohair goat and its color types using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Journal of Agricultural Communications*, 1: 2.
 12. Nabiloo, R., M. B. Zandi and M. T. Harakinezhad. 2018. Study of genetic diversity of indigenous (Afshari, Moghani and Ghezel) and exotic (Romney, Merinos and Dorper) sheep breeds using high-density SNP markers. *Iranian Journal of Animal Science*, 49(3):437-451. (In Persian).
 13. Novembre, J., and M. Stephens. 2008. Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nature Genetics*, 40(5): 646-649.
 14. Paschou, P., E. Ziv, E. G. Burchard, S. Choudhry, W. Rodriguez-Cintron, M. W. Mahoney, and P. Drineas. 2007. PCA-Correlated SNPs for structure identification in worldwide human populations. *PLoS Genetics*, 3(9): e160.
 15. Patterson, N., A. L. Price, and D. Reich. 2006. Population structure and eigen analysis. *PLoS Genetics*, 2(12): e190.
 16. Pearson, K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of point in space. *Philosophical Magazine*, 2: 559-572.
 17. Petersen, J. L., J. R. Mickelson, E. G. Cothran, L. S. Andersson, J. Axelsson, E. Bailey, D. Bannasch, M. M. Binns, A. S. Borges, P. Brama, A. C. Machado, O. Distl, M. Felicetti, L. F. Clipsham, K. T. Graves, and et al. 2013. Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLOS ONE*, 8(1): e54997.
 18. Pometti, C. L., C. F. Bessega, B. O. Saidman, and J. C. Vilaridi. 2014. Analysis of genetic population structure in *Acacia caven* (Leguminosae, Mimosoideae), comparing one exploratory and two Bayesian-model-based methods. *Genetics and Molecular Biology*, 37(1):64-72.
 19. Purcell S. 2010. PLINK version 1.07. URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink>.
 20. Rahmaninia, J., S. R. Miraei-Ashtiani, H. Moradi-Shahrabak. 2015. Unsupervised clustering analysis of population and subpopulation structure using dense SNP markers. *Iranian Journal of Animal Science*, 46(3): 277-278. (In Persian).
 21. Reich, D., A. L. Price, and N. Patterson. 2008. Principal component analysis of genetic data. *Nature Genetics*, 40: 491.
 22. Serre, D., A. Montpetit, G. Paré, J. C. Engert, S. Yusuf, B. Keavney, T. J. Hudson, and S. Anand. 2008. Correction of population stratification in large multi-ethnic association studies. *PloS one*, 3(1): e1382.
 23. Sethuraman, A. 2013. On inferring and interpreting genetic population structure-applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness. Ph.D. dissertation, Iowa State University, Iowa State.
 24. Shojaei, M., M. Mohammad-Abadi, M. Asadi-Fozi, O. Dayani, A. Khezri, and M. Akhondi. 2011. Association of growth trait and leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(2): 67-73.
 25. Smith, O., and J. Wang. 2014. When can noninvasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies? *Molecular Ecology Resources*, 14: 1011-1023.
 26. Teo, Y. Y., A. E. Fry, T. G. Clark, E. Tai, and M. Seielstad. 2007. On the usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*, 71(5): 701-703.
 27. Uzzaman, M. R., Z. Edea, M. S. A. Bhuiyan, J. Walker, A. K. Bhuiyan, and K. S. Kim. 2014. Genome-wide single nucleotide polymorphism analyses reveal genetic diversity and structure of wild and domestic cattle in Bangladesh. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(10): 1381.
 28. Willing, E., C. Dreyer, and C. Van Oosterhout. 2012. Estimates of genetic differentiation measured by F_{ST} do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers. *PLoS One*, 7(8): e42649.
 29. Zamani, P., M. Akhondi, M. R. Mohammadabadi, A. A. Saki, A. Ershadi, M. H. Banabazi, and A. R. Abdolmohammadi. 2011. Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(10): 1812-1817.



Comparison of principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of principal component (DAPC) methods for analysis of population structure in Akhal-Take, Arabian and Caspian horse breeds using genomic data

Nasrin Babaei¹, Abbas Rafat², Mohammad Hossein Moradi^{*3}, Mohammad Reza Feizi Derakhshi⁴

Submitted: 15-12-2019

Accepted: 27-12-2020

Babaei, N., A. Rafat, M. H. Moradi, and M. R. Feizi Derakhshi. 2021. Comparison of principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of principal component (DAPC) methods for analysis of population structure in Akhal-Take, Arabian and Caspian horse breeds using genomic data. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):453-462.

Introduction Development of high-power and cost-effective genotyping methods in recent years has provided the possibility of evaluation the genetic structure and the relationship among species populations utilizing genomic data. Genome wide inference of population structure using genetic markers could provide invaluable information associated with evolutionary relationships and clustering of subpopulations for performing animal breeding programs. In large scale studies, one of the interesting subjects is to study the existence of genetic differences among subdivided groups ascertained from different geographic locations. The objective of this study was to compare the principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of principal component (DAPC) approaches for determining the population structure and study how an individual allocated to the true population of origin, in three Horse breeds located in Middle East consisting Akhal Take, Arabian and Caspian using genomic data.

Materials and Methods In this study, the genomic data obtained from 61 animals consisting Akhal Take (19), Arabian (24) and Caspian (18) were used to investigate the population structure of some Asian horse breeds. The data were obtained from the Equine Genetic Diversity Consortium (EGDC) project. Hair or tissue samples were collected from animals. DNA extraction was performed using an optimized Pure gene (Qiagen) assay and approximately 1 µg of DNA was used for genotyping of the samples. Genotyping was performed using Illumina SNP 50K BeadChip arrays that allow to genotype 52603 SNP marker loci, according to the Illumina standard guidelines. In this study, different quality control steps were applied on preliminary data to ensure the quality of genotyping data. Quality control carried out using PLINK v.1.07 program. The samples with more than 5% missing data were excluded from analysis. Then for each SNP, MAF and call percentage were calculated and the SNPs with a call rate <95% and a MAF <2% were discarded. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 10^{-6}$) was estimated for the remaining SNPs to identify genotyping errors. The Bonferroni correction ($\beta = \alpha/n$) was used to address the multiple testing comparison problem. Principal component analysis (PCA) is a statistical technique for summarizing data from many variables into a few variables which describe as much of the variation in the data as possible. For this purpose, the variance-covariance matrix of independent variables was first calculated and principal components were extracted. Each new variable has an associated Eigen value that measures the respective amount of explained variance. Furthermore, the model independent of discriminant analysis of principal component (DAPC) is a multivariate method designed to identify and describe clusters of genetically related individuals. When group priors are lacking, DAPC uses sequential K-means and model selection to infer genetic clusters. Analysis was performed using PCA and DAPC approaches and the codes for analysis were provided in

1- M.Sc. Graduate of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

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

3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran.

4- Associate Professor, Department of Artificial intelligence, Faculty of Computer Engineering, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

(*Corresponding author email: hosenmoradi@ut.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.0621.39343

R v.3.4.1 software.

Results and Discussion The analysis of the main components summarizes the general variation among individuals, which includes both the variability between the groups and the diversity of the groups, and shows a clear picture of the differences between the groups. The results of this study indicated that 10.8% of the variance was explained by the first two components in both PCA and DAPC methods. Both methods showed high accuracy for assigning of individuals to the true population of origin and both were able to cluster three populations separately. The Bayesian information criterion (BIC) index was used for evaluating the optimal number of clusters for DAPC method and the results revealed that K=3 showing the optimal number with lowest BIC that completely separate three populations. The DAPC method was better than PCA to separate populations from each other due to the increase of intergroup variance and the reduction of intra-group variance. In determining the optimal number of K, it worked better than PCA method and provided a better picture of the relationship between individuals. This results show that DAPC method can be applied in quality control of GWAS as an alternative to the PCA, because of summarizing the genetic differentiation between groups and overlooking within-group variation and provides better population structure.

Conclusion In general, the results of this study showed that although the previous studies grouped these three breeds located in Middle East in one cluster of neighboring trees, however, according to the results of this study, three breeds are grouped separately, and the DAPC method can better illustrate the inter-population relationships in horse breeds.

Keywords: Population structure, Middle East horse breeds, SNP markers, PCA and DAPC methods.



مقاله علمی - پژوهشی

نوترکیبی و انتخاب چند صفتی در پنج والد ژاپنی- شکل کرم ابریشم

معین الدین مواج پور^۱، سید ضیاءالدین میر حسینی^۲، سید حسین حسینی مقدم^{۳*}، شهلا نعمت اللهیان^۴، فرجاد رفیعی^۵، نوید قوی

حسین زاده^۶، یوسف خیرخواه^۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۹

مواج پور، م.، س. س. ض. میرحسینی، س. ح. حسینی مقدم، ش. نعمت اللهیان، ف. رفیعی، ن. قوی حسین زاده، و ی. خیرخواه. ۱۴۰۰. نوترکیبی و انتخاب چند صفتی در پنج والد ژاپنی- شکل کرم ابریشم. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳ (۳): ۴۶۳-۴۷۴.

