دانشگاه فردوسی مشهد

نشریه علمی
پژوهشهای علوم دامی ایران

جلد ۱۴ شماره ۳

سال ۱۴۰۱

(شماره پیاپی: ۵۱)

شاپا: ۳۱۰۶-۲۰۰۸

عنوان مقالات

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 ۸۹/۴/۳۰از 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 ۱۴ شماره ۳ پاییز ۱۴۰۱

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

نشانی: **مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، دبیرخانه نشریات علمی، دفتر نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران. صندوق پستی ۱۱۶۳- ۹۱۷۷۵**

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 می‌شود

اسامی ارزیابان جلد ۱٤ شماره ۳ (پاییز ۱٤۰۱) نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران (به ترتیب الفبا)

دکتر محمد جواد آگاه	مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس
دکتر سید هادی ابراهیمی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر علیرضا ایوبی	دانشگاه تهران
دکتر فاطمه بحری بیناباج	دانشگاه گنبد کاووس
دکتر عطیه بهلولی قائن	دانشگاه پیام نور مشهد
دکتر جواد بیات کوهسار	دانشگاه گنبد کاووس
دکتر گلناز تاسلی	مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرکرد
دکتر سید جواد حسینی واشان	دانشگاه بیرجند
دکتر علی خطیب جو	دانشگاه ایلام
دکتر مسعود دیدارخواه	آموزشکده کشاورزی سرایان
دکتر زهرا رودباری	دانشگاه جیرفت
دکتر علی اصغر ساکی	دانشگاه بوعلی سینا همدان
دکتر مهدی سلطانی	مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی
دکتر عبدالمنصور طهماسبی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر امیرحسین علیزاده قمصری	موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
دکتر امیرهوشنگ فلاح راد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر تقی قورچی	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر شاهرخ قوتی رودسری	دانشگاه گیلان
دکتر رضا مجیدزاده هروی	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر شهریار مقصودلو	دانشگاه گنبد کاووس
دکتر خدیجه نصیری	دانشگاه مازندران
دکتر محمد علی نوروزیان	دانشگاه تهران- پردیس ابوریحان

بسم الله الرحمن الرحیم

مندرجات

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 گردهمائی‌های علمی یا چاپ بصورت چکیده در مجلات علمی بلامانع است. **توجه به شیوه نامه ذیل کاملا ضروری است:**

- ✓ مقاله‌ای که بر اساس دستورالعمل نشریه تهیه نشده باشد، در جلسه هیئت تحریریه مطرح نمی‌شود.
- ✓ مقاله‌ها 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 می‌گردد. نویسنده مسئول باید اصلاحات خواسته شده را ظرف مدت ۳ روز با نرم افزارMicrosoft 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 نمی‌باشد.
- ✓ عدم رعایت شیوه نامه فوق موجب تأخیر در پذیرش و رفت و برگشت‌های مکرر و زمان‌بر 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 وPDF 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 نویسنده (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، ویرگول و ... به درستی استفاده شود.
- ✓ رعایت نیم فاصله در کلمات ترکیبی و جمع مانند اندازه‌گیری، شده‌اند، می‌شود، می‌توان، نکته‌ها و ... ضروری است.
- ✓ معادله‌ها در متن مقاله باید به ترتیب از ابتدا تا انتها شماره‌گذاری شوند.
- ✓ واحدهای مورد استفاده در متن مقاله باید بر اساس سیستم بین‌المللی متریک (SI) باشد.
- ✓ تعداد پاورقی ها به حداقل برسد و شماره پاورقی‌ها در هر صفحه از عدد یک آغاز شود.

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 وچکیده مبسوط انگلیسی می باشند. بخشهای پیشنهادات و سپاسگزاری بصورت اختیاری و کاملاً خلاصه شده می توانند به متن مقاله پس از بخش نتیجه گیری کلی اضافه شوند.

۱- عنوان

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

۲- چکیده فارسی

چکیده فارسی باید حداکثر در ۲۵۰ کلمه تهیه شود. در این بخش مقاله اهداف عمده، مواد و روشها، نتایج و کاربردهای شاخص بصورت خلاصه و گویا ذکر شوند. از ذکر علائم آماری چون (P<۰/۰۵) 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.

٤- 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.

٥- 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. درصورت لزوم جهت معرفی تیمارها و یا روشهای خاص آزمایش می توان از جدول یا شکل استفاده کرد.

٦- 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.

٦-۱- نحوه تهیه جدول ها و شکل ها

٦-۱-۱- جدول

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

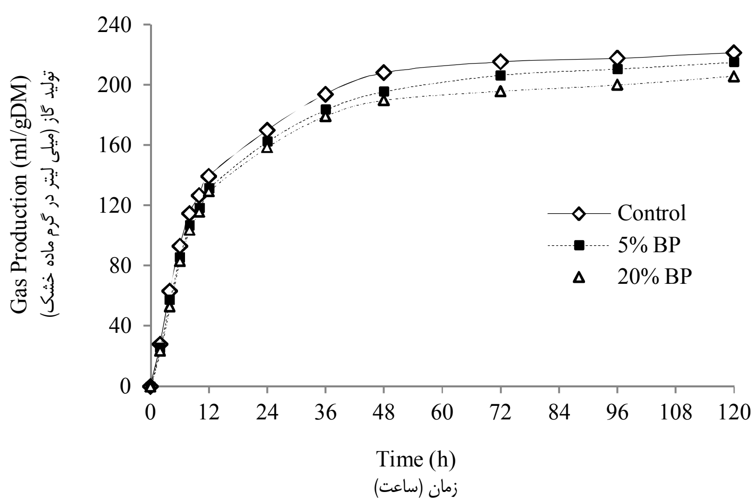
متابولیتهای پلاسما Plasma metabolites	جیره های آزمایشی Experimental diets				*P-value*		
	Alfalfa	5% BP[1]	20% BP	SEM	*treat*	*time*	*Treat × time*
گلوکز Glucose (mg/dl)	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
نیتروژن اوره ای خون BUN (%)[2]	10.0	10.0	10.0	10.0	0.002	0.002	0.002
آسپارتات آمینو ترانسفراز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

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

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).
[1]By-Products were used instead of alfalfa in 5 and 10 % based on dry matter intake.
[2]Blood urea nitrogen
[3]Aspartate Aminotransferase
[4]Alanine Aminotransferase
[5]Low density lipoprotein

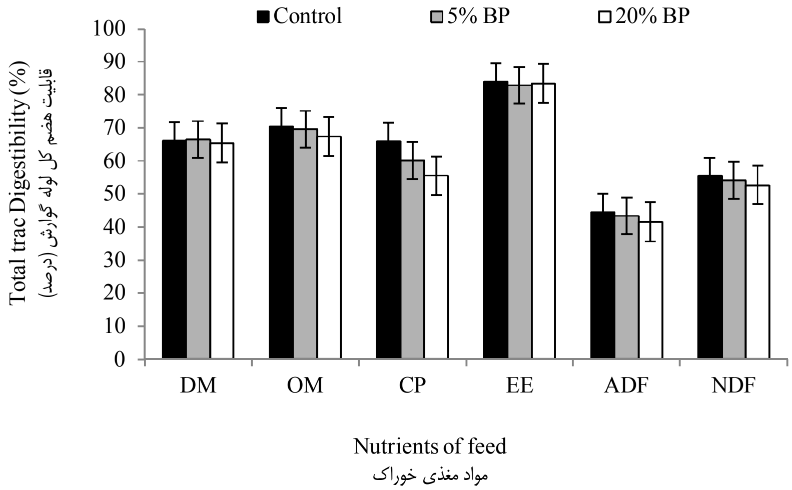
٦-١-٢- شکل

- ✓ **الگوی شکل باید دقیقا 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 Ruman با اندازه ۱۰ باشد. زیرنـویس با اندازه فونت ۹ نوشته شود. در کل شکل **فقط عبارت شکل و شماره آن** پررنگ باشد و عنوان و توضیح شکل به صـورت 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 می توان از علائمی نظیر (♦, ◊, ▲,△, + ●, ○, ■, □) استفاده کرد.
- ✓ از آوردن کادر دور شکل و خطوط طولی در شکل خودداری شود.
- ✓ سعی شود با نرم افزار Excle روی شکلها به خوبی کار شود تا بالاترین کیفیت برای شکلها بدست آید.



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

Figure 1- Effects of different levels of by-productsin 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-productsin 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 آمـده از تحقیـق بـرای 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 (گـان) در کلیـه مراحل قبل از پذیرش نهایی از اضافه کردن این بخش به مقاله خودداری نمایند.

۹-منابع

الف) ارجاع به منابع

نحوه رجوع منابع در متن به‌صورت اسم نویسنده (نویسندگان) و تاریخ انتشار منبع باشد. در ارجاع به منابع باید تا حد ممکن از نام بردن افراد در شروع جمله خودداری و منابع در انتهای جمله و در پرانتز ارائه شوند.

- مثال برای ارجاع به منبعی که فقط یک نویسنده دارد:(Naserian, 2008)
- برای منبعی با دو نویسنده از کلمه "and" بین آن‌ها به‌صورت زیر استفاده شود:

(Naserian and Valizadeh, 2009)

- برای مقاله‌ای با بیشتر از دو نویسنده از کلمه ایتالیک "*et al*." به‌صورت زیر استفاده شود:

(Naserian *et al.,* 2008)

- هنگام ارجاع همزمان به چند منبع از علامت ";" به‌صورت زیر استفاده شود:

(Naserian, 1999; Naserian *et al*., 2008; Naserian and Valizadeh, 2009)

- زمان ارجاع به رفرنس در ابتدا یا وسط جمله مشابه مثال زیر استفاده شود:
- ناصریان و همکاران (Naserian *et al.,* 2010)

- کلیه منابع فارسی و انگلیسی به زبان انگلیسی و با قلم Times New Roman اندازه ۱۲در فهرست منابع نوشته شوند.
- همواره در نوشتن نام نشریات و منابع، اسم کامل آن‌ها آورده شود و از اسامی کوتاه شده آن‌ها استفاده نشود.
- از ذکر منابع بی‌نام و غیر قابل دسترس خودداری شود.
- **تمامی ارجاعات داخل متن باید به رفرنس مربوطه لینک شوند.**
- **درج شناسه DOI (درصورت وجود) در انتهای هر رفرنس الزامی است.**

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 شماره‌گذاری شود. وقتی از چند اثر مختلف یک نویسنده استفاده می‌شود، ترتیب شماره‌گذاری این مقاله‌ها 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. سال‌های شمسی به میلادی تبدیل شوند. در برگردان اسامی افراد اطمینان حاصل شود که املاء آن‌ها و سال انتشار درست باشد. لازم است برای برگردان صحیح اسامی و عنوان مقالات و دیگر منابع به پایگاه‌های اطلاعاتی مثل SID، irandoc، Sciencedirect و غیره مراجعه شود و یا رأساً با شخص مورد نظر تماس گرفته شود.**

- ضروری است در انتهای منابع فارسی که به انگلیسی برگردان شده است عبارت In Persian در انتهای منبع داخل پرانتز ذکر شود).

۹-۱- نکات مهم درمورد نوشتن منابع

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

به مثالها توجه نمایید:

۹-۱-۱- نشریه های علمی

1. Lane, M. A., R. L. Baldwin, and W. Jesse. 2011. Sheep rumen metabolic development in response to different dietary treatment. Journal of Dairy Science, 78(Supp1.1):310(Abstr).
2. Tyrrell, H. F., and P. W. Moe. 2008. Effect of intake on digestive efficiency. Journal of Dairy Science, 58:1151-1163.
3. Ansari-Renani, H., M. Salehi, Z. Ebadi, and S. Moradi. 2010. Identification of hair follicle characteristics and activity of one and two humped camels. Small Ruminant Research, 90(1):64-70.
4. Akbari, M., and H. R. Afshari. 2014. Mapping of transcription factor binding Region of kappa casein (CSN3) gene in Iranian Bacterianus and Dromedaries camels. Iranian Journal of Animal Science Research, 6(4):57-65. (In Persian).
5. Karimi, M. A., M. C. Esfahan, G. Hisseini, and M. Rezaei. 2012. Effect of glutamic acid on broiler given sub marginal crude protein with adequate essential amino acids using feeds high and low in potassium. Iranian Journal of Animal Science Research, 5(2):17-25. (In Persian).

۹-۱-۲- کتاب ها

6. AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

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

۹-۱-۳- همایش ها

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

۹-۱-٤- 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.**

۱۰- چکیده انگلیسی

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

- ✓ ابتدای واژه‌های اصلی عنوان انگلیسی مقاله و کلمات کلیدی با حروف بزرگ نوشته شود.
- ✓ از ذکر اسامی و آدرس نویسندگان به انگلیسی در بخش چکیده مبسوط خودداری گردد.

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

Introduction Text type here. Text type here.

Materials and Methods Text type here. Text type here.

Results and Discussion Text type here. Text type here.

Conclusion Text type here. Text type here.

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

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 305-315

The Effect of Flaxseed Oil Supplementation and Injection of Vitamins (A, D_3, E) on the Performance and Blood Metabolites of Suckling Calves

Mehrdad Movahed Nasab[1], Abdolmansour Tahmasbi[1]*, Seyed Alireza Vakili[2], Abbas Ali Naserian[2]

Received: 08-05-2021
Revised: 27-10-2021
Accepted: 02-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Movahed Nasab, M., Tahmasbi, A. M, Vakili, S. A. R., & Nasserian, A.A. (2022). The effect of flaxseed oil supplementation and injection of vitamins (A, D_3, E) on the performance and blood metabolites of suckling calves. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 305-315.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.70050.1020

Introduction: Proper nutrition management during calf rearing is one of the most important factors which influence herd profitability. Environmental stressors and immature immune system of calves, reduce the viability of the animal. Today, attempts are being made to increase immune system postnatal calf life in various ways. Supplying unsaturated fats, which have double bonds on their structure, in starter diet, is one of the suggested solutions to improve the calf's immune system. Neonata ruminants do not have the ability to biosynthesize fat-soluble vitamins (A, D_3, E), while these vitamins play a major role in the animal's immune system and their performance. Supplying fat-soluble vitamins in the calves' diets is critical for the normal growth of muscles and the body skeleton, as they have an improvement role to improve the immune system in animals. The common symptoms of a fat soluble vitamin deficiency in suckling calves are growth retardation, coarse hair, and susceptibility to infectious diseases.

Materials and Methods: In this experiment, twenty eight Holstein female calves with an average weight of 37.74 kg (± 4/76) were used from birth to 56 days. After birth claves were separated from their dam and after weighing they transferred to individual pen. On the fourth day, the calves were randomly assigned to one of four treatments. All calves received colostrum for the first 3 d and then whole milk at 8% of bodyweight in the two equal part in the morning (4.00 A.M) and evening (16 P.M) until weaning. The experimental treatments included: 1) control: whole milk with starter 2) control diet supplemented with flaxseed oil (0.3ml per kilogram of body weight) 3) control diet and weekly injection of 7 cc of fat-soluble vitamins (A, D_3, E) 4) The control diet which supplemented with flaxseed oil (0.3ml per kilogram of body weight) plus weekly injection of 7 cc of fat-soluble vitamins. Flaxseed oil was mixed into milk (morning feeding) until weaning. During the experiment period, calves had ad libitum access to chopped alfalfa hay and starter diet. Water from a plastic bucket (7 liters), filled twice a day, and was provided throughout the study. Composition of starter did not change throughout the experiment. Starter intake was recorded daily. Body weight gain determined weekly until the end of experiment. Fecal consistencies were scored twice a day. Blood sample were harvested from jugular vein for collection of blood serum. Blood metabolites, glucose, cholesterol, triglycerides were analyzed using commercially available colorimetric and enzymatic assay kits. Data were analyzed using SAS version 9.4 as a randomized completely randomized design experiment. For all results, significant differences between treatments were reported at $P \leq 0.05$ and tendencies were reported at $0.05 < P \leq 0.10$. Least square means for each treatment are reported in the tables and were separated using Tukey's test.

Results and Discussion: The results of this study showed that the use of flaxseed oil and injection of fat-soluble vitamins during pre-weaning period had no significant effect on the starter feed intake, daily weight gain, rectal temperature and skeletal growth parameters of calves.

Serum concentrations of total protein, triglyceride, creatinine and urea were not affected by experimental treatments. Claves received flaxseed oil and fat soluble vitamins injection tended to have the lowest serum glucose concentration ($P<0.10$). Calves received flax seed oil and fat soluble vitamins injection had the highest cholesterol

1- M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2-Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author Email: tahmasebi@um.ac.ir

concentration.

Conclusion: The results of this study indicated that inclusion of flaxseed oil and injection of fat-soluble vitamins (A, D, E) had no any marked effects on weight gain, daily feed intake and skeletal bone growth.

Keywords: Calf, Fat-soluble vitamins, Flaxseed oil, Unsaturated fatty acids.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر مکمل روغن کتان و تزریق ویتامین‌های (A, D_3, E) بر عملکرد و متابولیت‌های سرم گوساله‌های ماده شیرخوار

مهرداد موحد نسب[1]، عبدالمنصور طهماسبی*[2]، سید علیرضا وکیلی[2]، عباسعلی ناصریان[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۱

موحد نسب، م.، طهماسبی، ع.، وکیلی، س. ع. ر.، و ناصریان، ع. ع. (۱۴۰۱). اثر مکمل روغن کتان و تزریق ویتامین‌های (A, D_3, E) بر عملکرد و متابولیت‌های سرم گوساله‌های ماده شیرخوار. *پژوهش‌های علوم دامی* ایران، *۱۴*(۳)، ۳۱۵-۳۰۵.

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر روغن دانه کتان و ویتامین‌های محلول در چربی (E, D_3, A) بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی گوساله‌های شیرخوار، آزمایشی با استفاده از ۲۸ رأس گوساله شیرخوار ماده هلشتاین اجرا شد. در این آزمایش، گوساله‌ها در سن چهار روزگی به‌صورت کاملاً تصادفی به یکی از چهار تیمار مورد آزمایش اختصاص داده شدند. تیمارهای مورد آزمایش شامل: ۱) شیرکامل همراه با استارتر آغازین (شاهد) ۲) جیره شاهد مکمل شده با روغن کتان (۰/۳میلی لیتر به‌ازای هر کیلو وزن بدن)، ۳) جیره شاهد و تزریق هفته‌ای هفت سی‌سی ویتامین محلول در چربی ۴) جیره شاهد مکمل شده با روغن کتان (۰/۳ میلی لیتر به‌ازای هر کیلو وزن بدن) و تزریق هفته‌ای هفت سی‌سی ویتامین محلول در چربی. نمونه‌های خون در روزهای ۱، ۱۴، ۲۸، ۵۶ روزگی (زمان از شیر گیری) از سیاه رگ گردنی جمع‌آوری شد. نتایج نشان داد که تیمارهای آزمایشی تأثیری بر مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه، بازده خوراک و رشد اسکلتی نداشت. غلظت پارامترهای سرم خونی مانند گلوکز، پروتئین تام، کراتنین، تری گلیسیرید و اوره سرمی خون تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان می‌دهد که استفاده از اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه روغن دانه کتان و یا تزریق ویتامین محلول در چربی نه تنها هیچ تأثیر سوئی بر عملکرد گوساله‌ها نداشت، بلکه سبب بهبود برخی از متابولیت سرمی نیز شد.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب غیراشباع، روغن کتان، گوساله‌های شیرخوار، ویتامین‌های محلول در چربی.

مقدمه

موفقیت یک واحد پرورشی گاو شیری منوط به جایگزین نمودن گوساله‌ها و تلیسه‌های با کیفیت، در گله می‌باشد. لذا مدیریت و تغذیه صحیح در پرورش گوساله‌های شیرخوار جایگزین از مهم‌ترین ارکان در سود آوری گله می‌باشد (Quigley *et al*., 2006). در بدو تولد و در طی دوران شیرخوارگی به‌دلیل وجود عوامل استرس‌زای محیطی و نیز عدم تکامل سیستم ایمنی، قدرت زنده‌مانی حیوان به‌شدت تقلیل می‌یابد. از طرفی، در این دوره سیستم آنزیمی حیوان کامل نبوده و لذا قادر به استفاده از برخی مواد نمی‌باشد. خوراندن آغوز با کیفیت به گوساله‌ها در اولین ساعات زندگی، از مهم‌ترین راهکارهای مناسب و ضروری برای انتقال ایمنی غیرفعال به گوساله شیرخوار می‌باشد. امروزه سعی می‌گردد که به روش‌های مختلفی توانایی سیستم ایمنی در گوساله‌های شیرخوار را افزایش دهند (Godden *et al*., 2009).

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

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

(*- نویسنده مسئول: (Email: tahmasebi@um.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2021.70050.1020

استفاده ازچربی‌های غیراشباع که دارای دو باند دوگانه می‌باشد، از راهکارهای پیشنهادی برخی از محققین در بهبود سیستم ایمنی نوزاد حیوانات می‌باشد (McDonnell *et al.*, 2019).

تغذیه با چربی‌های غیراشباع نه تنها به تأمین انرژی حیوان، بلکه به توسعه سیستم متابولیکی و آنزیمی حیوان نیز کمک می‌کند. فقدان چربی در جیره و عدم بیوسنتز برخی از ویتامین‌ها منجر به محدودیت رشد حیوان می‌گردد. از مهم‌ترین روغن‌هایی که امروزه تحقیقات گسترده‌ای بر روی آن صورت گرفته روغن دانه‌کتان می‌باشد. روغن دانه‌کتان به‌طور متوسط حاوی نه درصد اسیدهای چرب اشباع، ۱۸ درصد اسیدهای چرب دارای یک پیوند دوگانه و ۷۳ درصد اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه (PUFA) می‌باشد (Thiessen Debbie, 2004).

اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه در روغن دانه کتان، از ۱۶ درصد اسیدهای چرب اومگا ۶ (به‌طور عمده اسید لینولئیک) و ۵۷ درصد اسید لینولنیک تشکیل شده‌اند (Ambrose *et al.*, 2006). روغن دانه‌کتان یکی از منابع اصلی و باارزش اسیدهای چرب امگا–۳ ضروری (عمدتاً آلفا لینولئیک اسیدکه پیش‌ساز ایکوزاپنتانوئک اسید است) می‌باشد (Newkiri, 2015). ایکوزاپنتانوئک اسید پیش‌ساز ایکوزونوئیدها بوده که مشابه ترکیبات شبه هورمونی عمل می‌نمایند و نقش مهمی در سیستم ایمنی حیوان ایفا می‌نمایند (Hill *et al.*, 2011).

نوزاد نشخوارکنندگان در اوائل زندگی به‌دلیل عدم توسعه شکمبه از سیستم ناودان مری استفاده می‌نمایند و مواد غذایی به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع بدون اینکه پروسه بیوهیدروژناسیون بر روی آن‌ها صورت پذیرد و ویتامین‌های محلول در چربی بدون هیچ‌گونه تغییری می‌توانند مستقیماً وارد روده باریک شده و اثرات مثبت خود را ایفا نمایند. لذا تصور می‌گردد با وجود پروفایل اسیدهای چرب ضروری موجود در دانه کتان، استفاده از روغن کتان و ویتامین‌های محلول در چربی می‌تواند در بهبود بازده خوراک، ضریب رشد، انرژی متابولیسمی، رشد طبیعی غضلات و استخوان‌ها و همچنین بهبود سیستم ایمنی مؤثر باشد (Masmeijer *et al.*, 2020). از طرفی، به‌علت اینکه نوزاد نشخوارکنندگان توانایی بیوسنتز ویتامین‌های محلول در چربی (A, D_3, E, K) را نداشته و غلظت این ویتامین‌ها در سرم خون آن‌ها کم است، ممکن است با کمبود این ویتامین‌های ضروری روبه‌رو شوند که از علائم آن می‌توان به کاهش رشد، موهای زبر و مستعد ابتلا به بیماری‌های عفونی اشاره کرد (McDowell and Lee, 2008; Abd Elghany *et al.*, 2008).

کارچر و همکاران (Karcher *et al.*, 2014) گزارش نمودند که فاکتورهای التهابی و شاخص‌های رشدی و عملکردی در گوساله‌های شیرخوار، با افزودن روغن ماهی و روغن‌کتان در جایگزین‌کننده شیر تغییر می‌یابد به‌طوری‌که افزودن روغن‌کتان سبب بهبود ضریب تبدبل غذایی و نرخ رشد بیشتری در گوساله‌ها شده بود و از طرفی، کاهش ژن‌های IL-4 و IL-8 در آن‌ها گردیده بود، در حالی که روغن ماهی اثر مثبتی در کاهش بیان TNF-α از خود نشان داد.

هیل و همکاران (Hill *et al.*, 2011) با افزودن مکمل تجاری با نام NeoTec4 (ترکیبی از روغن نارگیل، روغن کتان و اسید استیک) در جایگزین شیر گوساله‌های شیرخوار، پارامترهای ایمنی و سلامت و رشد را مورد سنجش قرار گرفت، نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که مصرف NeoTec4 باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، مصرف خوراک و میانگین افزایش وزن روزانه شد و از طرفی، باعث کاهش تحریک فاکتورهای التهابی TNF-α و IL-4 در خون گوساله‌ها شد.

کروگر و همکاران (Krueger *et al.*, 2016) گزارش نمودند که استفاده از ویتامین‌های محلول در چربی در شیر پاستوریزه مورد استفاده گوساله‌های شیرخوار، باعث هم‌کوشی این ویتامین‌ها گردیده است و از طرفی، سبب بهبود عملکرد و سلامت و نیز افزایش انتقال فعال هپتاگلوبین در گوساله‌های تغذیه شده با شیر پاستوریزه شده بود.

با توجه به وجود اطلاع اندک در خصوص استفاده از روغن دانه کتان و ویتامین‌های محلول در چربی و یا استفاده توأم آن‌ها در نوزاد نشخوارکنندگان، آزمایش پیش رو با هدف بررسی اثرات روغن کتان و تزریق ویتامین‌های محلول در چربی بر عمکرد، بر ابعاد بدن، پارامترهای سلامتی حیوان، متابولیت‌های خونی گوساله‌های شیرخوار طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مرکز تحقیقات گاوشیری دانشگاه فردوسی مشهد در اوایل تیر ماه تا اواسط آبان ماه سال ۱۳۹۹ انجام گردید. تعداد ۲۸ رأس گوساله ماده هلشتاین با میانگین وزن (۴/۸±)۳۷/۷ کیلوگرم، بعد از تولد از مادر جدا شده و پس از وزن‌کشی به جایگاه‌های انفرادی منتقل شدند. گوساله‌ها به‌مدت سه روز متوالی دو نوبت در روز و هر وعده با دو لیتر آغوز با کیفیت تغذیه شدند (رفلکتومتر چشمی ATC مدل ۰۰۳۲ و بریکس ۰ تا ۳۲ درصد برای تعیین کیفیت کلستروم استفاده گردید) و از ابتدای روز چهارم شیر کامل جایگزین کلستروم گردید.