چکیده

معرفی لاین‌های جدید تجاری یکی از برنامه‌های مراکز اصلاح نژاد کرم ابریشم دنیا می باشد. ایران به دلیل برخورداری از ذخایر ژنتیکی کرم ابریشم و فناوری تولید تخم نوغان امکان معرفی لاین‌های جدید برای تولید کرم ابریشم هیبرید را دارد. در این راستا پنج لاین ژاپنی- شکل کرم ابریشم به نام های ۳۱، ۱۰۳، ۱۵۱، ۱۵۳ و ۱۵۲۴ از بین لاین‌های موجود در بانک ژن در بهار ۱۳۹۱ پرورش یافته و در قالب روش دیال آمیزش داده شدند. برنامه انتخاب به روش سطوح حذفی مستقل از سال ۱۳۹۳ تا سال ۱۳۹۸ اجراء و هم زمان خود لاین‌های مذکور به عنوان شاهد پرورش داده شدند. از بین ترکیبات ژنتیکی ایجاد شده شش ترکیب حفظ و بقیه حذف شدند. در بررسی حاضر صفات تولیدی وزن پيله، درصد قشر پيله، درصد پيله‌های خوب، تعداد پيله در لیترو وزن پيله در لیترو ترکیبات ژنتیکی و لاین‌های مربوطه به طور همزمان مقایسه شدند. وزن پيله بر مبنای متوسط سال های مذکور در ترکیب های IRA1، IRA7 و IRA11 بیشتر از لاین‌ها بود. این مزیت در صفت وزن پيله در لیترو هم دیده شد. پاسخ به انتخاب بر مبنای انحراف از لاین شاهد مادری برای وزن پيله در IRA5 و IRA1 مثبت و معنی دار بود. برای صفت درصد قشر پيله دو ترکیب ژنتیکی IRA1 و IRA3 که والد مادری آن ۱۰۳ است بیشترین انحراف از لاین شاهد مادری را داشتند. IRA1 از نظر صفات اقتصادی پيله عملکرد مطلوبی داشت. با این وجود هر شش ترکیب جدید ژنتیکی برای مطالعات بیشتر و انتخاب به عنوان والد تجاری به بانک ژن کرم ابریشم کشور معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: انتخاب، ترکیب ژنتیکی، جفت گیری تصادفی، روش سطوح حذفی مستقل، کرم ابریشم.

مقدمه

نشده بود نژادهای کرم ابریشم پرورش داده می شد که حسب منطقه جغرافیایی تکامل پیدا کرده بودند. نژادهای چینی، ژاپنی، کره ای، هندی، ایرانی و اروپایی معروف ترین نژادهای کرم ابریشم هستند. نژادهای ژاپنی و نژادهای چینی که ظاهر (فنوتیپ) و عملکرد تولیدی کاملاً متفاوتی در تخم، لارو و پيله دارند در ابتدای قرن بیستم به عنوان پایه های والدینی هیبریدهای تجاری توسط دانشمندان ژاپنی

تولید پيله کرم ابریشم در مناطق معتدله دنیا چندین دهه است که با استفاده از تخم نوغان هیبرید حاصل می شود و در این میان کشورهای معدودی در دنیا امکان تولید تخم نوغان هیبرید تجاری را دارا می باشند. لیکن در گذشته که هیبریدهای کرم ابریشم معرفی

۵- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان،

گیلان، ایران.

۶- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.

۷- کارشناس مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، ایران.

(Email: hosseini@guilan.ac.ir

*) نویسنده مسئول:

DOI:10.22067/ijasr.2021.38311.0

۱- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی و گروه پژوهشی ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.

۳- دانشیار گروه علوم دامی و گروه پژوهشی ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.

۴- مربی پژوهشی، عضو هیات علمی مرکز تحقیقات ابریشم کشور، گیلان، ایران.

مرکز تحقیقات ابریشم ایران که متولی حفظ و پرورش ذخایر ژنتیکی کرم ابریشم کشور است دارای ۱۰۵ سویه ژنتیکی شامل سویه های چینی و ژاپنی- شکل، لاین های اصلاح شده، نژادهای بومی و تعدادی لاین سازگار با غذای مصنوعی می باشد (۶). در حال حاضر در ایران چهار وارسته ژاپنی- شکل کرم ابریشم (۱۰۳، ۳۱، ۱۵۱، ۱۵۳) در خط تولید تجاری قرار داشته که سال ها است به عنوان یکی از پایه های والدینی هیبریدهای تجاری 104×103 ، 104×151 ، 154×151 و 154×153 استفاده می شوند و لازم است با توجه به مشکلاتی که در زمینه تولید تخم نوغان و عملکرد هیبریدهای مذکور وجود دارد والدین جدید معرفی تا هیبریدهای بهتر تولید شوند. در تحقیق حاضر ترکیب های ژنتیکی جدید با استفاده از چهار وارسته ژاپنی- شکل تجاری مذکور و یک وارسته دیگر از بانک ژن کرم ابریشم ایران (۱۵۲۴) انتخاب و تلاش شد طی ۶ نسل بهگزینی در هر یک از ترکیبات جدید، لاین های جدیدی که بتوانند جایگزین های مناسبی برای لاین های ژاپنی- شکل موجود باشند تولید و معرفی شود.

مواد و روش ها

پنج لاین ژاپنی- شکل کرم ابریشم شامل ۱۵۲۴، ۱۰۳، ۳۱، ۱۵۳ و ۱۵۱ از لاین های موجود در بانک ژن مرکز تحقیقات ابریشم کشور در بهار ۱۳۹۱ در شرایط استاندارد پرورش داده شده و به منظور ایجاد ترکیب های ژنتیکی جدید از برنامه آمیزشی دی آل کامل (۵×۵) استفاده شد. تمام ترکیبات ژنتیکی شامل ۱۰ تلاقی مستقیم و ۱۰ تلاقی معکوس و ۵ والد در شرایط یکسان پرورش داده شدند. پس از دو نسل پرورش توده ای^۵ در بیست ترکیب ژنتیکی ایجاد شده، ترکیب های حاصل از تلاقی های دو طرفه^۶ با یکدیگر مخلوط شدند تا ده جمعیت به عنوان نسل پایه اصلاح نژادی جهت انتخاب چند صفتی^۸ ایجاد شود. این کار سبب افزایش تنوع در جمعیت مینا خواهد شد. انتخاب چند صفتی در هر ترکیب ژنتیکی بر مبنای روش سطوح حذفی مستقل بود. در این روش برای هر صفت یک مقدار معینی که بر اساس تجارب قبلی حاصل شده است مشخص کرده و کرم های ابریشمی که بالاتر از آن حد مشخص باشند انتخاب می شوند به عنوان مثال وزن پيله بالاتر از $1/4$ گرم در ماده ها و $1/3$ گرم در نرها انتخاب شدند.

چون در اصلاح نژاد کرم ابریشم محصول هر پروانه به صورت خانوادگی پرورش داده می شود، امکان انتخاب خانوادگی برای صفاتی که وراثت پذیری کمتری دارند (نظیر صفات تولید مثلی و ماندگاری) فراهم می باشد (۴). لذا در این تحقیق تلفیقی از انتخاب خانوادگی و انفرادی استفاده شد. ویژگی هایی نظیر حساسیت به آلودگی

معرفی شدند. این فناوری^۱ از آن زمان تاکنون مورد استفاده مراکز اصلاح نژاد کرم ابریشم دنیا قرار گرفته است (۹). لاین های ژاپنی- شکل با دارا بودن علامت های لاروی و پيله دمبلی شکل کاملاً از لاین های چینی- شکل که فاقد علائم لاروی و دارای پيله تخم مرغی شکل هستند متمایز می شوند. در مجموع بیش از ۴۳۰۰ نژاد، لاین و وارسته کرم ابریشم در بیش از ۱۵ کشور جهان وجود دارد که شامل نژادهای یک نسله، دونسله و چند نسله؛ وارسته های بهبود یافته، لاین های جهشی^۲ و لاین های ایزوژنیک می باشند (۳ و ۵). توضیح اینکه نژادهای یک نسله کرم ابریشم تنها یک بار در سال می توانند به صورت طبیعی تفریح و پرورش داده شوند، لیکن در مناطق استوایی که تک فصلی بوده و درختان خزان ندارند نژادهای چند نسله ای تکامل پیدا کرده که در طول سال تفریح و پرورش داده می شوند.