در ابتدا، روز چهارم گوساله‌ها بر مبنای وزن دسته‌بندی و به‌صورت کاملاً تصادفی به یکی از چهار تیمار اختصاص داده شدند. تیمارها مورد آزمایش شامل: ۱) شیرکامل همراه با خوراک آغازین (شاهد) ۲) جیره شاهد به همراه شیرمکمل شده با روغن کتان به‌صورت گاواژه همراه شیر (۰/۳ میلی لیتر به‌ازای هر کیلو وزن بدن) ۳) جیره شاهد و تزریق هفته‌ای هفت سی سی ویتامین محلول در چربی (محلول استریل تزریقی از شرکت رازک، هر میلی‌لیتر حاوی: Vitamin A ۵۰۰۰۰IU، Vitamin $D_3$۱۰۰۰۰ IU، Vitamin E ۲۰mg، (A, D_3, E ۴) جیره شاهد به همراه شیر مکمل شده با روغن کتان (۰/۳ میلی لیتر به‌ازای هر کیلو وزن بدن) و تزریق هفته ای هفت سی سی ویتامین محلول در

چربی بودند.

در کل دوره آزمایش، گوساله‌ها به‌صورت آزاد به خوراک آغازین و آب دسترسی داشتند. ترکیبات موجود درخوراک آغازین در تمامی گروه‌ها یکسان بود. اجزای تشکیل‌دهنده خوراک آغازین و ترکیبات آن در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱– اقلام تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره آغازین آزمایش

Table 1- Ingredients and chemical compositions of the beginning experimental diet

اقلام خوراکی Ingredients (%DM)	
ذرت آسیاب شده Ground corn	45
جو اسیاب شده Milled barley	15
کنجاله سویا Soybean meal	29
سبوس گندم Wheat bran	9
مکمل ویتامینی Mineral-vitamin premix	1
سنگ آهک Limestone	1
ترکیب شیمیایی Chemical composition	
پروتئین خام Crude protein (%)	20.1
ماده خشک Dry mater (%)	90.5
کربوهیدرات های غیرفیبری Non-fibrous carbohydrates (NFC)	57.7
عصاره اتری Ether extracts (EE) (%)	3.1
فسفر Phosphorus (%)	0.6
کلسیم Calcium (%)	0.7
خاکستر Ash (%)	5.29
ماده آلی Organic matter (%)	94.71
فیبر نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber (%)	57.7
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber (%)	6.9

اقلام تشکیل‌دهنده مکمل ویتامینی در جیره آغازین: وتامین D_3 (IU/Kg) 300000، ویتامینE (IU/Kg) 3000، کلسیم (mg/kg)7011، فسفر (mg/kg) 30000، منیزیم (mg/kg) 20700، سدیم (mg/kg) 40000، منگنز (mg/kg) 5000، روی (mg/kg) 10000، مس (mg/kg) 3000، سلنیوم (mg/kg) 100، ید (mg/kg)120، سلنیوم آلی (mg/kg) 2، کبالت (mg/kg) 100، آنتی‌اکسیدان (mg/kg) 1000.

Vitamin supplement components in the initial diet: vitamin D3 300000 (IU/Kg), vitamin E 3000 (IU/Kg), calcium 7011 (mg/kg), phosphorus 30000 (mg/kg), magnesium 20700 (mg/kg), sodium 40000 (mg/kg), manganese 5000 (mg/kg), zinc 10000 (mg/kg), copper 3000 (mg/kg), selenium 100 (mg/kg), iodine 120 (mg/kg), organic selenium 2 (mg/kg), cobalt 100 (mg/kg), antioxidant 1000 (mg/kg).

برای تعیین ترکیب و کیفیت شیر در طول دوره آزمایش، چهار نوبت نمونه‌گیری انجام شد و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه میلکواسکن (Foss FT3, Foss Electric, Hillerød, Denmark) برای ارزیابی میزان پروتئین، چربی، لاکتوز و مواد جامد موجود در آن‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند.

خوراک آغازین مورد استفاده نیز در انتهای هر هفته و در هنگام تولید، نمونه‌برداری و تا زمان تعیین مواد مغذی موجود در آن، در دمای ۲۰- درجه سلیسوس ذخیره گردید. پارامترهای سلامتی گوساله‌ها مانند سرفه، ترشحات بینی و چشم، قوام مدفوع و میزان سرحالی گوساله به‌صورت روزانه و بعد از وعده شیر صبح، بر اساس روش دانشگاه ویسکانسن (McGuirk, 2005) مورد ارزیابی و نمره‌دهی قرار گرفت. بر اساس این روش، نمره صفر به دام‌های کاملاً سالم و نرمال و بقیه نمرات بر اساس شاخص سلامتی (تا ۳) امتیاز داده می‌شد.

دمای رکتوم نیز به‌صورت هفتگی و در ساعات ۱۲ تا ۱۴ به‌کمک دماسنج دیجیتال (Vekto TM - 502) اندازه‌گیری می‌شد. در ابتدای هر هفته وزن و فرم بدن که شامل ارتفاع بدن، ارتفاع ران، فاصله استخوان‌های پین تا هیپ، فاصله استخوان‌های پین، فاصله استخوان‌های پین، محیط قفسه سینه، عمق بدن، طول کل (از وسط سر تا ابتدای دم)، طول ران، عرض قفسه سینه، عرض شانه و عرض ران با کمک کولیس و متر اندازه‌گیری شد (McCoard *et al.*, 2019).

نمونه خون در روزهای ۱، ۱۴، ۲۸و ۵۶ آزمایش قبل از وعده شیر صبح از هر گوساله گرفته شد و پس از سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ rpm (۱۵۰۹ xg) به‌مدت ۱۰ دقیقه، سرم آن‌ها جدا و تا زمان اندازه‌گیری متابولیت‌های گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید، کراتینین، اوره سرمی خون، پروتئین تام و HDL در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. متابولیت‌های خونی با استفاده از کیت‌های تجاری رایج و با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر مدل Alpha Classic اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS۹/۴ و به‌روش GLM آنالیز شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی – کرامر در سطح آماری ۹۵ درصد مقایسه گردید.

نتایج و بحث

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، مصرف خوراک، افزایش وزن، بارده خوراک، دمای رکتوم و نمره مدفوع تحت تأثیر تیمارهای مورد آزمایش قرار نگرفت، داده‌های به‌دست آمده همسو با نتایج گزارش شده با سایر محققین می‌باشد (Hill *et al.*, 2011; Kadkhoday *et al.*, 2017). در حالی‌که کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2021) تأثیر معنی‌داری در استارتر مصرفی گوساله‌های شیرخوار تغذیه شده با منابع مختلف چربی گزارش کردند. مطالعات نشان می‌دهد که خوراک مصرفی می‌تواند متأثر از سن، میزان چربی کل جیره، نوع چربی و نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع جیره باشد (Doppenberg and Palmquist, 1991; Ghorbani *et al.*, 2020; Hill *et al.*, 2011).

محققین گزارش نمودند که افزودن اسیدهای چرب غیراشباع C18:2 و C18:3 در خوراک گوساله‌های شیرخوار تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن نداشته است (Kadkhoday *et al.*, 2017)، حال آن که گوساله‌های تغذیه شده با نمک‌های کلسیمی روغن کتان وزن نهایی بیشتری را نشان دادند (Thiessen Debbie, 2004).

همان‌گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تیمارها تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن روزانه گوساله‌ها نداشت. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از آزمایش بلیکلی و همکاران (Blakely *et al.*, 2019) ناهمسو است که گزارش کردند، گوساله‌های دریافت‌کننده ویتامین‌های محلول در چربی نسبت به گروه شاهد از افزایش وزن کمتری برخوردار بودند. این تفاوت در نتیجه، ممکن است به‌دلیل مصرفی ویتامین و یا شرایط آزمایش باشد. از طرفی، هیل و همکاران (Hill *et al.*, 2009) بیان کردند که استفاده از روغن‌های C18:3 (لینولنیک اسید) در جیره‌های استارتر گوساله‌های شیرخوار منجر به بالا رفتن افزایش وزن و بازده خوراک می‌گردد (Garcia *et al.*, 2015).

بازده خوراک در کل دوره تحقیق، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. کدخدایی و همکاران (Kadkhoday *et al.*, 2017) بیان کردند که به‌طور کلی، افزودن منابع مختلف چربی شامل اسیدهای چرب C18:2 و C18:3 تأثیر معنی‌داری بر بازده خوراک گوساله‌ها خواهد داشت. از طرفی، ال–دی هی و همکاران (El-Diahy *et al.*, 2016) نیز بیان نمودند که ضریب تبدیل خوراک با افزودن روغن کتان در جیره بهبود می‌یابد و به عبارتی، مقدار ماده خشک، پروتئین و TDN کمتری برای تولید یک لیتر شیر با ۴ درصد چربی لازم است. کارچر و همکاران (Karcher *et al.*, 2014) در گزارشات به‌دست آمده از تحقیق خود نشان دادند که گوساله‌های دریافت‌کننده روغن کتان نسبت به گوساله‌هایی که روغن ماهی دریافت کرده بودند، بازده خوراک بهتری را از خود نشان دادند. شاید از دلایل احتمالی عدم معنی‌دارشدن بازده خوراک، تفاوت در شرایط آزمایشی و مدیریتی، نوع واریته دانه کتان و فرایند استحصال روغن آن و سایر عوامل ناشناخته بوده باشد که می‌تواند به‌عنوان خطای آزمایش محسوب گردد.

جدول ۲- تأثیر تیمارهای آزمایش بر عملکرد و سلامت گوساله‌های شیرخوار

Table 2- Effect of experimental treatments on performance and health of weaning calves

عملکرد Performance	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				SEM	P value
	شاهد Control	روغن کتان Flax seed oil	ویتامین Vitamin	روغن کتان + ویتامین Flax seed oil+vitamin		
خوراک مصرفی (g/day) Feed intake	627.90	575.70	687.20	524.00	47.97	0.15
افزایش وزن روزانه (g/day) Average daily gain	430.60	461.50	513.20	486.50	22.61	0.09
بازده خوراک Feed efficiency	0.73	0.82	0.73	0.91	0.07	0.24
دمای بدن(°C) Body temperature	38.67	38.76	38.65	38.71	0.057	0.56
نمره مدفوع Fecal score	0.89	0.83	0.84	0.78	0.05	0.42

در هر ردیف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$).

In each row, different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).

دمای رکتوم تحت تأثیر تیمارهای مختلف بر قرار نگرفت. هیل و همکاران (Hill *et al.*, 2011) نیز بیان کردند که مکمل کردن جیره با اسیدهای چرب تأثیری بر روی دمای رکتوم نداشت. دمای رکتوم به منظور تعیین سلامتی حیوان، که نشان‌دهنده بیماری‌هایی همچون اسهال، نفخ، سرماخوردگی، افسردگی و کاهش اشتها است، تعیین می‌گردد. در گوساله‌هایی که دمای رکتوم آن‌ها بیش از ۳۹/۵ درجه سلسیوس باشد، به‌عنوان گوساله‌های تب دار شناسایی می‌گردند. همان‌گونه که در جدول دو مشخص است، دمای رکتوم تمامی گوساله زیر ۳۹ درجه می‌باشد که در دامنه طبیعی درجه حرارت گوساله سالم (۳۸-۳۹ درجه سلیسیوس) می‌باشد.

اسکور مدفوع در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. بر اساس روش پیشنهادی دانشگاه ویسکانسن (McGuirk, 2005) امتیاز صفر برای دام‌های سالم و امتیاز سه برای دام‌های بیمار اختصاص داده می‌شود. داده‌های به‌دست آمده نشان‌دهنده آن است که گوساله‌ها در کل دوره از سلامتی نسبی برخوردار بوده‌اند، زیرا درجه اسکور مدفوع آن‌ها زیر یک می‌باشد. هر چند که اسکور مدفوع در گروه کنترل کمی بالاتر از بقیه تیمارها است و این احتمالاً به‌دلیل مبتلا شدن یک گوساله به اسهال در اوایل آزمایش برمی‌گردد. هیل و همکاران (Hill *et al.*, 2007; Hill *et al.*, 2009) نشان دادند که تغذیه گوساله‌ها با لینولنیک اسید تأثیر مثبتی بر روی سلامت آن‌ها دارد و گوساله‌هایی که این اسید چرب را دریافت کردند نمره مدفوع بهتر و روزهای ابتلا به اسهال کمتری را نسبت به تیمارهای دیگر داشتند.

نتایج مربوط بر رشد استخوانی و ابعاد بدنی گوساله‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از روغن‌کتان و ویتامین‌های (A, D_3, E) در شیر گوساله‌ها تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های رشد نداشت. قاسمی و همکاران (Ghasemi *et al.*, 2017) گزارش کردند که افزودن منابع چربی (روغن سویا، پیه و روغن پالم) به جیره گوساله‌ها تأثیری بر پارامترهای ابعاد بدنی آن‌ها نداشته است. کدخدایی و همکاران (Kadkhoday *et al.*, 2014) نگارش کردند که منابع مختلف چربی و اسیدهای چرب C18:2 و C18:3 تأثیری بر نمره بدنی و پارامترهای رشد اسکلتی گوساله‌های شیرخوار نداشته است.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، اختلاف معنی‌داری بین غلظت گلوکز سرمی خون در تیمارهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۴). هر چند که غلظت گلوکز به لحاظ عددی در تیمار حاوی روغن کتان نسبت به سایر تیمار بیشتر بود، از دلایل احتمالی می‌توان به این نکته اشاره کرد که بهره‌وری از منبع انرژی در گوساله‌های مصرف‌کننده روغن کتان بیشتر صورت گرفته است و لذا بخشی از گلوکز که برای تأمین انرژی بوده، مورد استفاده قرار نگرفته است (Thiessen Debbie, 2004)، ولی عدم تفاوت معنی‌دار داده‌های فوق در این آزمایش ممکن است به‌دلیل بالابودن خطای آزمایش باشد.

اختلاف معنی‌داری بین کلسترول تیمارهای آزمایشی مشاهده می‌گردد. تیمار حاوی روغن کتان و ویتامین در کل دوره آزمایش غلظت کلسترول بیشتری را نسبت به سه تیمار دیگر به خود اختصاص داده بود ($p>۰/۰۵$). کلسترول نقش اساسی در غشای سلولی داشته و پیش‌ساز بسیاری از ترکیبات منجمله هورمون‌های استروئیدی، اسیدهای صفراوی و ویتامین D می‌باشد. رژیم غذایی، وزن بدن، سن، جنسیت و وراثت از جمله عوامل مؤثر بر سطح کلسترول خون می‌باشند. غلظت پروتئین تام در این مطالعه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

جدول ۳- اثر تیمارهای بر فراسنجه‌های رشد اسکلتی (سانتی متر)

Table 3- Effect of experimental treatment on structural growth parameters (cm)

فرآسنجه های رشد اسکلتی Structural growth parameters	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments				SEM	P value
	شاهد Control	روغن کتان Flax seed oil	ویتامین Vitamin	روغن کتان + ویتامین Flax seed oil + vitamin		
ارتفاع بدن (cm) Withers height	81.17	80.66	81.69	82.51	0.64	0.21
ارتفاع ران (cm) Hip height	85.06	85.26	86.66	86.31	0.68	0.27
فاصله پین تا هیپ (cm) Hip to pin	24.66	23.89	23.94	24.46	0.30	0.21
عرض پین (cm) Pin width	9.17	9.54	9.10	9.05	0.16	0.13
عرض هیپ (cm) Hip width	15.76	15.89	16.09	16.21	0.27	0.66
محیط قفسه سینه (cm) Heart girth	84.13	84.00	85.46	85.46	1.11	0.66
عمق بدن (cm) Body barrel	89.29	90.49	90.74	90.17	1.55	0.91
طول کل (cm) Top line	96.06	95.54	96.63	96.80	1.10	0.84
طول ران (cm) Rump length	27.66	27.03	27.79	27.74	0.42	0.54
عرض قفسه سینه (cm) Chest width	10.80	11.24	11.13	11.46	0.22	0.20
عرض شانه (cm) Shoulder width	16.60	16.37	16.57	15.97	0.26	0.31
عرض ران (cm) Rump width	22.89	23.60	23.63	23.86	0.4301	0.41

در هر ردیف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<0.05).

In each row, different letters indicate a significant difference (p<0.05).

بر اساس نتایج موجود، تأثیر افزودن روغن‌کتان به جیره و تزریق ویتامین‌های محلول در چربی به گوساله‌ها بر غلظت کراتنین سرم خون معنی‌دار نبوده است. کراتینین موجود در خون، یک شاخص دقیق تجزیه و تخریب بافت‌های ماهیچه‌ای به‌حساب می‌آید، در طیور (Yunianto et al., 1997)، خوک (Pearce et al., 2013) و گاوشیری (Schneider et al., 1988) کمبود انرژی، میزان کراتینین را افزایش می‌دهد.

در این پژوهش، اوره سرمی خون تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. غلظت تری گلیسیرید خون تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت و اختلاف بین تیمارها معنی‌داری نشد. از جمله عوامل تأثیرگذار بر غلظت تری گلیسیرید خون می‌توان به فعالیت لیپاز پانکراسی و میزان مصرف جیره آغازین اشاره کرد (Hill et al., 2009).

نتایج به‌دست آمده از این آزمایش اختلاف معنی‌داری را بین HDL در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد، به‌گونه‌ای که تیمار دریافت‌کننده شیر مکمل شده با روغن کتان و ویتامین و تیمار دریافت‌کننده شیر مکمل با روغن‌کتان به‌ترتیب دارای بیشترین میزان غلظت HDL در سرم خون خود بودند (p< ۰/۰۵). اشپیتان و همکاران (Śpitalniak-Bajerska et al., 2020) گزارش کردند که مکمل کردن جایگزین کننده شیر با روغن کتان برای گوساله‌های شیرخوار باعث افزایش میزان HDL سرم شد. در حالی که قاسمی و همکاران (Ghasmi et al., 2017) بیان کردند که افزودن منابع مختلف چربی به جیره آغازین گوساله‌ها در شرایط تنش سرمایی اثر معنی‌داری بر روی میزان غلظت HDL سرمی نداشت.

جدول ٤- اثر تیمارهای آزمایش بر فراسنجه‌های سرم
Table 4- Effect of experimental treatments on serum metabolites

فراسنجه های سرم Serum metabolites	تیمار Treatment شاهد Control	 روغن کتان Flax seed oil	 ویتامین Vitamin	 روغن کتان+ویتامین Flaxseed oil + vitamin	SEM	P value
گلوکز Glucose (mg/dl)	97.21	99.07	87.75	88.54	3.78	0.09
کلسترول Cholesterol (mg/dl)	84.43[b]	97.13[ab]	91.65[b]	109.83[a]	4.503	0.00
پروتئین تام Total Protein (g/dl)	5.66	5.77	5.42	5.45	0.117	0.10
کراتینین Creatinine (mg/dl)	1.17	1.14	1.15	1.16	0.062	0.98
اوره Urea, mg/dl)	25.04	27.30	26.52	24.04	1.686	0.52
لیپوپروتئین با چگالی بالا high-density lipoprotein (HDL) (mg/dl)	20.30[b]	23.65[ab]	22.09[b]	28.70[a]	1.414	0.00
تری گلیسرید Triglyceride (mg/dl)	27.91	24.48	22.52	23.26	2.838	0.55

حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$)
In each row, different letters indicate a significant difference ($p<0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از روغن دانه کتان و ویتامین‌های A, D_3, E در گوساله‌های شیرخوار تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن، خوراک مصرفی، بازده خوراک مصرفی، دمای بدن، اسکور مدفوع، ابعاد بدن و برخی از متابولیت‌های خونی نداشته است، حال آن که افزودن روغن کتان به‌تنهایی و یا به‌هنگام تزریق ویتامین‌های محلول در چربی منجر به افزایش معنی‌دار کلسترول سرم و HDL خون گوساله‌ها شده است. تیمارهای مورد استفاده هیچ اثر سوئی بر سلامت حیوان نگذاشته‌اند. کمترین بازده خوراک مصرفی در گوساله‌های مصرف‌کننده روغن کتان و ویتامین محلول در چربی به‌دست آمده است، بدین معنی که حیوان به‌ازای هر واحد وزن، غذای کمتری مصرف نموده است و بازده خوراک تقریباً ۱۸ درصد بهبود یافته است. بنابراین، چنانچه هزینه تولید در نظر گرفته شود، این تیمار از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه خواهد بود. از طرفی، همه دام‌ها از لحاظ سلامتی در حد مطلوبی قرار داشته‌اند.

References

1. Abd Elghany Hefnawy, R., Revilla-Vazquez, A., Ramírez-Bribiesca, E., & Tórtora-Pérez, J. (2008). Effect of pre- and postpartum selenium supplementation in sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *7*(1), 61-67.
2. Ambrose, D. J., Kastelic, J. P., Corbett, R., Pitney, P. A., Petit, H. V., Small, J. A. & Zalkovic, P., (2006). Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α-linolenic acid. *Journal of Dairy Science*, *89*(8), 3066-3074.
3. Blakely, L. P., Poindexter, M. B., Stuart, R, L., & Nelson, C. D. (2019). Supplementing pasteurized waste-milk with vitamins A, D, and E improves vitamin status of dairy calves. *The Bovine Practitioner*, 134-141.
4. Doppenberg, J., & Palmquist, D. L. (1991). Effect of dietary fat level on feed intake, growth, plasma metabolites and hormones of calves fed dry or liquid diets. *Livestock Production Science*, *29*(2-3), 151-166.
5. El-Diahy, Y. M., El-Hamd, A., & Elshora, M.A. (2016). Effect of flaxseed oil supplementation during pre and postpartum on some physiological parameters and productive performance cow. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, *19*(1), 1-15.
6. Ghorbani, H., Kazemi-Bonchenari, M., HosseinYazdi, M., & Mahjoubi, E. (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 262*, 114429.
7. Garcia, M., Shin, J. H., Schlaefli, A., Greco, L. F., Maunsell, F. P., Santos, J. E. P., Staples, C. R., & Thatcher, W.

W., (2015). Increasing intake of essential fatty acids from milk replacer benefits performance, immune responses, and health of preweaned Holstein calves. *Journal of dairy science*, *98*(1), 458-477.
8. Ghasemi, E., Azad-Shahraki, M., & Khorvash, M. (2017). Effect of different fat supplements on performance of dairy calves during cold season. *Journal of Dairy Science, 100*(7), 5319-5328.
9. Godden, S. M., Haines, D. M., Konkol, K., & Peterson, J. (2009). Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed. *Journal of dairy science, 92*(4), 1758-1764.
10. Hill, T. M., VandeHaar, M. J., Sordillo, L. M., Catherman, D. R., Bateman Ii, H. G., & Schlotterbeck, R. L. (2011). Fatty acid intake alters growth and immunity in milk-fed calves. *Journal of Dairy Science*, *94*(8), 3936-3948.
11. Hill, T. M., Aldrich, J. M., Schlotterbeck, R. L., & Bateman Ii, H. G. (2007). Amino acids, fatty acids, and fat sources for calf milk replacers. *The Professional Animal Scientist*, *23*(4), 401-408.
12. Hill, T. M., Bateman II, H. G., Aldrich, J. M., & Schlotterbeck, R.L. (2009). Effects of changing the essential and functional fatty acid intake of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *92*(2), 670-676.
13. Kadkhoday, A., Ahmad, R., Masoud, A., Dehghan-Banadaky, M., & Kowsar, R. (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*, *204*, 71-77.
14. Karcher, E. L., Hill, T. M., Bateman II, H. G., Schlotterbeck, R. L., Vito, N., Sordillo, L. M. & Vandehaar, M.J., (2014). Comparison of supplementation of n-3 fatty acids from fish and flax oil on cytokine gene expression and growth of milk-fed Holstein calves. *Journal of Dairy Science, 97*(4), 2329-2337.
15. Karimi, A., Alijoo, Y. A., Kazemi-Bonchenari, M., Mirzaei, M., & Sadri, H. (2021). Effects of supplemental fat sources and forage feeding levels on growth performance, nutrient digestibility, ruminal fermentation, and nitrogen utilization in dairy calves. *Animal*, 100179.
16. Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Kim, S. B., Ki, K. S., Park, S. J., Ha, J. K., & Choi, Y. J. (2007). Starch source evaluation in calf starter: I. Feed consumption, body weight gain, structural growth, and blood metabolites in Holstein calves. *Journal of Dairy Science, 90*(11), 5259-5268.
17. Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Kim, S. B., Park, S. B., Baek, K. S., Ha, J. K., & Choi, Y. J. (2008). Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, *91*(3), 1140-1149.
18. Krueger, L. A., Reinhardt, T. A., Beitz, D. C., Stuart, R. L. & Stabel, J. R. (2016). Effects of fractionated colostrum replacer and vitamins A, D, and E on haptoglobin and clinical health in neonatal Holstein calves challenged with *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. *Journal of Dairy Science, 99*(4), 2884-2895.
19. Masmeijer, C., Van Leenen, K., De Cremer, L., Deprez, P., Cox, E., Devriendt, B., & Pardon, B. (2020). Effects of omega-3 fatty acids on immune, health and growth variables in veal calves. *Preventive Veterinary Medicine, 179*, 104979.
20. McCoard, S., Heiser, A., Lowe, K., Molenaar, A., MacLean, P., Johnstone, P., Leath, S., Hoskin, S.O., & Khan, M.A. (2019). Effect of weaning age on growth, mammary gland development, and immune function in Holstein Friesian calves fed conserved alfalfa (FiberStart). *Journal of Dairy Science*, *102*(7), 6076-6087.
21. McDowell, Lee, R. (2008). Vitamins in animal and human nutrition. John Wiley and Sons.
22. McDonnell, R. P., O'Doherty, J. V., Earley, B., Clarke, A. M., & Kenny, D. A. (2019). Effect of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and/or β-glucans on performance, feeding behaviour and immune status of Holstein Friesian bull calves during the pre-and post-weaning periods. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1-17.
23. McGuirk, S. M. (2005). Otitis media in calves. Proc. 23rd Am. Coll. Vet. Intern. Med., Baltimore, MD: 228-230.
24. Newkirk, R. (2015). Flax feed industry guide. *Flax Canada*, 1-24.
25. Nonnecke, B. J., Foote, M. R., Miller, B. L., Beitz, D. C., & Horst, R. L. (2010). Fat-soluble vitamin and mineral status of milk replacer-fed dairy calves: Effect of growth rate during the preruminant period. *Journal of Dairy Science*, *93*(6), 2684-2690.
26. National Research Council, (2001). Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. National Academies Press.
27. Pearce, S. C., Gabler, N. K., Ross, J. W., Escobar, J., Patience, J. F., Rhoads, R. P., & Baumgard, L. H. (2013). The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*, *91*(5), 2108-2118.
28. Quigley, J. D., Wolfe, T. A., & Elsasser, T. H. (2006). Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *Journal of Dairy Science, 89*(1), 207-216.
29. Schneider, P. L., Beede, D. K., & Wilcox, C. J. (1988). Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *Journal of Animal Science, 66*(1), 112-125.
30. Śpitalniak-Bajerska, K., Szumny, A., Pogoda-Sewerniak, K., & Kupczyński, R. (2020). Effects of n-3 fatty acids on growth, antioxidant status, and immunity of preweaned dairy calves. *Journal of dairy science*, *103*(3), 2864-2876.
31. Thiessen Debbie, L. (2004).Optimization of feed peas, canola and flaxseed for aqua feeds: The Canadian prairie

perspective. Avancesen Nutricion Acuicola.
32. Winter, K. A. (1985). Comparative performance and digestibility in dairy calves weaned at three, five, and seven weeks of age. *Canadian Journal of Animal Science, 65*(2), 445-450.
33. Yunianto, V. D., Hayashit, K., Kaneda, S., Ohtsuka, A., & Tomita., Y (1997). Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, *77*(6), 897-909.