طرح های اصلاح نژادی در کشورهای دارای ذخایر ژنتیکی کرم ابریشم در شرایطی قابل اجرا است که آن ذخایر از کیفیت و تنوع لازم برخوردار باشد. روش اصلاح نژاد مبتنی بر تولید هیبرید که به طور موفقیت آمیزی در بسیاری از محصولات کشاورزی استفاده می شود وابسته به وجود هرچه بیشتر وارسته های والدینی می باشد تا در ادامه بتوان با اندازه گیری قابلیت ترکیب پذیری این وارسته ها، بهترین پایه پدری و مادری که بیشترین اثر هتروژیک را نشان داده اند را مشخص کرد. دلایل و مکانیسم های ایجاد اثر هتروژیک متفاوت بوده و معمولاً پس از چندین نسل با تغییراتی که در انواع اثرات غالبیت و ایپستازی ایجاد می شود اثر هتروژیک صفات نیز تغییر می نماید (۱۳). عملکرد صفات در لاین های والدینی کرم ابریشم هیبرید شامل لاین های ژاپنی شکل و چینی شکل نیز پس از گذشت چندین سال به دلایل مختلف و از جمله همخوانی دچار تغییر می شود. لذا پس از گذشت چند سال لازم است با تلاقی های مجدد بین وارسته های موجود، لاین های جدید معرفی نمود. در چین از بعد از جنگ جهانی دوم هر ۱۰ سال یکبار وارسته های جدید جایگزین شده است (۳). در برخی مراکز اصلاح نژادی نظیر انستیتو تحقیقات نوغانداری استان جیانگسو چین در طی چند دهه گذشته هر ۵ سال با انجام طرح های اصلاح نژادی، لاین های جدیدی معرفی شده است (۲۰).

طرح های اصلاح نژادی در کرم ابریشم پس از ایجاد تنوع ژنتیکی با استفاده از تلاقی گری درون گروهی^۳ و یا بین گروهی^۴ شروع و طی چندین نسل انتخاب چند صفتی ادامه می یابد. انتخاب چند صفتی در طرح های مرسوم اصلاح نژادی کرم ابریشم مبتنی بر روش سطوح حذفی مستقل^۵ می باشد (۴ و ۱۷). هر چند که تلاش هایی برای به کارگیری شاخص انتخاب (۷ و ۱۹) و انتخاب تک صفتی (۱۵) نیز انجام شده است.

5 - Independent Culling Levels
6-Mass Rearing
7- Reciprocal
8- Multiple Trait Selection

1 - Two-parental hybrids
2 - Mutant
3 - Intrastrain Hybridization
4 - Interstrain Hybridization

نتایج و بحث

باتوجه به اینکه در دوران انتخاب در این طرح اصلاح نژادی در هر سال یکبار پرورش کرم ابریشم انجام شد بنابراین بجز اثر ژنوتیپ تنها اثر سال بر داده های صفات مختلف اثر گذار بود. جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس مربوط به صفات مهم اقتصادی در تمامی لاین ها و ترکیب های کرم ابریشم ژاپنی - شکل را نشان می دهد. اثرات ژنوتیپ، سال و اثر متقابل ژنوتیپ و سال برای تمامی صفات مورد بررسی شامل تعداد پیله به ازای هر لیتر، وزن پیله به ازای هر لیتر، درصد پیله های خوب، وزن پیله و درصد قشر پیله بسیار معنی دار بود. اثر متقابل ژنتیکی - محیطی یک عنصر اصلی و مهم برای اصلاح گر در زمانی است که پروژه اصلاح نژادی انجام می شود. معنی داری اثر سال نشان دهنده تأثیر شرایط محیطی بر عملکرد صفات اقتصادی است. با توجه به اینکه این طرح در شرایط کنترل شده دمایی و رطوبتی و استفاده از یک نوع برگ توت جهت تغذیه تمام ژنوتیپ های کرم ابریشم مورد بررسی (مزرعه اختصاصی مرکز تحقیقات ابریشم کشور) اجراء شده است، به نظر می رسد کیفیت برگ توت عامل اصلی در معنی دار شدن اثر سال باشد. یکی از عوامل اصلی در کیفیت برگ توت رطوبت آن است. رطوبت مطلوب برگ توت بر میزان مصرف، هضم و جذب مواد مغذی اثر می گذارد. آزمایشی که بر روی یک هیبرید کرم ابریشم انجام شد نشان داد که رطوبت برگ توت سرعت رشد لاروی، وزن لاروی، وزن پیله، و وزن قشر پیله و طول الیاف ابریشمی را به طور معنی داری تغییر می دهد (۱۱). در برنامه اصلاح نژادی حاضر، انتخاب انفرادی متعاقب انتخاب خانوادگی و به عنوان بخشی از انتخاب چند صفتی (روش سطوح حذفی مستقل) اجراء شد. جداول ۳ تا ۷ تغییرات در صفات مورد بررسی در طی سال های اجراء برنامه انتخاب (۱۳۹۳ الی ۱۳۹۸) را نشان می دهد. در این جداول داده های مربوط به گروه لاین های غیر انتخابی نیز به تفکیک سال نشان داده شده است. ستون آخر متوسط عملکرد صفات در طی نسل های G1، G2، G3، G4 و G5 در هر دو گروه انتخابی و غیر انتخابی می باشد. به عبارتی نتیجه اولین انتخاب (عملکرد G1) در میانگین مذکور وارد نشده است. در لاین های والدینی انتخاب پروانه های هر لاین به صورت تصادفی بوده و هیچ انتخابی اعمال نشد. برای صفت وزن پیله (جدول ۳) کمترین وزن پیله در بین تمام لاین ها و ترکیبات ژنتیکی مربوط به لاین ۳۱ بود و ترکیب های IRA1 و IRA11 بیشترین میانگین وزن پیله را داشتند که هر سه نسبت به دیگر لاین ها برتری نشان دادند. سایر لاین ها و ترکیب ها، اختلاف معنی داری نداشتند. برای درصد قشر پیله (جدول ۴) هیچکدام از ترکیب های حاصل از لاین های ژاپنی در تمام سال های مورد بررسی، نسبت به والدین برتری کاملی نداشته و عملکرد ترکیبات ژنتیکی جدید در این صفت از لاین های والدینی ۳۱ و ۱۵۲۴ کمتر بود.

میکروسپوریدیایی، کیفیت و یکنواختی رنگ تخم، یکنواختی رفتارهای دوران لاروی و تلفات دوران لاروی دلایل حذف خانواده های ضعیف در قبل از پیله تنی بودند. بعد از برداشت و تفکیک پیله ها، پیله های متوسط و ضعیف حذف شده و صفات مربوط به پیله رکوردگیری شدند. صفات خانوادگی در این مرحله شامل وزن کل پیله تولیدی، وزن کل پیله های خوب، درصد پیله های خوب، درصد ماندگاری شفیره، تعداد پیله در لیتر و میانگین وزن یک پیله بودند. صفات انفرادی شامل وزن پیله، وزن قشر پیله و درصد قشر پیله بودند. در انتها پروانه هایی که بالاترین رکورد را از نظر وزن پیله و درصد قشر پیله در بین تمام خانواده ها داشتند انتخاب و تلاقی داده شدند.

پنج لاین ژاپنی - شکل کرم ابریشم مذکور در تمام سال ها به عنوان لاین های شاهد با آمیزش تصادفی تجدید نسل شدند. تمامی پرورش ها در یک محیط استاندارد پرورشی (اتاق های با قابلیت تنظیم دما و رطوبت) با رعایت موازین بهداشتی و استفاده از ارقام اصلاح شده توت موجود (در کرم جوان از برگ توت وارسته کایرونومگاشی و در کرم بالغ از برگ توت وارسته های ایچی نویسه و کن موجی) در مرکز تحقیقات ابریشم کشور انجام شد. به دلیل اینکه چهار مورد از ۱۰ ترکیب ژنتیکی نسبت به بیماری ها حساس بودند، این ژنوتیپ ها به طور کامل در سال ۹۵ حذف و تنها شش ترکیب تا انتها طرح (سال ۱۳۹۸) بهبود ژنتیکی داده شدند (جدول ۱). ترکیب های حذفی ۳۱×۱۵۲۴، ۳۱×۳۱، ۱۵۱×۱۵۲۴ و ۳۱×۱۰۳ بودند. در پایان پژوهش شش ترکیب ژنتیکی جدید ژاپنی - شکل حاصل از این طرح جهت نگهداری در بانک ژن نام گذاری شدند (جدول ۱).

در این تحقیق به منظور مقایسه عملکرد ترکیبات جدید حاصل از اجرای پروژه، تغییرات در دو صفت وزن پیله و درصد قشر پیله به عنوان صفات هدف اصلاح نژادی^۱ و سه صفت درصد پیله های خوب، وزن پیله در لیتر و تعداد در لیتر به عنوان صفات مهم اقتصادی کرم ابریشم بررسی شدند. تجزیه دو عاملی (شامل ۶ ژنوتیپ و ۵ سال) در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS رویه GLM آنالیز شدند. جهت ارزیابی ژنوتیپ های برتر و بررسی تفاوت بین آنها و لاین های خالص والدینی و همچنین تفاوت بین نسل های مختلف، میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ ها برای هر صفت بطور جداگانه و در هر سال پس از تصحیح با روش توکی - کرامر مقایسه شدند. مدل تجزیه آماری به شرح زیر بود:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + (G \times T)_{ij} + e_{ijk}$$

که در آن، y_{ijk} مقدار مشاهده هر صفت، μ میانگین مشاهدات برای هر صفت، G_i اثر ژنوتیپ i ام، T_j اثر سال j ام و e_{ijk} اثر تصادفی باقیمانده بود.