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 317-331

Effect of Group and Individual Breeding on Performance, Blood Parameters, Ruminal Fermentation, Behavior and Health of Dairy Calves

Fatemeh Ahmadi[1], Ebrahim Ghasemi[2*], Masoud Alikhani[3], Majid Akbarian Tefaghi[4]

Received: 16-06-2021
Revised: 08-08-2021
Accepted: 08-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Ahmadi, F., Ghasemi, E., Alikhani, M., & Akbarian Tefaghi, M. (2022) Effect of group and individual breeding on performance, blood parameters, ruminal fermentation, behavior and health of dairy calve. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 317-331.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.71006.1030

Introduction: In most dairy farms, calves are housed individually during the milk-feeding period and will only introduce to social groups after weaning. Individual housing can help keep calves healthy by reducing disease transmission and incidence behavioral problems such as cross-sucking as well as providing individual feeding and health-care of the calf. Nevertheless, individual rearing systems through lack of social contact can compromise the welfare of the calf. Calves are social animals, thus keeping calves in groups can promote more normal social behavior. Also, social housing results in decreased labor costs associated with calf rearing, increased solid feed intake, weight gains, and less fear of novel social situations. Despite all the performance and behavioral advantages in calves with social housing compared to individually housing, there are concerns about the close relationship between calves and the risk of disease transmission. It has been reported a higher frequency of diarrhea in socially housed calves compared with individually housed calves at week 3. Thereby the risk of morbidity and mortality can be reduced if calves are grouped after 3 weeks of age onwards. Also, no considerable differences were observed for social behaviors between calves housed together from birth compared with those housed together from 3 week of life. Research is needed to establish best practices to rear the calves whilst improving the welfare, health, and growth of dairy calves. Therefore the aim of this experiment was to investigate the effect of individual or group housing (from 4 weeks) on performance, blood parameters, ruminal fermentation, behavior, and health of dairy calves.

Materials and Methods: A total of 32 Holstein calves were separated from their dams immediately after birth, weighed, and placed in individual pens. Then at 28 ± 2 d, calves were randomly assigned to either an individual pen (n = 16 calves, 1.5×2 m2) or group pen (4 calves/pen, n = 16 calves, 3×4 m2). All calves were offered a step-up/step-down method of milk feeding (4, 6, 8, 6, 4, and 2 L/d) and weaned at d 63. The study finished when calves reached 90 d of age. Feed intake was determined daily. Calves were weighed at birth, 28, 63, and 90 d of the age. Body measurements including body length, body girth, withers height, heart girth, hip height, and hip width of the calves were measured at the start and end of the study. Blood samples were collected at d 4 before and d 4 after weaning for measurement of glucose, cholesterol, and BUN concentration. Behavior parameters (playing, cross-sucking, grooming, and non-nutritive oral behavior) were monitored by visual observations of all calves at the 60 and 89 d of age for a period of 24 h. Calf health was checked every day for fecal scoring, general appearance scoring, and respiratory scoring. Also, diarrhea and pneumonia diagnoses and treatment of calves were recorded. On 50 and 80 d of age, ruminal fluid samples were collected from male calves for the measurement of pH and analysis of volatile fatty acids.

Results and Discussion: There was no significant difference between housing for starter intake, total dry

1- Ph.D. Student of Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology, Isfahan, Iran.
2- Associate Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology, Isfahan, Iran.
3- Associate Professor of Animal Sciences Department, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology, Isfahan, Iran.
4- Former M.Sc. Student of Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of technology, Isfahan, Iran.
(*- Corresponding Author Email: ghasemi@cc.iut.ac.ir)

matter intake, and ADG during pre-weaning, post-weaning, and the total period of the study. Also, BW (birth, 28, 63, and 90 d) and skeletal growth (initial and final of the study) were not affected by housing. We observed no housing effect on glucose and BUN plasma, however, cholesterol concentration was greater in individual calves than group calves at pre- and post-weaning, which is probably related to the greater stress of individual calves than group calves during weaning. Ruminal pH, total VFA concentration, the concentration of acetate, propionate, butyrate, iso-butyrate, isovalerate, valerate, and acetate to propionate ratio in ruminal fluid were similar between treatments. There was no difference between treatments for the frequency and number of days with general appearance (score ≥2), diarrhea (score ≥3), and pneumonia, as well as medicated days for both diarrhea and pneumonia during the pre-weaning, post-weaning, and total period of the experiment, indicating that calves, in general, were healthy. These results are probably attributed to good management of colostrum feeding, bedding, hygiene, regular health monitoring and disease diagnosis, and small group size. In the current study, non-nutritive oral behaviors were greater in individual calves than group calves during pre-weaning. However, cross-sucking, grooming, and playing activities were greater in group calves than individual calves during pre-weaning. During post-weaning, behaviors were not affected by housing. Behavioral results show that group housing improves the welfare of calves at weaning.

Conclusion: In general, the results showed that type of housing (group or individual) did not affect performance, rumen fermentation, and health of calves. While group housing can lead to improving the welfare of calves (increase the play and grooming, and decrease the non-nutritive oral behaviors).We suggested that calves can be grouped in good health if housing is properly managed.

Keywords: Calves, Group, Housing, Individual, Performance, Welfare.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر پرورش گروهی و انفرادی بر عملکرد، فراسنجه‌های خونی، تخمیر شکمبه، رفتار و سلامت گوساله‌های شیری

فاطمه احمدی[۱]، ابراهیم قاسمی[۲*]، مسعود علیخانی[۳]، مجید اکبریان تفاقی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

احمدی، ف.، قاسمی، ا.، علیخانی، م.، و اکبریان تفاقی، م. (۱۴۰۱). تأثیر پرورش گروهی و انفرادی بر عملکرد، فراسنجه‌های خونی، تخمیر شکمبه، رفتار و سلامت گوساله‌های شیری. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۳۱-۳۱۷.

چکیده

هدف از این مطالعه، مقایسه نگهداری گوساله‌های شیرخوار در جایگاه انفرادی یا گروهی بر عملکرد، رشد اسکلتی، خون، رفتار، تخمیر شکمبه و سلامت بود. تیمارها شامل گوساله‌های پرورش یافته در ۱) جایگاه‌های انفرادی (۲ × ۱/۵ مترمربع) و یا ۲) جایگاه‌های گروهی (۴ × ۳ مترمربع، ۴ گوساله/جایگاه) بود. مصرف خوراک به‌طور روزانه، وزن‌کشی در زمان تولد، ۲۸، ۶۳، و ۹۰ روزگی و رشد اسکلتی در ابتدا و انتهای دوره ثبت شدند. نمونه خون چهار روز قبل و بعد از شیرگیری و مایع شکمبه در روزهای ۵۰ و ۸۰ روزگی جمع‌آوری و رفتارها در دوره‌های ۲۴ ساعت در روزهای ۶۰ و ۸۹ روزگی ثبت شد. مصرف خوراک، افزایش وزن روزانه، وزن بدن و رشد اسکلتی در دوره‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. دفعات و طول مدت بیماری اسهال و پنومونی، کل درمان بیماری‌ها، تولید اسیدهای چرب فرار و pH شکمبه در بین تیمارها تفاوتی نداشت. سطح گلوکز و نیتروژن اوره خون نیز در بین تیمارها متفاوت نبود، ولی سطح کلسترول در گوساله‌های انفرادی در مقایسه با گوساله‌های گروهی در قبل و بعد از شیرگیری بیشتر بود. رفتارهای بازی، تیمار کردن، و مکیدن متقابل در گوساله‌های گروهی و سایر رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای در گوساله‌های انفرادی در قبل از شیرگیری بیشتر بود. در پس از شیرگیری که تمام گوساله‌ها به‌صورت گروهی بودند، تفاوت معنی‌داری در رفتارها مشاهده نشد. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که گروه‌بندی زودهنگام گوساله‌ها در مقایسه با پرورش در جایگاه‌های انفرادی اثری بر عملکرد، تخمیر شکمبه، و سلامت گوساله‌ها در قبل و بعد از شیرگیری نداشت، ولی منجر به بهبود رفاه (افزایش فعالیت‌های بازی و تیمار کردن و کاهش رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای) گوساله‌ها در دوره قبل از شیرگیری شد.

واژه‌های کلیدی: رفاه، عملکرد، فردی، گروهی،گوساله ها، جایگاه.

مقدمه

در بیشتر گاوداری‌های شیری، گوساله‌ها در طول دوره تغذیه با شیر در جایگاه‌های انفرادی پرورش می‌یابند (Hotzel *et al*., 2014) و فقط پس از شیرگیری به گروه‌های اجتماعی معرفی می‌شوند. جایگاه انفرادی می‌تواند با کاهش انتقال بیماری و بروز مشکلات رفتاری مانند مکیدن متقابل و همچنین نظارت بهتر بر خوراک و بهداشت، به سالم ماندن

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: ghasemi@cc.iut.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2021.71006.1030

گوساله‌ها کمک کند (Chua et al., 2002; Svensson et al., 2003). با این وجود، سیستم‌های پرورش انفرادی از طریق عدم ارتباط اجتماعی می‌توانند رفاه گوساله (Costa et al., 2015)، انعطاف پذیری رفتاری و توانایی گوساله برای کنار آمدن با شرایط جدید را به خطر بیندازد (Pempek et al., 2016).

در مقایسه با جایگاه انفرادی، جایگاه اجتماعی منجر به کاهش هزینه‌های نیروی کار مرتبط با پرورش گوساله (Hotzel et al., 2014)، افزایش مصرف خوراک جامد (Cobb et al., 2014; Jensen et al., 2015; Miller-Cushon and DeVries, 2016)، افزایش وزن (Cobb et al., 2014; Jensen et al., 2015) و مصرف علوفه (Hepola et al., 2006) می‌شود. کاستا و همکاران (Costa et al., 2015) گزارش کردند که مزایای جایگاه گروهی با پرورش زودهنگام گوساله‌ها در جایگاه اجتماعی مشاهده می‌شود. با این حال، تپکی و همکاران (Tapki, 2007) دریافتند که جایگاه اجتماعی هنگام تولد یا سه هفتگی در مقایسه با جایگاه انفرادی باعث افزایش مصرف خوراک و وزن‌گیری می‌شود. همچنین گزارش شده است که گوساله‌های گروهی زمان بیشتری را صرف نشخوار (Babu et al., 2004) و رفتار اکتشافی (Jensen et al., 1998; Vieira et al., 2012) می‌کنند و ترس کمتری نسبت به موقعیت‌های اجتماعی جدید نشان می‌دهند (Vieira et al., 2012; Jensen and Larsen., 2014; Whalin et al., 2018). ارتباطات اجتماعی به گوساله‌ها اجازه می‌دهد تا رفتار تغذیه را از سایر گوساله‌ها تقلید کنند (Vieira et al., 2010; Costa et al., 2015; Miller-Cushon and DeVries, 2016). اثرات مفید جایگاه اجتماعی بر رشد و رفتار پس از شیرگیری نیز گزارش شده است. چندین مطالعه نشان داده است که جایگاه اجتماعی منجر به رقابت موفقیت‌آمیز (Duve et al., 2012)، افزایش مصرف خوراک آغازین، افزایش وزن روزانه، زمان صرف شده برای خوردن، جویدن و نشخوار کردن در پس از شیرگیری می‌شود (Liu et al., 2019).

علی‌رغم تمام مزایای عملکردی و رفتاری گوساله‌های اجتماعی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی، نگرانی در مورد رابطه نزدیک بین گوساله‌ها و خطر انتقال بیماری وجود دارد (Hotzel et al., 2014) که یکی از عوامل اصلی تأخیر در گروه‌بندی کردن گوساله‌ها است (Svensson et al., 2003). گوساله‌های گروهی در طی سه هفته اول زندگی بیشتر از گوساله‌های انفرادی خطر ابتلا به بیماری‌های تنفسی و اسهال را دارند (Curtis et al., 2016). مطالعه دیگر (Liu et al., 2019) شیوع بیشتر اسهال را در گوساله‌های دو تایی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی در هفته سوم گزارش کرد، امّا در هفته‌های بعد تفاوتی مشاهده نشد. در طی چند هفته اول زندگی، سیستم ایمنی بدن در حال بلوغ است و اگر چه تمام اجزای اساسی سیستم ایمنی بدن در بدو تولد در نوزادان وجود دارد، بسیاری از اجزای سازنده تا زمانی که گوساله‌ها حداقل دو تا چهار هفته سن نداشته باشند، کارایی ندارند (Chase et al., 2008). بنابراین، اگر گوساله‌ها از سه هفتگی به بعد گروه‌بندی شوند، می‌توان خطر ابتلا به بیماری و مرگ و میر را کاهش داد. همچنین، هیچ تفاوت قابل توجهی برای رفتارهای اجتماعی بین گوساله‌هایی که از بدو تولد در کنار هم قرار گرفته‌اند در مقایسه با گوساله‌هایی که از سه هفتگی در کنار هم قرار گرفته اند، مشاهده نشده است (Duve et al., 2012).

در ایران، علی‌رغم اطلاع از کاهش هزینه‌ها و فواید نگهداری گوساله‌ها در جایگاه گروهی، دامدارها به‌دلیل ترس از شیوع بیماری‌های واگیردار در گوساله‌ها طی دوره قبل از شیرگیری، تمایلی برای گروه‌بندی زودهنگام گوساله‌ها ندارند و عمدتاً پس از شیرگیری گوساله-ها را به جایگاه گروهی منتقل می‌کنند. به دانش ما، مقایسه‌ای از سیستم پرورش انفرادی و گروهی در ایران انجام نشده است. بنابراین، هدف از انجام این آزمایش مقایسه عملکرد، تخمیر شکمبه، فراسنجه‌های خونی، و رفتار گوساله‌های انفرادی و گوساله‌های گروهی (از چهار هفتگی) بود. فرض ما این بود که گروه‌بندی کردن گوساله‌ها از چهار هفتگی بدون اثر منفی بر سلامت، منجر به بهبود عملکرد و رفتار گوساله‌ها می‌شود.

مواد و روش‌ها

این طرح پژوهشی با استفاده از ۳۲ رأس گوساله هلشتاین (۱۶ گوساله نر و ۱۶ گوساله ماده) در قالب آزمایش کاملا تصادفی با دو تیمار (۱۶ رأس گوساله برای هر تیمار) در گاوداری صنعتی فضیل واقع در اصفهان اجرا شد. به‌منظور اطمینان از وضعیت انتقال غیرفعال ایمنی کافی از طریق مصرف آغوز در گوساله‌های دو تیمار، فقط گوساله‌هایی که دارای سطح پروتئین سرم < ۵/۵ گرم در دسی لیتر بودند، در این مطالعه استفاده شدند. گوساله‌ها بر اساس وزن تولد (۲/۱ ± ۴۱/۵ کیلوگرم) به تیمارهای آزمایشی اختصاص یافتند. تمام گوساله‌ها تا سن چهار هفتگی در جایگاه‌های انفرادی (ابعاد ۲ × ۱/۵ مترمربع) نگهداری و در روز ۲ ± ۲۸، نیمی از گوساله‌ها به جایگاه‌های گروهی (چهار رأسی، ابعاد ۴ × ۳ مترمربع) منتقل شدند. بنابراین، تیمارها شامل ۱) گوساله-های پرورش یافته در جایگاه‌های انفرادی و ۲) گوساله‌های پرورش یافته در جایگاه‌های گروهی بودند. در طول دوره شیرخوارگی، گوساله‌ها دو بار در روز و در دو وعده غذایی برابر با استفاده از سطل با شیر ضایعات پاستوریزه تغذیه شدند. برنامه شیردهی به‌صورت افزایشی–کاهشی (۴، ۶، ۸، ۶، ۴، و ۲ لیتر/روز) بود. گوساله‌ها در دوره شیرخوارگی به‌طور میانگین حدود ۶/۲ لیتر در روز مصرف کردند. تمامی گوساله‌ها در ۶۳ روزگی از شیر گرفته شدند و انتهای آزمایش ۹۰ روزگی بود. از چهار روزگی گوساله‌ها به خوراک آغازین و آب تازه دسترسی آزاد داشتند. یک هفته پس از شیرگیری (۷۰ روزگی)، تمام گوساله‌ها گروه‌بندی شدند (چهار گوساله به‌ازای هر جایگاه، ۳ متر × ۴ متر). بستر تمام جایگاه‌ها از ابتدا تا انتهای طرح با خاک اره پوشیده شده بود و هر

۴۸ ساعت کاملاً تعویض شدند.

مصرف خوراک آغازین با توزین مقادیر خوراک ارائه شده و مقدار پس آخور روزانه تعیین شد. مصرف خوراک برای همه گوساله‌ها در سطح پن (میانگین چهار گوساله در هر پن) گزارش شد. ماده خشک مصرفی کل از مجموع ماده خشک مصرفی خوراک آغازین و شیر به‌دست آمد. گوساله‌ها در سن تولد (شروع طرح)، ۲۸ روزگی (گروه‌بندی)، ۶۳ روزگی (شیرگیری)، و ۹۰ روزگی (انتهای آزمایش) وزن‌کشی شدند. وزن بدن، میانگین افزایش وزن روزانه (گرم در روز) و رشد اسکلتی به‌صورت انفرادی اندازه‌گیری و گزارش شد. رشد اسکلتی گوساله‌ها (طول بدن، عرض هیپ، ارتفاع هیپ، ارتفاع جدوگاه، دور سینه و دور شکم) در ابتدا و انتهای طرح و با روش توصیف شده توسط خان و همکاران (Khan *et al*., 2007) اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین ترکیبات شیمیایی خوراک، نمونه‌های خوراک آغازین به‌صورت هفتگی جمع‌آوری شدند. مقدار ماده خشک نمونه‌های خوراک در آون ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت تعیین شد و سپس با استفاده از آسیاب ویلی (Arthur Thomas Co. Philadelphia, PA) آسیاب شدند. نمونه‌ها برای پروتیین خام، چربی، خاکستر (AOAC, 2002) و فیبر نامحلول در شوینده خنثی (Van Soest *et al*., 1991) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نشاسته با استفاده از روش اصلاح شده توسط زو و همکاران (Zhu *et al*., 2016) اندازه‌گیری شد. خوراک مصرفی شامل ۵۷/۷ درصد غله (۳۸/۷ درصد ذرت و ۱۹ درصد جو)، ۳۱/۳ درصد کنجاله سویا، ۱/۲ درصد سبوس گندم، ۱/۵ درصد کلسیم کربنات، ۱ درصد سدیم بی‌کربنات، ۰/۳ درصد منیزیم اکسید، ۲ درصد مخلوط ویتامینه و معدنی، و ۵ درصد کاه بود. ترکیب شیمیایی خوراک شامل ۹۳/۹ درصد ماده خشک، ۲۰/۴ درصد پروتئین، ۲۴ درصد الیاف نامحلول در شوینده خنثی، ۲/۰۳ درصد چربی، ۸/۱۳ درصد خاکستر، ۳۴/۷ درصد نشاسته و ۳/۰ مگاکالری بر کیلوگرم انرژی قابل متابولیسم بود.

نمونه‌های خون چهار روز قبل و چهار روز پس از شیرگیری، حدود چهار ساعت پس از تغذیه صبح جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۳۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و برای تجزیه و تحلیل بعدی در دمای ۲۰- نگهداری شد. غلظت-های گلوکز، کلسترول، و نیتروژن اوره خون با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون توسط آنالایزر خودکار بیوشیمیایی تعیین شدند.

داده‌های رفتار با مشاهده مستقیم همه گوساله‌ها به‌صورت جداگانه طی یک دوره ۲۴ ساعته و با فاصله پنج دقیقه یک بار در روزهای ۶۰ و ۸۹ روزگی ثبت شد. رفتارها توسط سه نفر آموزش دیده و از فاصله سه متری از جایگاه‌ها ثبت شد، به‌طوری‌که هیچ گونه مزاحمتی برای گوساله‌ها توسط مشاهده‌گرها ایجاد نشود. همچنین به‌منظور سهولت در ثبت رفتار گوساله‌های گروهی، بخشی از بدن آن‌ها با اسپری رنگی علامت‌دار شد. رفتارهای ثبت شده شامل جویدن (مجموع خوردن و نشخوار)، بازی (بازی با اشیاء، پریدن پر قدرت، لگد زدن، دویدن و توقف سریع و تغییر جهت، و بازی اجتماعی که شامل ایستادن گوساله‌ها روبروی هم و ضربه زدن به سر و یا گردن یکدیگر به‌صورت بازی گونه)، گرومینگ یا تیمار کردن (لیسیدن بخشی از بدن خود و یا سایر گوساله‌ها)، کراس ساکینگ یا مکیدن متقابل (مکیدن بخشی از بدن گوساله دیگر)، و سایر رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای (مکیدن و لیس زدن هرگونه از ساختارهای پن، به‌جز خوراک؛ خوردن مواد بستر؛ و چرخاندن زبان بیرون از دهان) بود که توسط عبدالفتاح و همکاران (Abdelfattah *et al*., 2018) و لروست و همکاران (Leruste *et al*., 2014) تعریف شدند. مایعات شکمبه چهار ساعت بعد از شروع تغذیه صبحگاهی با یک لوله معده و پمپ در ۵۰ و ۸۰ روزگی از گوساله‌های نر گرفته شد. بلافاصله پس از گرفتن نمونه، pH اندازه‌گیری شد. سپس چهار میلی‌لیتر از مایع شکمبه برای تثبیت با یک میلی‌لیتر اسید متافسفریک ۲۵ درصد اسیدی و ذخیره شد. اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه جی سی اندازه‌گیری شد.

وضعیت سلامت گوساله‌ها هر روز قبل از تغذیه صبحگاهی در کل دوره آزمایش توسط دامپزشک مزرعه و یکی از اعضای تیم تحقیقاتی بررسی شد. بررسی سلامت شامل نمره‌دهی مدفوع، نمره‌گذاری وضعیت ظاهری و امتیاز تنفسی بر اساس توصیفات هنریش و همکاران (Heinrichs *et al*., 2003) بود. نمره مدفوع غیرطبیعی به‌عنوان تعداد روزهای با نمره مدفوع ≥ ۳، وضعیت ظاهری و تنفسی غیر طبیعی به‌عنوان تعداد روزهای با نمره ≥ ۲ طبقه‌بندی شدند. تشخیص اسهال و پنومونی و معالجه گوساله‌های تأیید شده توسط دامپزشکان از مراحل استاندارد در دامداری تبعیت می‌کرد و در طول انجام آزمایش ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

قبل از آنالیز داده‌ها، نرمال بودن آن‌ها با استفاده از رویه UNIVARIATE بررسی شد. داده‌های مصرف خوراک بر اساس میانگین چهار گوساله در هر پن با استفاده از رویه مختلط (MIXED) در نرم‌افزار SAS (ورژن ۹/۴) آنالیز شد. اثرات جایگاه، جنسیت، زمان و اثر متقابل جایگاه × زمان به‌عنوان اثرات ثابت و پن به‌عنوان اثر تصادفی در نظر گرفته شد. رفتار مکیدن متقابل و رفتارهای دهانی غیرتغذیه‌ای توزیع نرمال نداشتند و قبل از تجزیه و تحلیل تبدیل لگاریتمی شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی بررسی شد و سطح $P<0.05$ معنی‌داری و سطح $0.05< P <0.10$ تمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد. داده‌های مربوط به وزن بدن، افزایش وزن بدن، رشد اسکلتی، خون، رفتار، و تخمیر شکمبه به‌صورت انفرادی در هر گوساله اندازه‌گیری و ثبت شد. مدل مورد استفاده برای این پارامترها مشابه مدل بالا بدون اثر زمان بود. به‌منظور مستقل در نظر گرفتن

گوساله‌ها در هر پن، اثر پن لانه‌گذاری شده در جایگاه به‌عنوان اثر تصادفی در نظر گرفته شد. فراوانی و مدت زمان بیماری‌های اسهال، پنومونی، کل روزهای درمان و تعداد روزهای با اسکور ≤ ۳، اسکور تنفسی و ظاهری ≤ ۲ با توزیع پواسون با استفاده از روش GLIMMIX SAS مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به مصرف خوراک آغازین، مصرف ماده خشک، افزایش وزن روزانه در دوره‌های قبل و بعد از شیرگیری و کل دوره و وزن بدن در دوره‌های تولد، ۲۸، ۶۳، ۹۰ روزگی در جدول ۱، و پارامترهای مربوط به رشد اسکلتی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که مصرف خوراک آغازین، مصرف کل ماده خشک، افزایش وزن روزانه، وزن بدن، و رشد اسکلتی گوساله‌ها در دوره‌های مختلف تحت تأثیر جایگاه و اثر متقابل جایگاه در زمان قرار نگرفتند (P>۰/۱۰). نتایج مربوط به مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه در مطالعه حاضر با نتایج چوا و همکاران (Chua *et al*., 2002) موافق بود. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2019) و بوشکووا و همکاران (Buckova *et al*., 2021) در طول دوره قبل از شیرگیری، تفاوتی در میزان مصرف خوراک آغازین، افزایش وزن روزانه و وزن بدن بین گوساله‌های اجتماعی و انفرادی مشاهده نکردند. برنال-ریگولی و همکاران (Bernal-Rigoli *et al*., 2012) دریافتند که مصرف ماده خشک در گوساله‌های گروهی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی بعد از ۴۱ روزگی بیشتر بود، که منجر به وزن‌گیری بیشتر در گوساله‌های گروهی شد. به همین ترتیب، نگهداری گوساله‌ها به‌صورت دوتایی با افزایش مصرف خوراک جامد همراه بوده است (Jensen *et al*., 2015). یک مطالعه نشان داد گوساله‌هایی که از بدو تولد یا سه هفتگی به‌صورت دوتایی نگهداری شدند، خوراک جامد بیشتری نسبت به گوساله‌های انفرادی مصرف کردند (Tapki, 2007). در مطالعه دیگر، نشان داده شد که پرورش دوتایی گوساله‌ها از هفته اول زندگی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی و یا جفت شده در شش هفتگی منجر به افزایش مصرف خوراک و وزن‌گیری شد (Costa *et al*., 2015). گزارش شده است گوساله‌هایی که در اوایل زندگی به‌صورت گروهی نگهداری می‌شدند، علاوه‌بر افزایش مصرف خوراک جامد، همچنین واکنش‌های رفتاری کمتری نسبت به اختلاط و از شیرگیری داشتند (Chua *et al*., 2002; Vieira *et al*., 2012). محققان افزایش در مصرف خوراک جامد و در نتیجه، وزن‌گیری بیشتر گوساله‌های اجتماعی را به یادگیری اجتماعی (Babu *et al*., 2004) و تسهیل اجتماعی (Vieira *et al*., 2010) مربوط می‌دانند.