جدول ۱- نامگذاری ترکیبات ژنتیکی جدید حاصل از پنج والد کرم ابریشم ژاپنی - شکل

Table 1- Naming of new genetic combinations produced by five parental Japanese-shape silkworm lines

لاین های والد ژاپنی شکل	1	2	3	4	5	
Parental Japanes-shape lines	31	103	151	153	1524	
نام های جدید ترکیبات ژنتیکی	1	2	3	4	5	6
New name	31×153	151×153	103×151	103×153	153×1524	1524×103
for genetic combinations	IRA5	IRA7	IRA1	IRA3	IRA11	IRA9

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مهم (میانگین مربعات) برای ژنوتیپ های ژاپنی - شکل کرم ابریشم

Table 2- ANOVA of important traits (Mean Squares) for the Japanese-shape silkworm genotypes

منبع تغییرات	تعداد پیله در لیتر	وزن پیله در لیتر	درصد قشر پیله	وزن پیله	درصد پیله خوب
Source of Variation	Cocoon Number /Litre	Cocoon Weight /Litre (g)	Cocoon Shell Percentage (%)	Cocoon Weight(g)	Best Cocoon Percentage(%)
Model	72129.250 ***	149.174 ***	34134.947***	865.507***	112827.012***
Genotype	417.249***	1956.914 ***	75.223***	8.459**	316.162***
Year	1480.545***	103.020***	814.374***	24.683***	6155.987***
Genotype×Year	100.215***	30.480***	44.776 ***	0.816***	61.305***
Error	45.22	17.699	17.69	0.13	1.778
R ²	0.997	0.997	0.997	0.995	0.995

** (P<0.01) ; *** (P<0.001)

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات وزن پیله در بین لاین های کرم ابریشم و ترکیب های حاصل از آنها از نسل صفر تا نسل پنجم

Table 3- Least-squares means for cocoon weight among silkworm lines and their crossing from G0 to G5

نوع ژنوتیپ Genotype	روش انتخاب Selection Method	میانگین حداقل مربعات وزن پیله Least-squares means of cocoon weight (g)						
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	Average ¹
31	No Selection (R.M.) ²	1.591±0.007	1.592 ±0.008 d	1.592 ±0.006 d	1.563 ±0.006 d	1.572 ±0.006 e	1.588 ±0.005 d	1.579 ±0.003 d
103	No Selection (R.M.)	1.720 ±0.007	1.755 ±0.008 a	1.755 ±0.006 a	1.642 ±0.006 bcd	1.615 ±0.006 de	1.640 ±0.005 cd	1.663 ±0.003 cd
151	No Selection (R.M.)	1.648 ±0.007	1.713 ±0.008 ab	1.713 ±0.006 abc	1.663 ±0.006 bc	1.733 ±0.006 bc	1.693 ±0.005 bc	1.701 ±0.003 bcd
153	No Selection (R.M.)	1.647 ±0.007	1.674 ±0.008 bc	1.672 ±0.006 bc	1.670 ±0.006 abc	1.708 ±0.006 bcd	1.689 ±0.005 bc	1.690 ±0.003 cd
1524	No Selection (R.M.)	1.705 ±0.007	1.624 ±0.008 cd	1.625 ±0.006 cd	1.624 ±0.006 cd	1.701 ±0.006 bcd	1.633 ±0.005 de	1.646 ±0.003 cd
IRA5	I. C. L. ³	1.693 ±0.007	1.653 ±0.008 bcd	1.671 ±0.006 bc	1.623 ±0.006 cd	1.706 ±0.006 bcd	1.654 ±0.005 de	1.664 ±0.003 cd
IRA7	I. C. L.	1.763 ±0.007	1.677 ±0.008 bc	1.727 ±0.006 ab	1.678 ±0.006 abc	1.774 ±0.006 bc	1.669 ±0.005 bcd	1.712 ±0.003 ab
IRA1	I. C. L.	1.796 ±0.007	1.715 ±0.008 ab	1.759 ±0.006 a	1.723 ±0.006 a	1.780 ±0.006 abc	1.765 ±0.005 a	1.757 ±0.003 a
IRA3	I. C. L.	1.719 ±0.007	1.760 ±0.008 a	1.700 ±0.006 abc	1.689 ±0.006 ab	1.693 ±0.006 cd	1.960 ±0.005 cd	1.693 ±0.003 cd
IRA11	I. C. L.	1.776 ±0.007	1.679 ±0.008 bc	1.734 ±0.006 ab	1.693 ±0.006 ab	1.800 ±0.006 a	1.718 ±0.005 ab	1.736 ±0.003 a
IRA9	I. C. L.	1.759 ±0.007	1.652 ±0.008 bcd	1.666 ±0.006 bcd	1.643 ±0.006 bcd	1.652 ±0.006 cd	1.651 ±0.005 cd	1.656 ±0.003 cd

^{a,b} میانگین های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<0/05).

¹ میانگین چهار نسل آخر

² جفت دادن تصادفی پروانه

³ روش سطوح حذفی مستقل

^{a, b} Least-squares means with different superscripts within the same column differ significantly (P<0.05)

¹ Avarage of last four generation (G2, G3, G4 and G5)

² Random Matting

³ Independent Culling Level

جدول ۴ - میانگین حداقل مربعات درصد قشر پیله در بین لاین‌های کرم ابریشم و ترکیب‌های حاصل از آنها از نسل صفر تا نسل پنجم

Table 4- Least-squares means for cocoon shell percentage among silkworm lines and their crossing from G0 to G5

نوع ژنوتیپ Genotype	روش انتخاب Selection Method	میانگین حداقل مربعات درصد قشر پیله Least-squares means of cocoon shell percentage (%)						
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	Average ¹
31	No Selection	19.39	19.77	19.77	20.07	20.74	20.25	20.22
	(R.M.) ²	±0.086	±0.068 ^a	±0.066 ^a	±0.068 ^a	±0.066 ^{cd}	±0.071 ^{cde}	±0.029 ^a
103	No Selection	19.17	19.24	19.24	18.20	19.97	20.60	19.50
	(R.M.)	±0.086	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{bcd}	±0.068 ^{de}	±0.066 ^{bc}	±0.071 ^{abc}	±0.029 ^{cde}
151	No Selection	18.84	19.43	19.47	19.34	19.61	20.36	19.70
	(R.M.)	±0.086	±0.068 ^{abc}	±0.066 ^{bc}	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{cd}	±0.071 ^{cd}	±0.029 ^{cd}
153	No Selection	19.09	19.13	19.15	18.91	20.29	20.32	19.67
	(R.M.)	±0.086	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{cd}	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{ab}	±0.071 ^{cd}	±0.029 ^{cd}
1524	No Selection	19.00	19.45	19.45	19.80	20.35	21.49	20.27
	(R.M.)	±0.086	±0.068 ^{abc}	±0.066 ^{bc}	±0.068 ^{ab}	±0.066 ^a	±0.071 ^a	±0.029 ^a
IRA5	I. C. L. ³	19.47	19.10	19.47	19.12	19.89	20.03	19.63
		±0.086	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{bc}	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{bc}	±0.071 ^{ed}	±0.029 ^{cd}
IRA7	I. C. L.	19.71	18.54	19.63	18.14	19.49	19.92	19.30
		±0.086	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{ab}	±0.068 ^e	±0.066 ^{de}	±0.071 ^{def}	±0.029 ^{de}
IRA1	I. C. L.	19.05	19.13	19.23	19.15	20.01	20.74	19.78
		±0.086	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{bcd}	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{bc}	±0.071 ^{bc}	±0.029 ^{bc}
IRA3	I. C. L.	19.97	18.97	19.76	19.09	19.51	19.81	19.54
		±0.086	±0.068 ^{bcd}	±0.066 ^a	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{de}	±0.071 ^{ef}	±0.029 ^{bcd}
IRA11	I. C. L.	19.32	18.45	19.98	18.26	19.34	19.41	19.00
		±0.086	±0.068 ^d	±0.066 ^d	±0.068 ^{de}	±0.066 ^d	±0.071 ^f	±0.029 ^e
IRA9	I. C. L.	19.33	19.19	19.32	19.09	19.72	20.67	19.70
		±0.086	±0.068 ^{bc}	±0.066 ^{bc}	±0.068 ^{cd}	±0.066 ^{bcd}	±0.071 ^{bc}	±0.029 ^{cd}

a, b میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).^۱ میانگین چهار نسل آخر^۲ جفت دادن تصادفی پروانه^۳ روش سطوح حذفی مستقلa, b Least-squares means with different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)¹ Average of last four generation (G2, G3, G4 and G5)² Random Matting³ Independent Culling Level

صفت وزن پیله در یک لیتر (جدول ۷) بیشترین میانگین را در بین ترکیب‌های ژنتیکی IRA1 و IRA11 داشت که بسیار نزدیک به نتایج وزن پیله انفرادی می‌باشد. لاین‌ها و ترکیب‌هایی که دارای پیله‌های درشت‌تری بودند، در صفت میانگین وزن پیله در لیتر رکورد کمتری داشتند. این موضوع تقریباً با توجه به اینکه در این حالت تعداد شفیره کمتری در واحد حجم وجود خواهد داشت قابل توجیه است. به نظر می‌رسد لاین ۱۵۳ که در پایه پدری ترکیب‌های IRA7 و IRA3 استفاده شده است، در درشت‌تر شدن پیله‌ها و پایین بودن میانگین وزن پیله‌ها در لیتر تأثیر گذاشته است.