جدول ۳ فراسنجه‌های خونی (گلوکز، نیتروژن اوره خون و کلسترول) گوساله‌ها را چهار روز قبل و چهار روز بعد از شیرگیری نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که سطح گلوکز و نیتروژن اوره خون گوساله‌های انفرادی و گروهی در قبل و بعد از شیرگیری تفاوتی نداشت (P>۰/۱۰). تره و همکاران (Terre *et al*., 2006) نیز تفاوتی در سطح گلوکز و اوره خون گوساله‌های گروهی و انفرادی مشاهده نکردند. سطح کلسترول در گوساله‌های انفرادی در مقایسه با گوساله‌های گروهی در قبل از شیرگیری (۱۳۳ در مقایسه با ۱۱۲ میلی‌گرم/دسی‌لیتر؛ P=۰/۰۳) و بعد از شیرگیری (۱۰۳ در مقایسه با ۸۵/۷ میلی‌گرم/دسی‌لیتر؛ P=۰/۰۴) بیشتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد احتمالاً گوساله‌های انفرادی نسبت به گوساله‌های گروهی در قبل و بعد از شیرگیری درگیر تنش متابولیکی بودند. مشاهده شده است طی دوره تنش به‌منظور تأمین تقاضای متابولیکی بالای بافت‌های بدن در سطوح لیپید سرم به‌ویژه کلسترول دگرگونی ایجاد می‌شود و سطح کلسترول سرم افزایش می‌یابد. طی دوره تنش به‌دلیل تحریک محور آدرنوکورتیکال غده هیپوفیز، ترشح هورمون‌هایی همچون کورتیزول، اپی نفرین، نور اپی نفرین و هورمون‌های رشد افزایش می‌یابد. این هورمون‌ها ماهیتاً لیپولایتیک هستند و منجر به موبیلیزه شدن ذخایر چربی بافت چربی و کبد برای تأمین احتیاجات بالای انرژی بافت‌ها می‌شوند (Vinay Agarwal, 1997).

تولید اسیدهای چرب فرار و pH مایع شکمبه گوساله‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که pH و تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه (استات، پروپیونات، بوتیرات، ایزو بوتیرات، والرات، ایزو والرات، کل اسیدهای چرب فرار، و نسبت استات به پروپیونات) در ۵۰ و ۸۰ روزگی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>/۱۰). مطالعه در مورد اثر جایگاه انفرادی و اجتماعی بر وضعیت تخمیر شکمبه وجود ندارد و این نتیجه احتمالاً می‌تواند به یکسان بودن ترکیبات خوراک آغازین تیمارها و عدم تفاوت در مصرف خوراک جامد گوساله‌ها در دوره‌های مختلف مربوط شود (Suarez-Mena *et al*., 2016).

جدول ۱– اثرات جایگاه انفرادی و گروهی بر مصرف خوراک آغازین، مصرف ماده خشک، وزن بدن، و افزایش وزن روزانه گوساله‌های شیری در قبل و بعد از شیرگیری

Table 1- Effects of individual or group housing on starter intake, dry matter intake (DMI), body weight (BW), and average daily gain (ADG) in dairy calves during pre- and postweaning

	تیمارها Treatments		SEM[1]	P-value		
	انفرادی Individual	گروهی Group		تیمار Treat	هفته week	تیمار × هفته Treat × week
مصرف خوراک آغازین (گرم/روز) Starter intake (g/d)						
قبل از شیرگیری Preweaning	257	262	33.3	0.35	<0.01	0.26
بعد از شیرگیری Postweaning	2345	2607	99.6	0.11	<0.01	0.38
کل دوره Total period	900	984	41.0	0.20	<0.01	0.26
مصرف ماده خشک (گرم/روز) DMI [2](g/d)						
قبل از شیرگیری Preweaning	1044	1049	33.3	0.82	<0.01	0.59
بعد از شیرگیری Postweaning	2345	2607	99.6	0.11	<0.01	0.38
کل دوره Total period	1444	1528	41.0	0.20	<0.01	0.51
افزایش وزن روزانه (گرم/روز) ADG (g/d)						
قبل از شیرگیری Preweaning	585	630	29.1	0.31	<0.01	0.97
بعد از شیرگیری Postweaning	1104	927	83.5	0.15	-	-
کل دوره Total period	758	729	37.1	0.99	<0.01	0.10
وزن بدن (کیلوگرم) BW (kg)						
تولد Birth	41.2	40.6	0.45	0.39	-	-
۲۸روزگی 28 d	51.5	52.8	0.88	0.34	-	-
۶۳ روزگی 63 d	77.8	81.7	1.74	0.12	-	-
۹۰ روزگی 90 d	100	101	2.63	0.90	-	-

[۱] میانگین خطای استاندارد

[۲]مصرف ماده خشک شامل مجموع مصرف خوراک آغازین و شیر بر اساس ماده خشک بود.

[1] Standard error of the mean
[2] Dry matter intake included the total consumption of starter and milk based on DM.

جدول ۲- اثرات جایگاه انفرادی و گروهی بر رشد اسکلتی گوساله‌های شیری در ابتدا و انتهای آزمایش

Table 2- Effects of individual or group housing on structural growth of dairy calves during initial (birth) and final (90 d) of the study

رشد اسکلتی (سانتی‌متر) Structural Growth (cm)	تیمارها Treatments		SEM[1]	P-value
	انفرادی Individual	گروهی Group		
دور سینه Heart girth				
ابتدای دوره Initial	80.6	79.6	0.55	0.24
انتهای دوره Final	107	107	1.05	0.94
عمق بدن Body barrel				
ابتدای دوره Initial	81.1	81.6	0.54	0.50
انتهای دوره Final	132	131	1.66	0.47
طول بدن Body length				
ابتدای دوره Initial	47.4	47.8	0.22	0.17
انتهای دوره Final	64.2	65.5	0.73	0.20
ارتفاع هیپ Hip height				
ابتدای دوره Initial	81.4	80.8	0.63	0.50
انتهای دوره Final	98.3	97.5	1.40	0.65
عرض هیپ Hip width				
ابتدای دوره Initial	17.6	17.4	0.19	0.50
انتهای دوره Final	23.2	24.0	0.43	0.26
ارتفاع جدوگاه Wither height				
ابتدای دوره Initial	80.1	78.8	0.61	0.16
انتهای دوره Final	95.1	93.4	1.07	0.27

[1] میانگین خطای استاندارد

[1] Standard error of the mean

داده‌های مربوط به رفتارشناسی در قبل و بعد از شیرگیری در جدول ۵ ارائه شده است. رفتار جویدن در قبل و بعد از شیرگیری تحت تأثیر جایگاه قرار نگرفت. رفتار بازی در قبل از شیرگیری تحت تأثیر گروه‌بندی قرار گرفت و گوساله‌های گروهی نسبت به گوساله‌های انفرادی فعالیت بازی بیشتری داشتند (۴/۷۶ در مقایسه با ۲/۵۷ درصد؛ P<۰/۰۱). ولی در پس از شیرگیری و با گروه‌بندی کردن تمام گوساله‌ها تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود نداشت (P>۰/۱۰). مطابق با این نتایج، مطالعات دیگر نیز افزایش فعالیت بازی را در گوساله‌های گروهی نسبت به گوساله‌های انفرادی گزارش کردند (Tapki, 2007). به‌طور کلی، رفتار بازی به‌عنوان شاخص رفاه و سلامت مورد توجه قرار

می‌گیرد (Chua *et al*., 2002; Babu *et al*., 2004) و فعالیت معنی-دار بازی در گوساله‌های گروهی نشان‌دهنده رفاه بهتر آن‌ها است. فرصت کمتر برای ارتباطات اجتماعی و فضای محدود در جایگاه انفرادی رفتار بازی را برای گوساله محدود می‌کند و این امر گوساله‌های انفرادی را در مقایسه با گروهی مجبور به ایستادن بدون فعالیت می‌کند (Babu *et al*., 2004). چوا و همکاران (Chua *et al*., 2002) گزارش کردند که افزایش فعالیت گوساله‌های دوتایی احتمالاً بخشی مربوط به افزایش فضای در دسترس است. فضای کافی یک عامل مهم برای بروز رفتارهای طبیعی و بروز رفتار بازی در گوساله‌ها است.

رفتار کراس ساکینگ یا مکیدن بخشی از بدن خود یا گوساله‌های دیگر و سایر رفتار دهانی غیر تغذیه‌ای تنها در قبل از شیرگیری تحت تأثیر گروه‌بندی قرار گرفتند. به این صورت که رفتار مکیدن متقابل در گوساله‌های گروهی (۱/۲۹ در مقایسه با ۰/۲۹ درصد؛ P=۰/۰۲) و سایر رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای (مکیدن اشیا و دیوارهای جایگاه، خوردن مواد بستر، چرخاندن زبان در بیرون از دهان) در گوساله‌های انفرادی (۳/۷۵ در مقایسه با ۲/۲۲ درصد؛ P=۰/۰۳) بیشتر بود. بابو و همکاران (Babu *et al*., 2004) نیز مشاهده کردند که رفتار مکیدن متقابل در میان گوساله‌های گروهی بیشتر از گوساله‌های انفرادی است. در مطالعه پمپک و همکاران (Pempek *et al*., 2016) مشاهده شد گوساله‌های انفرادی در مقایسه با گوساله‌های دوتایی، مدت زمان بیشتری را صرف رفتارهای غیرتغذیه‌ای (لیسیدن پن و خوردن کاه بستر) کردند، ولی گوساله‌های دوتایی مکیدن متقابل بیشتری داشتند که غالباً بعد از تغذیه شیر اتفاق می‌افتد. بروز رفتار مکیدن متقابل و رفتار دهانی غیر تغذیه‌ای در پس از شیرگیری در بین گوساله‌ها متفاوت نبود و به‌طور کلی، در پس از شیرگیری مشاهده نشد. کاهش در رفتار مکیدن متقابل در پس از شیرگیری در گوساله‌های گروهی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Keil and Langhans, 2001; Babu *et al*., 2004; Terre et al., 2006). یکی از دلایل کاهش وقوع رفتار مکیدن در پس از شیرگیری، عدم مصرف شیر است، چرا که مصرف شیر منجر به ترغیب بروز رفتار مکیدن توسط گوساله‌ها می‌شود (De Passillé, 2001). علاوه‌براین، افزایش مصرف خوراک جامد که اساساً در بعد از شیرگیری رخ می‌دهد باعث کاهش رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای می‌شود (Keil and Langhans, 2001; Babu *et al*., 2004).

جدول ۳– اثرات جایگاه انفرادی و گروهی بر فراسنجه‌های خونی گوساله‌های شیری در چهار روز قبل و بعد از شیرگیری (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)

Table 3- Effects of individual or group housing on blood metabolites of dairy calves during 4 d before and after weaning (mg/dl)

فراسنجه‌های خونی Blood metabolites	تیمارها Treatments انفرادی Individual	 گروهی Group	SEM[1]	P-value
گلوکز Glucose				
قبل از شیرگیری Preweaning	93.7	87.6	3.47	0.23
بعد از شیرگیری Postweaning	82.0	75.8	2.76	0.14
کلسترول Cholesterol				
قبل از شیرگیری Preweaning	133	112	6.39	0.03
بعد از شیرگیری Postweaning	103	85.7	5.56	0.04
نیتروژن خون Urea nitrogen				
قبل از شیرگیری Preweaning	15.2	15.8	0.82	0.75
بعد از شیرگیری Postweaning	19.5	18.1	1.10	0.31

[۱] میانگین خطای استاندارد

[1] Standard error of the mean

جدول ٤- اثرات جایگاه انفرادی و گروهی بر pH و اسیدهای چرب فرار شکمبه گوساله‌های شیری در ۵۰ و ۸۰ روزگی

Table 4- Effects of individual or group housing on ruminal pH and volatile fatty acids of dairy calves during 50 d and 80 d

pH و اسیدهای چرب فرار شکمبه Ruminal pH and volatile fatty acids	تیمارها Treatments انفرادی Individual	 گروهی Group	SEM[1]	P-value
میانگین پی اچ Mean pH				
50 d	5.47	5.34	0.08	0.33
80 d	5.55	5.64	0.13	0.68
کل اسیدهای چرب فرار (میلی مول) Total VFA (mM)				
50 d	88.4	70.7	10.1	0.24
80 d	95.9	103	6.47	0.48
مول/۱۰۰مول Mol/100 mol				
استات Acetate				
50 d	51.8	56.2	3.92	0.47
80 d	57.6	56.4	1.95	0.66
پروپیونات Propionate				
50 d	35.1	28.9	3.90	0.28
80 d	29.6	33.8	2.99	0.36
بوتیرات Butyrate				
50 d	10.0	10.4	2.74	0.71
80 d	8.79	6.91	1.67	0.44
ایزوبوتیرات Isobutyrate				
50 d	0.55	0.67	0.09	0.39
80 d	0.75	0.45	0.16	0.15
ایزووالرات Isovalerate				
50 d	0.72	1.12	0.16	0.10
80 d	1.25	0.75	0.30	0.16
والرات Valerate				
50 d	1.86	2.75	0.82	0.76
80 d	1.97	1.68	0.12	0.13
نسبت استات به پروپیونات Acetate:propionate ratio				
50 d	1.58	1.75	0.26	0.62
80 d	2.09	1.78	0.28	0.44

[۱] میانگین خطای استاندارد

[1]Standard error of the mean

جدول ۵- اثرات جایگاه انفرادی و گروهی بر رفتار گوساله‌های شیری در قبل و بعد از شیرگیری (۶۰ و ۸۹ روزگی؛ ٪)
Table 5- Effects of individual or group housing on behavior of dairy calves during before and after weaning (60 and 89 d, %)