انتخاب زمانی مؤثر است که تنوع ژنتیکی کافی وجود داشته باشد. تنوع آلی سبب توانایی جمعیت در پاسخ به انتخاب در طی نسل‌های متمادی و در نهایت بقای جمعیت می‌شود (۵). در کرم ابریشم برای ایجاد تنوع از آمیزش‌های درون‌نژادی و یا بین‌نژادی استفاده می‌شود. صلاح‌نژاد کرم ابریشم بر مبنای ایجاد ترکیبات ژنتیکی جدید در بین والدین چینی یا ژاپنی و انتخاب بهترین ترکیب از میان آنها

IRA11 که بیشترین وزن پیله را داشت در صد قشر پیله‌اش از دیگر لاین‌ها کمتر بود. البته این موضوع با توجه به همبستگی ژنتیکی کم و حتی همبستگی فنوتیپی منفی بین این دو صفت که در تحقیقات دیگر گزارش شده قابل پیش‌بینی می‌باشد (۸). برای صفت در صد پیله‌های خوب (جدول ۵) بر مبنای متوسط عملکرد سال‌های انتخابی، هیچکدام از ترکیب‌ها نسبت به والدین برتری نشان ندادند و بین ترکیب‌ها نیز به جز IRA3 که کمترین در صد پیله خوب را نشان داد اختلاف معنی‌داری با همدیگر نشان ندادند و همه عملکرد تقریباً یکسانی در این صفت داشتند. این موضوع نشان داد که برنامه انتخاب استفاده شده توانسته تغییر چندانی در این صفت ایجاد نماید.

جدول ۶ میانگین تعداد پیله در لیتر به عنوان معیار اندازه پیله را در لاین‌ها و ترکیب‌های مختلف به تفکیک سال نشان می‌دهد. تقریباً تمام ترکیب‌های ژنتیکی اندازه پیله بزرگتری نسبت به والدین بجز لاین 153 داشتند. این موضوع نشان می‌دهد که در نتیجه انتخاب، افزایش وزن پیله با افزایش اندازه پیله همراه شده است. برای

یک روش مرسوم در معرفی لاین‌های تجاری جدید می باشد (۳ و ۶). انتخاب انفرادی و خانوادگی صفات مختلف کرم ابریشم در برنامه سطوح حذفی مستقل به این معنی است که خانواده‌هایی که برای حتی یک صفت ضعیف باشند حذف خواهند شد. برای انتخاب انفرادی که نیازمند رکورد گیری انفرادی است نیز تنها پیله‌هایی انتخاب می شوند که بیشترین وزن پیله و درصد قشر پیله را داشته باشند. به طور کلی توسعه متعادل تمام صفات اقتصادی برنامه اصلی یک برنامه اصلاح نژادی کرم ابریشم است (۲۰).

جدول ۸ تفاوت کلی ژنوتیپ‌های کرم ابریشم برای دو صفت انتخابی وزن پیله و درصد قشر پیله بر مبنای انحراف از لاین شاهد مادری در همان سال مربوطه طی سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۸ را نشان می دهد. به عنوان مثال میانگین صفت وزن پیله ترکیب IRA5 از میانگین لاین ۳۱ در همان سال مربوطه کمتر شده است. مقایسه میانگین انجام شده بر مبنای انحراف داده‌های تنها ۴ سال (۱۳۹۵، ۱۳۹۶، ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸) بوده است. با توجه به اثر بسیار معنی دار محیط (سال پرورش) بر داده‌های صفات کمی کرم ابریشم معمولاً

پاسخ به انتخاب بلافاصله حاصل نمی شود، لذا داده‌های سال ۱۳۹۴ که پاسخ تنها یک نسل انتخاب بود در محاسبات مربوط به جدول ۸ وارد نشد. پاسخ انتخاب تنها برای دو صفت وزن پیله و درصد قشر پیله که معیار انتخاب انفرادی پیله‌های برتر در تمامی نسل‌ها بودند محاسبه شد. نتایج نشان داد تفاوت بین ترکیب‌های ژنتیکی در هر دو صفت وزن پیله و درصد قشر یک پیله از نظر آماری معنی دار بود ($P<0.05$). با توجه به جدول ۸، پاسخ به انتخاب برای وزن پیله در تمام لاین‌ها مثبت بوده است. پاسخ به انتخاب برای وزن پیله انفرادی در IRA9 و IRA7 نسبت به IRA5 و IRA1 کمتر بود ($P<0.05$). IRA3 و IRA11 پاسخ به انتخاب حدوسطی داشتند. در مورد صفت درصد قشر پیله IRA1 و IRA3 که والد مادری آن ۱۰۳ است بیشترین پیشرفت ژنتیکی را داشتند. IRA9 که افزایش وزن پیله‌اش کمتر از بقیه بود (جدول ۸) نه تنها برای درصد قشر پیله نسبت به والد مادری پیشرفتی در طی این سال‌ها نشان نداد بلکه کمترین مقدار را نسبت به بقیه ترکیب‌های ژنتیکی نشان داد.

جدول ۵ - میانگین حداقل مربعات صفت درصد پیله‌های خوب در تمامی لاین‌ها و ترکیب‌های ژنتیکی تولید شده از نسل صفر تا نسل پنجم

Table 5- Least-squares means for good cocoons percentage among silkworm lines and their crossing from G0 to G5

نوع ژنوتیپ Genotype	روش انتخاب Selection Method	میانگین حداقل مربعات درصد پیله خوب Least-squares means of good cocoon percentage (%)						Average ¹
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	
31	No Selection (R.M.) ²	81.50 ±1.103	83.82±1.337 ^a	86.15 ±1.512 ^{ab}	84.51 ±1.759 ^a	82.52 ±1.687 ^{bc}	90.31 ±1.256 ^{ab}	85.87±1.684 ^{ab}
103	No Selection (R.M.)	84.75±1.369	82.52±1.337 ^{ab}	86.02 ±1.538 ^{ab}	80.11 ±1.759 ^a	85.29 ±1.687 ^b	91.86 ±1.256 ^a	85.82±1.338 ^{ab}
151	No Selection (R.M.)	83.23 ±1.103	82.59±1.315 ^{abc}	89.44 ±1.512 ^a	81.88 ±1.488 ^{ab}	87.73 ±1.386 ^a	89.30 ±1.776 ^{ab}	87.09±1.787 ^a
153	No Selection (R.M.)	85.27 ±1.052	76.76±1.396 ^{abc}	79.09 ±1.538 ^c	83.04 ±1.759 ^a	85.63 ±1.386 ^b	87.02 ±1.256 ^{ab}	83.70±1.721 ^{ab}
1524	No Selection (R.M.)	80.97 ±1.835	74.04±1.315 ^{abc}	86.65 ±1.512 ^{ab}	82.09 ±1.488 ^{ab}	82.89 ±1.687 ^{ab}	91.87 ±1.256 ^a	85.85±1.638 ^{ab}
IRA5	I. C. L. ³	74.69±1.18	78.62±1.337 ^{abc}	81.75 ±1.512 ^{bc}	85.55 ±1.488 ^a	83.92 ±1.386 ^{ab}	90.89 ±1.776 ^{ab}	85.38±1.767 ^{ab}
IRA7	I. C. L.	83.48 ±1.369	72.99±1.337 ^c	85.89 ±1.175 ^{ab}	80.40 ±1.759 ^{ab}	86.37 ±1.386 ^{ab}	84.30 ±1.776 ^b	84.09±1.365 ^{ab}
IRA1	I. C. L.	79.90 ±1.052	72.64±1.315 ^c	84.33 ±1.512 ^{bc}	82.76 ±1.759 ^{ab}	79.88 ±1.386 ^{ab}	86.25 ±1.776 ^{ab}	83.31±1.375 ^{ab}
IRA3	I. C. L.	83.48 ±1.052	75.92±1.337 ^{abc}	80.81 ±1.538 ^c	72.73 ±1.759 ^b	85.89 ±1.687 ^c	90.44 ±1.256 ^{ab}	82.34±1.338 ^b
IRA11	I. C. L.	83.50 ±1.052	78.76±1.396 ^{abc}	82.61 ±1.776 ^{bc}	86.68 ±1.488 ^a	81.65 ±1.687 ^{ab}	88.94 ±1.256 ^{ab}	84.79±1.481 ^{ab}
IRA9	I. C. L.	82.36 ±1.103	78.62±1.315 ^{abc}	83.67 ±1.512 ^{bc}	84.11 ±1.488 ^a	84.30 ±1.687 ^{ab}	89.85 ±1.776 ^{ab}	85.65±1.338 ^{ab}

^{a,b} میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P<0.05$).

^۱ میانگین چهار نسل آخر

^۲ جفت دادن تصادفی پروانه

^۳ روش سطوح حذفی مستقل

^{a, b} Least-squares means with different superscripts within the same column differ significantly ($P<0.05$)

¹ Average of last four generation (G2, G3, G4 and G5)

² Random Matting

³ Independent Culling Level

جدول ۶ - میانگین حداقل مربعات صفت تعداد پیله در لیتر در تمامی لاین‌ها و ترکیب‌های ژنتیکی تولید شده از نسل صفر تا نسل پنجم

Table 6- Least-squares means for cocoon number/litre among silkworm lines and their crossing from G0 to G5

نوع ژنوتیپ Genotype	روش انتخاب Selection Method	میانگین حداقل مربعات تعداد پیله در لیتر Least-squares means of cocoon number/litre						Average ¹
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	
31	No Selection (R.M.) ²	81.50 ±1.103	118 ±1.243 ab	122 ±1.184 ab	133 ±1.613 ab	142 ± 1.380 a	130 ±1.407 ab	134 ±1.150 a
103	No Selection (R.M.)	84.75±1.369	119 ±1.243 a	120 ±1.184 abc	138 ±1.555 a	135 ± 1.380 a	120 ±1.702 bcd	131 ±1.636 ab
151	No Selection (R.M.)	83.23 ±1.103	119 ±1.243 abc	125 ±1.335 a	131 ±1.555 ab	126 ±1.097 abc	133±1.702 a	129 ±1.121 abc
153	No Selection (R.M.)	85.27 ±1.052	116 ±1.885 bc	119 ±1.335 bc	125 ±1.613 bc	107 ± 1.097 d	122 ±1.407 abcd	118 ±1.216 cd
1524	No Selection (R.M.)	80.97 ±1.835	114 ±1.885 bc	119 ±1.567 bc	131 ±1.555 ab	137± 1.380 ab	127 ±1.407 abc	129 ±1.680 abc
IRA5	I. C. L. ³	111 ±1.268	114 ±1.243 bc	120 ±1.089 bc	126 ±1.613 bc	123 ±1.380 bcd	115±1.607 cd	121 ±1.210 bcd
IRA7	I. C. L.	107 ±1.774	115 ±1.243 bc	120 ±1.089 bc	123 ±1.613 c	110 ±1.380 cd	107 ±1.702 d	115 ±1.636 d
IRA1	I. C. L.	116 ±1.268	114 ±1.885 bc	119 ±1.567 bc	124 ±1.555 c	121 ±1.097 bcd	119 ±1.702 bcd	121 ±1.136 bcd
IRA3	I. C. L.	112 ±1.268	112 ±1.243 c	117 ±1.184 c	120 ±1.613 c	119 ±1.097 bcd	112 ±1.407 cd	117 ±1.241 cd
IRA11	I. C. L.	114 ±1.268	112 ±1.243 c	123 ±1.522 ab	127 ±1.613 bc	121 ±1.380 bcd	115 ±1.407 cd	122 ±1.636 bcd
IRA9	I. C. L.	115 ±1.636	117 ±1.885 ab	125 ±1.567 a	127 ±1.613 a	126 ± 1.380 abc	115 ±1.407 cd	123 ±1.387 bcd

a, b میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).^۱ میانگین چهار نسل آخر^۲ جفت دادن تصادفی پروانه^۳ روش سطوح حذفی مستقلa, b Least-squares means with different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)¹ Average of last four generation (G2, G3, G4 and G5)² Random Matting³ Independent Culling Level

جمعیت های انتخابی (به ترتیب ۱۰۸/- گرم در نسل، ۰۲۹/- گرم در نسل و ۳۷۹/- درصد در نسل) بود ($P < 0.01$). همچنین در تحقیقی دیگر سه نسل انتخاب در دو لاین تجاری کرم ابریشم بر مبنای انتخاب انفرادی برای وزن پیله (A) و وزن قشر پیله (B) بررسی شد (۱۰). نتایج نشان داد جهت بهبود میانگین وزن پیله در کوتاه مدت، استراتژی A کارآمد می‌باشد و اگر هدف بهبود صفت وزن قشر پیله در آمیخته‌ها باشد، استراتژی B می‌تواند قابل توصیه باشد. همچنین استراتژی A باعث بالا بردن درصد پیله‌های خوب شد.

به غیر از چین در تعداد معدودی از کشور های دیگر نظیر هند نیز برنامه ها و تحقیقات اصلاح نژادی اجراء می شود البته با این ویژگی که در این کشور از واریته های کرم ابریشم چندنسلی و دو نسلی استفاده می شود (۱، ۳). محققان برخی خصوصیات چند واریته خالص کرم ابریشم و آمیخته‌های مربوط را مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل نشان داد لاین‌های خالص چند نسله نسبت به لاین‌های خالص دو نسله تغییر کمتری در وزن پیله دارند (۱۲). در تحقیقی اثر

طرح های بهنژادی مبتنی بر انتخاب درون نژادی در گذشته نیز در ایران انجام شده است. انتخاب به روش سطوح حذفی مستقل در دو لاین ۱۰۳ و ۱۰۴ طی سال های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۰ منجر به بهبود صفت در صد سفیرگی (شاخص ماندگاری) شد (۴). محققین روش شاخص انتخاب سه صفتی را برای مدل‌های مختلف شاخص انتخاب بررسی و بیان داشتند که شاخص خانوادگی بازده اقتصادی بیشتری داشته و می تواند در برنامه انتخاب استفاده شود (۷). اثر انتخاب انفرادی بر اساس وزن پیله بر روند ژنتیکی و فنوتیپی صفات اقتصادی شش واریته کرم ابریشم ایران بررسی شد (۱۴). نتایج آن بررسی نشان داد که پاسخ به انتخاب انفرادی رابطه مستقیمی با وراثت پذیری لاین ها داشت و اجرای برنامه های انتخاب، علاوه بر اثرات ژن های افزایشی، اثرات ژنتیکی غیرافزایشی نیز تأثیر مثبتی بر روی بهبود فنوتیپی صفات دارند. روند فنوتیپی صفات وزن پیله، وزن قشر پیله و در صد قشر پیله در جمعیت های غیر انتخابی (به ترتیب ۰۶۱/- گرم در نسل، ۰۱۸/- گرم در نسل و ۳۱۴/- در صد در نسل) بالاتر از

کرم ابریشم به همراه ۱۳ آمیخته مربوطه برر سی شد (۲). آنها ضمن تایید وجود اختلاف در بین این واریته‌ها عنوان کردند لاین دو نسله KA و آمیخته‌های دو نسله سینگل کراس NB18×Saniish18 و NB18×J122 در مورد سه صفت از پنج صفت مورد بررسی بیشترین عملکرد را داشتند.

شش نسل انتخاب انفرادی و توده‌ای بر روی شش نژاد کرم ابریشم و برای چهار صفت وزن قشر پيله، وزن پيله، طول نخ و درصد شفیرگی مقایسه شد (۱۶). نتایج نشان داد که انتخاب انفرادی به طور معنی دار عملکرد سه صفت وزن پيله، وزن قشر پيله و طول الیاف را بهبود داد. در پژوهشی دیگر عملکرد یک لاین چند نسله و پنج لاین دو نسله

جدول ۷ - میانگین حداقل مربعات صفت وزن پيله در لیتر در تمامی لاین‌ها و ترکیب‌های ژنتیکی تولید شده از نسل صفر تا نسل پنجم

Table 7- Least-squares means for cocoon weight/litre (g) among silkworm lines and their crossing from G0 to G5

نوع ژنوتیپ Genotype	روش انتخاب Selection Method	میانگین حداقل مربعات وزن پيله در لیتر Least-squares means of cocoon weight/litre (g)						
		G0	G1	G2	G3	G4	G5	Average ¹
31	No Selection (R.M.) ²	184.52 ±1.736	189.57 ±1.805 ^{bc}	193.68 ±1.648 ^{cd}	180.45 ±1.484 ^{cd}	199.90 ±1.065 ^{de}	183.16 ±1.965 ^{de}	189.30 ±1.387 ^{cde}
103	No Selection (R.M.)	190.90 ±1.368	200.85 ±1.858 ^{ab}	200.83 ±1.994 ^{bcd}	193.00 ±1.878 ^{bc}	200.94 ±1.582 ^{de}	199.49 ±1.218 ^{ab}	198.57 ±1.811 ^{bcd}
151	No Selection (R.M.)	178.69 ±1.368	200.85 ±1.930 ^{ab}	211.42 ±1.549 ^a	211.46 ±1.484 ^a	211.51 ±1.065 ^{abc}	200.31 ±1.218 ^a	208.68 ±1.658 ^a
153	No Selection (R.M.)	179.98 ±1.907	188.84 ±1.805 ^{bc}	190.75 ±1.891 ^d	177.27 ±1.484 ^d	176.56 ±1.582 ^e	179.85 ±1.965 ^e	181.04 ±1.387 ^e
1524	No Selection (R.M.)	187.581 ±1.907	192.25 ±1.858 ^{abc}	191.95 ±1.648 ^d	198.18 ±1.878 ^{ab}	223.16 ±1.582 ^a	193.98 ±1.218 ^{abc}	201.82 ±1.756 ^{bc}
IRA5	I. C. L. ³	181.99 ±1.368	188.33 ±1.858 ^{bc}	192.42 ±1.459 ^d	186.25 ±1.878 ^{bcd}	200.85 ±1.065 ^{cd}	188.23 ±1.218 ^{bcd}	191.94 ±1.451 ^{cde}
IRA7	I. C. L.	185.78 ±1.044	198.30 ±1.930 ^{ab}	197.42 ±1.698 ^{bcd}	180.153 ±1.484 ^{cd}	190.83 ±1.065 ^{de}	196.82 ±1.218 ^{ab}	191.19 ±1.771 ^{cde}
IRA1	I. C. L.	197.87 ±1.368	201.30 ±1.858 ^{ab}	205.61 ±1.459 ^{ab}	196.82 ±1.484 ^{abc}	206.33 ±1.582 ^{bc}	200.63 ±1.965 ^a	202.35 ±1.387 ^{bc}
IRA3	I. C. L.	181.11 ±1.368	195.98 ±1.805 ^{ab}	192.53 ±1.697 ^d	180.31 ±1.878 ^{cd}	186.88 ±1.582 ^{ed}	188.34 ±1.218 ^{bcd}	187.02 ±1.636 ^{de}
IRA11	I. C. L.	188.29 ±1.368	194.79 ±1.805 ^{abc}	203.95 ±1.648 ^{abc}	196.70 ±1.878 ^{abc}	206.31 ±1.582 ^{cb}	199.35 ±1.218 ^{ab}	201.58 ±1.387 ^{bcd}
IRA9	I. C. L.	190.81 ±1.736	182.77 ±1.858 ^{abc}	201.43 ±1.994 ^{abc}	192.77 ±1.484 ^{bc}	203.11 ±1.065 ^{cb}	188.24 ±1.965 ^{bcd}	196.39 ±1.677 ^{cd}

^{a, b} میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

^۱ میانگین چهار نسل آخر

^۲ جفت دادن تصادفی پروانه

^۳ روش سطوح حذفی مستقل

^{a, b} Least-squares means with different superscripts within the same column differ significantly ($P < 0.05$)

¹ Average of last four generation (G2, G3, G4 and G5)

² Random Matting

³ Independent Culling Level

جدول ۸ - تفاوت کلی ژنوتیپ‌های کرم ابریشم برای دو صفت انتخابی بر مبنای انحراف از لاین شاهد مادری در همان سال مربوطه

Table 8- Overall difference between silkworm genotypes for the two selected traits based on deviation from maternal control line in the relevant year

ژنوتیپ Genotype	لاین شاهد Control Line	وزن پيله Cocoon Weight (g)	درصد قشر پيله Cocoon Shell Percentage (%)
IRA9	1524	0.00725 ^b	-1.2750 ^c
IRA7	151	0.01150 ^b	-0.4000 ^{ab}
IRA3	103	0.03000 ^{ab}	0.2800 ^a
IRA11	153	0.05650 ^{ab}	-0.0175 ^{ab}
IRA5	31	0.08475 ^a	-0.6650 ^{bc}
IRA1	103	0.09375 ^a	0.2388 ^a

^{a, b} میانگین‌های هر ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

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

نتیجه آمیزش‌های دی‌آل ۵×۵ تنها ۶ ترکیب جهت معرفی به بانک

در این پروژه اصلاح نژادی از بیست ترکیب ژنتیکی ایجاد شده در

لازم برای صفات مهم اقتصادی کرم ابریشم را دارا بودند. به عبارتی ویژگی های مربوطه به پيله اعم از وزن پيله و اندازه پيله نسبت به لاین های والدینی برتری داشته و می تواند به بانک ژن کرم ابریشم معرفی شود. IRA1 در بیشتر صفات نسبت به والدین برتری داشت. این ترکیب ژنتیکی نسبت به والد مادری برای هر دو صفت وزن پيله و درصد قشر پيله عملکرد قابل قبولی از خود نشان داد و لذا می تواند در ارزیابی های بعدی مورد توجه بیشتر قرار گیرد. IRA3 نیز پاسخ به انتخاب نسبتاً خوبی نشان داد. سایر ترکیب ها از نظر درصد قشر پيله نسبت به والدین برتری قابل توجهی نداشتند. با این وجود عملکرد کمتر در برخی صفات دلیلی بر نامطلوب بودن سویه جدید نمی باشد. زیرا انتخاب بهترین پایه های پدری و مادری (لاین های چینی شکل و ژاپنی شکل) پس از اجراء برنامه هیبریداسیون و برآورد قابلیت ترکیب پذیری خصوصی مشخص خواهد شد.

ژن انتخاب شد. در واقع عملکرد این شش وارسته از نظر صفات مختلف تولید مثلی، تولیدی، ماندگاری و سرعت رشد یکنواخت در طی سه سال اخیر مورد تأیید بودند. زمانی که تعداد لاین ها بیش از ظرفیت آزمایش هیبریداسیون باشد لازم است که شاخص ارزیابی تدوین شود تا تنها شایسته ترین ترکیب های ژنتیکی انتخاب و به بانک ژن معرفی و در برنامه هیبریداسیون شرکت داده شوند؛ به عنوان مثال در تحقیقی (۱۸) سه شاخص برای ارزیابی ۲۰ نژاد دو نسله و چند نسله بانک ژن معرفی شد و یا برای ارزیابی ۱۸ وارسته کرم ابریشم که از مناطق مختلف گردآوری شده بود شاخصی با استفاده از ۱۱ صفت تنظیم شد (۱).

نتیجه گیری کلی

شش ترکیب جدید ژنتیکی در این برنامه اصلاح نژادی حداقل های

منابع

1. Bhat, S. A., M. Farooq, I. L. Khan, F. A. Kukiloo, and K. A. Sahaf. 2018. Selection of the silkworm *Bombyx mori* L. breeding resource material. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7:1612-1617.
2. Govindan, R., R. Narasimharaju., T. K. Narayanaswamy, and R. Munirajappa. 1990. Performance of some single and three-way cross hybrids of silkworm *Bombyx mori* for cocoon traits. Environment and Ecology, 8(3): 860-863.
3. Hosseini Moghaddam S. H. 2013. Principles of Silkworm Rearing. 2nd Edition. University of Guilan Press (In Persian).
4. Hosseini Moghaddam, S. H., N. Emamjomeh Kashan, S. Z. Mirhosseini, and M. R. Gholami. 2005. Genetic Improvement of some traits in four strains of silkworm (*Bombyx mori*). International Journal of Industrial Entomology, 10(2):95-99.
5. Jingade, A., K. Vijayan, P. Somasundaram, G. Srinivasababu, and C. Kamble. 2011. A review of the implications of heterozygosity and inbreeding on germplasm biodiversity and its conservation in the silkworm *Bombyx mori*. Journal of Insect Science, 11(1):1-16.
6. Mirhosseini, S. Z., and A. R. Seidavi. 2011. Iran Silkworm Germplasm Guidence. University of Guilan Press (In Persian).
7. Mirhosseini, S. Z., M. Ghanipoor, A. Shadparvar, and K. Etebari. 2005. Selection indices for cocoon traits in six commercial silkworm (*Bombyx mori* L.) lines. The Philippine Agricultural Scientist, 88: 328 - 336.
8. Mirhosseini, S. Z., S. Nematollahian, M. Ghanipoor, and A. Seidavi. 2010. Comparison of phenotypic and genetic performance of local silkworm groups and two commercial lines. Biological Research, 43: 411-416.
9. Nagaraju, J. 2002. Application of genetic principles for improving silk production. Current Science, 83: 409-414.
10. Nematollahian, S., P. Barzin, S. Z. Mirhosseini, M. Naserani, and A. R. Seidavi. 2013. Estimation of genetic parameters and improvement in the silkworm cocoon weight and shell cocoon weight traits using different goals of individual selection. Novin Genetic, 8(1):11-18. (In Persian)
11. Rahmathulla, V. K., R. Tilak, and R. K. Rajan. 2006. Influence of moisture content of mulberry leaf on growth and silk production in *Bombyx mori* L. Caspian Journal of Environment Science, 4 (1): 25-30.
12. Rao, P. R. M., V. Premalatha, S. Ravindra, K. Vijayaraghavan, and R. Singh. 1997. Variability studies in some pure races and F1 hybrids of the silkworm *Bombyx mori* L. Environment and Ecology, 15: 3, 683-687.
13. Rudolf-Pilih, K., M. Petkovšek, J. Jakše, N. Štajner, J. Murovec, and B. Bohanec. 2019. Proposal of a new hybrid breeding method based on genotyping, inter-pollination, phenotyping and paternity testing of selected elite F1 hybrids. Frontiers in Plant Science, 10:1111.
14. Seidavi, A. R., S. Z. Mirhosseini, A. R. Bizhannia, and M. Ghanipoor. 2008. Effect of parents' selection on the basis of cocoon weight on reproduction and resistance characters at lines of silkworm *Bombyx mori* L. Pajouhsh and Sazandegi, 78: 95-102. (In Persian)
15. Seidavi, A. R., and M. R. Goldsmith. 2014. Comparison of phenotypic value changes in pure lines of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) during consecutive generations following initial selection on cocoon weight. Journal of Insect Science, 14(1):1-6.

16. Shivkumar, M. N., E. Ramya, E. Talebi, and G. Subramanya. 2018. Selection response for the expression of quantitative traits in the mulberry silkworm *Bombyx mori* L. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 7(11): 3456-3474.
17. Singh, T., M. Mohan Bhat, and M. Ashraf Khan. 2011. Critical analysis of correlation and heritability phenomenon in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: bombycidae). Advances in Bioscience and Biotechnology, 2:347-353.
18. Sudhakara Rao, S. P., R. K. Datta, K. M. Vijaya Kumari, and K. M. Ramesh Babu. 2002. Breeding resource materials of silkworm *Bombyx mori* L., adaptive to tropical climates. International Journal of Industrial Entomolgy, 4(2):109-115.
19. Zamani, P., M. Ghanipoor, S. Z. Mirhosseini, R. Abdoli, and A. Seidavi. 2019. Comparison of different selection strategies for mulberry silkworm, *Bombyx mori*. International Journal of Tropical Insect Science, 39: 139–145.
20. Zhao Y., K. Chen, and S. He. 2007. Key principles for breeding spring-and-autumn using silkworm varieties: from our experience of breeding 873×874. Caspian Journal of Environment Science, 5 (1): 57-61.



Rejuvenation and Multiple-Trait Selection in the Five Chinese-Shape of Parental Silkworms

Moineddin Mavvajpoor¹, Seyed Ziaeddin Mirhosseini², Seyed Hossein Hosseini Moghaddam^{3*}, Shahla

Nematollahian⁴, Farjad Rafiee⁵, Navid Ghavi Hossein-Zadeh⁶, Yuosof Kheirkhah⁷

Submitted: 09-08-2020

Accepted: 30-05-2021

Mavvajpoor, M., S. Z. Mirhosseini, S. H. Hosseini Moghaddam, Sh. Nematollahian, F. Rafiee, N. Ghavi Hossein-Zadeh and Y. Kheirkhah. 2021. Rejuvenation and Multiple-Trait Selection in the Five Chinese-Shape of Parental Silkworms. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):463-474.

Introduction Introducing new commercial lines is one of the goals of silkworm breeding centers in the world. Iran has the potential to introduce new lines for hybrid silkworm production due to its silkworm genetic resources and silkworm egg production technology. The performance of productive, reproductive and viability traits in the parental silkworms, including Japanese-shaped and Chinese-shaped lines, changes after several years for various reasons, including inbreeding. Therefore, after a few years, it is necessary to introduce new silkworm strains. Most silkworm breeding schemes in most of the countries are based on the introduction of the Chinese and Japanese-shaped lines to make commercial silkworm hybrid.

Material and Methods Five Japanese - shape lines of silkworms named 31, 103, 151, 153, and 1524 were selected from silkworm germplasm of Iran Silk Research Center in the spring of 2012. All genetic combinations obtained by using the diallel method of mating system (20 crosses) were reared in autumn 2012 and spring 2013. After two generations of mass rearing in each genetic combination, the reciprocal crosses in the diallel design were mixed to establish the basic generation of this breeding scheme. The selection program was based on independent culling levels (I.C.L.) method applied from 2014 to 2019 in the selected group. At the same time, all parental lines were reared as control by using a random mating system. Of the 10 genetic compounds, six combinations were retained and the rest were rejected. In this breeding program, due to the necessity of eliminating weak families, family selection, and individual selection were both used simultaneously. In the present study, the productive traits of cocoon weight, cocoon shell percentage, good cocoon percentage, number of cocoons per liter, and cocoon weight per liter were compared simultaneously in the genetic combinations and control lines. Two-factor analysis of variance (including 6 genotypes and 5 years) was performed in a completely randomized design with six replications; then the results were analyzed using SAS statistical software.

Result and Discussion In general, the effects of genotype, year and interaction effect of genotype and year were significant for all studied traits. Based on the average performance of each trait during selection program from 2016 to 2019 years (average performance of G2, G3, G4 and G5 generations), the cocoon weight in the combinations of

1- MSc, Researcher of Iran Silkworm Research Center, Guilan, Iran.

2- Professor, Department of Animal Science and Department of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

3- Associate professor, Department of Animal Science and Department of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

4- MSc, Research Instructor, Academic staff of Iran Silkworm Research Center, Guilan, Iran.

5- Assistant professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

6- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

7- Researcher of Iran Silkworm Research Center, Guilan, Iran.

(*- Corresponding author email: hosseini@guilan.ac.ir)

DOI:10.22067/ijasr.2021.38311.0

IRA1, IRA11 and IRA7 was more than the parental lines. This advantage was also seen in the trait of cocoon weight per liter. For the cocoon shell percentage, none of the genetic combinations in all the studied years were completely superior to parents. The response to selection for cocoon weight based on deviation from the maternal control line in IRA5 and IRA1 was positive and significant. The two genetic compounds, IRA1 and IRA3, whose parent was 103, had the highest genetic progression for cocoon shell percentage. Due to the superiority of the good cocoons percentage in IRA1, this genetic combination performed well in terms of cocoon economic traits. IRA9, whose cocoon weight gain was lower than the others, not only did not show any improvement in cocoon shell weight compared to the parent during these years, but also showed the lowest amount compared to other genetic combinations.

Conclusion The six new genetic compounds in this breeding program had the minimum requirements for the economically important traits of the silkworm. In other words, cocoon-related characteristics such as cocoon weight, good cocoon percentage of each family, and cocoon size are superior to all parental lines, then they could introduce to the silkworm gene bank. IRA1 was superior to parents in most of the studied traits. This genetic combination showed the best performance compared to the parent for both cocoon weight and cocoon shell percentage. Therefore it can be considered more in subsequent evaluations. IRA3 also responded relatively well. Other new genetic combinations did not have a significant advantage over their parents in terms of cocoon shell percentage. However, lower performance in some traits is not a reason for the new strain to be undesirable. Because the selection of the best paternal and maternal lines (Chinese-shaped and Japanese-shaped lines) will be determined after that the hybridization program was carried out to produce all hybrids and then the best hybrids were selected based on estimation of specific combining ability for all important traits.

Keywords: Genetic combinations, Independent culling levels method, Random mating, Selection, Silkworm.

Contents

Ruminant Nutrition

- Interaction effect of soy oil and alfalfa hay in starter diet of Holstein dairy calves on performance, growth indices, ruminal fermentation and blood metabolites** 333
 Abazar Karimi, Younes Alijoo, Mahdi Kazemi-Bonchenari, Mmahdi Mirzaei and Hassan Sadri
- Different levels of clove and savory essences on fermentative parameters in gas production technique and their antimicrobial effects on *Peptostreptococcus anaerobius* bacteria isolated from rumen** 348
 Hojat Imani Moghadam, Samaneh Ghasemi, Saeid Sobhanirad and Mehdi Behgar

Poultry Nutrition

- Effect of mummy powder and *Pulicaria gnaphalodes* extract on growth performance, immune system and intestine morphology of broiler chickens** 367
 Faezeh Ahmadzadeh, Seyyed Javad Hosseini-Vashan, Nazar Afzali and Ali AllahRessani
- Determination of Metabolizable Energy of Corn Processed at Different Temperatures and Effect of their Inclusion in Mash Diets with and without Enzyme Supplementation on Growth Performance and Small Intestine Morphology of Broiler Chickens During 1-24 days** 387
 Mohsen Teymouri, Ahmad Hassanabadi, Hassan Nasiri-Moghaddam and Abolghasem Golian
- The effects of *in ovo* injection of synbiotic on hatchability, chick quality, blood indices and performance of newly hatched chicks of Japanese Quail** 403
 Shadieha Asaadi, Mohsen Daneshyar and Younes Alijoo
- Evaluation of performance, nutrients digestibility, and immune system responses in broiler chickens fed on wheat-based diet supplemented with different levels of vitamin A** 415
 Soghra Hatami, Mohammad Reza Akbari and Fariborz Khajali
- Comparing Effect of Lysine-HCl and Biolys-Sulfate on Broiler Chickens Performance, Immune Response, Blood Metabolites and Bone parameters** 427
 Hadis Heydari, Ali Khatibjoo, Farshid Fattahnia, Mohammad Akbari-Gharaei and Hassan Shirzadi

Genetic and Breeding

- Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics** 439
 Mahsa Zabetian, Mohammadreza Nassiri, Ali Javadmanesh and Shahrokh ghovati
- Estimation of genetic and phenotypic parameters of logistic growth curve and their inter-relationship in Zandi Sheep** 450
 Saeid Neysi, Hedayatollah Roshanfekr, Jamal Fayazi and Morteza Mamouei
- Comparison of principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of principal component (DAPC) methods for analysis of population structure in Akhal-Take, Arabian and Caspian horse breeds using genomic data** 461
 Nasrin Babaei, Abbas Rafat, Mohammad Hossein Moradi and Mohammad Reza Feizi Derakhshi
- Rejuvenation and Multiple-Trait Selection in the Five Chinese-Shape of Parental Silkworms** 473
 Moineddin Mavvajpoor, Seyed Ziaeddin Mirhoseini, Seyed Hossein Hosseini Moghaddam, Shahla Nematollahian, Farjad Rafiee, Navid Ghavi Hossein-Zadeh and Yuosof Kheirkhah

« Scientific Journal »
Iranian Journal of Animal Science Research

Vol. 13

No. 3

Fall 2021

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>