رفتار Behavior	تیمارها Treatments انفرادی Individual	 گروهی Group	SEM[1]	P-value
بازی کردن Playing				
قبل از شیرگیری Preweaning	2.57	4.76	0.39	<0.01
بعد از شیرگیری Postweaning	3.50	4.33	0.43	0.23
مکیدن متقابل Cross sucking				
قبل از شیرگیری Preweaning	0.29	1.29	0.13	<0.01
بعد از شیرگیری Postweaning	0.00	0.00	-	-
تیمار کردن Grooming				
قبل از شیرگیری Preweaning	4.50	6.94	0.57	0.02
بعد از شیرگیری Postweaning	3.74	3.40	0.46	0.60
رفتارهای دهانی غیر تغذیه‌ای NNOB[2]				
قبل از شیرگیری Preweaning	3.75	2.22	0.39	0.03
بعد از شیرگیری Postweaning	1.42	1.16	0.23	0.41
کل جویدن Total chewing				
قبل از شیرگیری Preweaning	23.7	22.7	2.33	0.72
بعد از شیرگیری Postweaning	41.5	40.1	1.60	0.55

[۱] میانگین خطای استاندارد
[۲] رفتارهای دهانی غیرتغذیه‌ای

[1] Standard error of the mean
[2] Non-nutritive oral behaviors

رفتار گرومینگ یا تیمار کردن در قبل از شیرگیری تحت تأثیر اثر جایگاه قرار گرفت و در گوساله‌های گروهی نسبت به گوساله‌های انفرادی بیشتر بود (۶/۹۴ در مقایسه با ۴/۵۰ درصد؛ P=۰/۰۲). در مطالعه تپکی و همکاران (Tapki, 2007) گوساله‌های گروهی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی فعالیت مراقبت و تیمار کردن بیشتری داشتند. این الگوی رفتاری یکی از شاخص‌های خوب سلامت عمومی است و توسط گوساله‌ها به‌عنوان مراقبت از بدن خود و تیمار کردن پوشش موی همتای خود در گروه بیان می‌شود. همچنین، افزایش فعالیت تیمار کردن در گوساله‌های گروهی ممکن است به‌معنای رضایت از ارتباطات اجتماعی باشد (Babu *et al.*, 2004). بنابراین، کمتر بودن رفتار تیمار کردن در گوساله‌های انفرادی نشان می‌دهد که این گوساله-ها به‌میزان کمتری از ارتباطات خود رضایت داشتند. با این وجود، در

پس از شیرگیری که تمام گوساله‌ها به‌صورت گروهی پرورش یافتند، تفاوتی در رفتار تیمار کردن بین تیمارها مشاهده نشد.

جدول ٦– رگرسیون پواسون برای دفعات و طول مدت درمان اسهال، پنومونی و کل درمان طی دوره‌های قبل و بعد از شیرگیری و کل دوره، تعداد روزهای با اسکور مدفوع ≤ ۳، اسکورتنفسی ≤ ۲، و اسکور ظاهری ≤ ۲ در کل دوره در گوساله‌های نگهداری شده در جایگاه انفرادی و گروهی

Table 6- Poisson regression for frequency and duration of diarrhea, pneumonia, and days medicated during the preweaning, postweaning, and total period, fecal score ≥ 3, respiratory score ≥ 2, and general appearance (≥2) during the total period in individual- or group-housed calves

متغیر Item	تیمارها Treatments: انفرادی Individual	گروهی Group	SEM[1]	P-value
تعداد گوساله‌هایی که حداقل یک مرتبه برای بیماری تنفسی درمان شدند Number of calves diagnosed at least once for Respiratory-tract disease				
قبل از شیرگیری Preweaning	5.16	7/16	-	-
پس از شیرگیری Postweaning	5/16	2/16	-	-
کل دوره Total period	10/16	8/16	-	-
طول مدت درمان بیماری تنفسی Respiratory-tract disease duration (d/calf)				
قبل از شیرگیری Preweaning	1.60	1.09	0.19	0.24
بعد از شیرگیری Postweaning	0.48	0.46	0.36	0.94
کل دوره Total period	2.08	1.56	0.17	0.29
دفعات درمان بیماری تنفسی Respiratory-tract disease frequency				
قبل از شیرگیری Preweaning	0.69	0.57	0.30	0.69
بعد از شیرگیری Postweaning	0.36	0.20	0.42	0.40
کل دوره Total period	0.85	0.94	0.27	0.78
تعداد گوساله‌هایی که حداقل یک مرتبه برای اسهال درمان شدند Number of calves diagnosed at least once for diarrhea				
قبل از شیرگیری Preweaning	9/16	11/16	-	-
بعد از شیرگیری Postweaning	0/16	0/16	-	-
کل دوره Total period	10/16	11/16	-	-
طول مدت درمان بیماری اسهال Diarrhea disease duration (d/calf)				
قبل از شیرگیری Preweaning	3.89	4.21	0.10	0.66
بعد از شیرگیری Postweaning	0.00	0.00	-	-
کل دوره Total period	3.84	3.79	0.12	0.93

دفعات درمان بیماری اسهال Diarrhea disease frequency				
قبل از شیرگیری Preweaning	0.96	0.92	0.27	0.91
بعد از شیرگیری Postweaning	0.00	0.00	-	-
کل دوره Total period	0.85	0.94	0.27	0.78
کل روزهای تحت درمان برای اسهال و پنومونی Total days medicated [2]				
قبل از شیرگیری Preweaning	5.48	5.30	0.10	0.82
بعد از شیرگیری Postweaning	0.48	0.46	0.36	0.94
کل دوره Total period	5.92	5.35	0.10	0.50
تعداد روزهایی که اسکور مدفوع ≥۳بود Fecal score ≥ 3, d	3.86	4.18	0.12	0.66
تعداد روزهایی که اسکور تنفسی ≥۲ بود Respiratory score ≥ 2, d	2.37	1.85	0.16	0.33
تعداد روزهایی که اسکور ظاهری≥۲بود General appearance score ≥ 2, d	4.62	5.29	0.11	0.42

[۱] میانگین خطای استاندارد

[۲] روزهای تحت درمان برای اسهال و پنومونی

[1] Standard error of the mean

[2] Medicated days for both diarrhea and pneumonia

نتایج مربوط به وضعیت سلامت گوساله‌های انفرادی و گروهی در جدول ۶ آورده شده است. تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در تعداد دفعات و طول مدت درمان بیماری‌های اسهال و پنومونی و کل درمان‌های صورت گرفته در دوره‌های قبل و بعد از شیرگیری و کل دوره وجود نداشت (P>۰/۱۰). همچنین تعداد روزهای با اسکور مدفوع ≤ ۳ و تعداد روزهای با اسکور تنفسی و ظاهری ≤ ۲ در بین گوساله‌های انفرادی و گروهی معنی دار نبود. وقوع بالاتر بیماری در گوساله‌های گروهی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی در برخی مطالعات (Gulliksen *et al.*, 2009; Cobb *et al.*, 2014) گزارش شده است، در حالی که سایرین نتایج مخالفی را نشان دادند (Kung *et al.*, 1997; Hänninen *et al.*, 2003) یا تفاوت معنی‌داری را در وقوع بیماری گوساله‌های هر نوع سیستم پرورش نیافتند (Chua *et al.*, 2002; Terre *et al.*, 2006; Cobb *et al.*, 2014). نتایج متناقض نشان‌دهنده این است که فاکتورهایی همچون ایمنی گوساله (Jensen and Larsen, 2014)، بهداشت (Chua *et al.*, 2002)، تهویه (Cobb *et al.*, 2014) و تغذیه کافی نسبت به نوع جایگاه بر حساسیت بیماری از اهمیت بیشتری برخوردار است. مورگان و همکاران (Morgan, 2018) نشان دادند که تحت شرایط خوب مدیریتی گوساله‌های نگهداری شده در جایگاه‌های انفرادی و دوتایی قادر به تولید آنتی‌بادی به‌عنوان یک محرک ایمنی هستند و مقاومت مشابهی به بیماری دارند. در مطالعه حاضر، عدم تفاوت در وضعیت سلامت گوساله‌های گروهی در مقایسه با گوساله‌های انفرادی می‌تواند به کوچک بودن سایز گروه‌ها (چهار گوساله به‌ازای هر پن)، در اختیار داشتن فضای کافی به‌ازای هر گوساله و همچنین اختلاف سن کم بین گوساله‌های نگهداری شده در هر پن (۲ ± روز) نسبت داده شود. سونسون و همکاران (Svensson and Liberg, 2006) گزارش کردند که تماس نزدیک بین گوساله‌ها با سنین مختلف، در اختیار داشتن فضای محدود به‌ازای هر گوساله و افزایش سایز گروه می‌تواند منجر به افزایش خطر بروز بیماری‌های تنفسی گردد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج نشان داد که گروه‌بندی کردن گوساله‌ها از سن چهار هفتگی اثری بر عملکرد، تخمیر شکمبه، و سلامت گوساله‌ها ندارد. در حالی که، گروه‌بندی گوساله‌ها در دوره شیرخوارگی می‌تواند منجر به بهبود وضعیت رفاه (رفتار بازی و تیمار کردن) گوساله‌ها شود. بنابراین، با در نظر گرفتن فاکتورهایی همچون تغذیه مقدار کافی آغوز با کیفیت و سیستم ایمنی گوساله، بهداشت مناسب، کوچک بودن اندازه گروه و تهویه مناسب می‌توان گوساله‌ها را بدون اثر منفی بر عملکرد و سلامت از یک ماهگی در جایگاه‌های گروهی کوچک (چهار تایی) پرورش داد. پیشنهاد می‌شود که گروه‌بندی کردن گوساله‌ها در سنین و

اندازه گروه‌های متفاوت بر عملکرد و سلامت گوساله‌های شیرخوار با هم مقایسه شود.

References

1. Abdelfattah, E. M., Karousa, M. M., Lay, D. C., Marchant-Forde, J. N., & Eicher, S. D. (2018). Short communication: Effect of age at group housing on behavior, cortisol, health, and leukocyte differential counts of neonatal bull dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 596-602. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12632.
2. AOAC International. (2002). Official Methods of Analysis. Vol. 1. 17th ed. AOAC International, Arlington, VA.
3. Babu, L. K., Pandey, H. N., & Sahoo, A. (2004). Effect of individual versus group rearing on ethological and physiological responses of crossbred calves. *Applied Animal Behaviour Science*, *87*(3-4), 177-191. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.01.006.
4. Bernal-Rigoli, J. C., Allen, J. D., Marchello, J. A., Cuneo, S. P., Garcia, S. R., Xie, G., Hall, L. W., Burrows, C. D., & Duff, G. C. (2012). Effects of housing and feeding systems on performance of neonatal Holstein bull calves. *Journal of Animal Science*, *90*(8), 2818-2825. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4722.
5. Bučková, K., Šárová, R., Moravcsíková, Á., & Špinka, M. (2021). The effect of pair housing on dairy calf health, performance, and behavior. *Journal of Dairy Science*, *104*(9), 10282-10290. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19968.
6. Chase, C. C., Hurley, D. J., & Reber, A. J. (2008). Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *24*(1), 87-104. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001.
7. Chua, B., Coenen, E., Van Delen, J., & Weary, D. M. (2002). Effects of pair versus individual housing on the behavior and performance of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *85*(2), 360-364. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74082-4.
8. Cobb, C. J., Obeidat, B. S., Sellers, M. D., Pepper-Yowell, A. R., & Ballou, M. A. (2014). Group housing of Holstein calves in a poor indoor environment increases respiratory disease but does not influence performance or leukocyte responses. *Journal of Dairy Science*, *97*(5), 3099-3109. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7823.
9. Costa, J. H. C., Meagher, R. K., Von Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2015). Early pair housing increases solid feed intake and weight gains in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *98*(9), 6381-6386. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9395.
10. Curtis, G. C., Argo, C. M., Jones, D., & Grove‐White, D. H. (2016). Impact of feeding and housing systems on disease incidence in dairy calves. *Veterinary Record*, *179*(20), 512-512. https://doi.org/10.1136/vr.103895.
11. De Passillé, A. M. (2001). Sucking motivation and related problems in calves. *Applied Animal Behaviour Science*, *72*(3), 175-187. https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00108-3.
12. Duve, L. R., Weary, D. M., Halekoh, U., & Jensen, M. B. (2012). The effects of social contact and milk allowance on responses to handling, play, and social behavior in young dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *95*(11), 6571-6581. https://doi.org/10.3168/jds.2011-5170.
13. Gulliksen, S. M., Lie, K. I., Løken, T., & Østerås, O. (2009). Calf mortality in Norwegian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *92*(6), 2782-2795. https://doi.org/10.3168/jds.2008-1807.
14. Hänninen, L., Hepola, H., Rushen, J., De Passille, A. M., Pursiainen, P., Tuure, V. M., Syrjälä-Qvist, L., Pyykkönen, M., & Saloniemi, H. (2003). Resting behaviour, growth and diarrhoea incidence rate of young dairy calves housed individually or in groups in warm or cold buildings. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A—Animal Science*, *53*(1), 21-28. https://doi.org/10.1080/09064700310002008.
15. Heinrichs, A. J., Jones, C. M., VanRoekel, L. R., & Fowler, M. A. (2003). Calf Track: A system of dairy calf workforce management, training, and evaluation and health evaluation. *Journal of Dairy Science*, *86*(Suppl 1), 115.
16. Hepola, H., Hänninen, L., Pursiainen, P., Tuure, V. M., Syrjälä-Qvist, L., Pyykkönen, M., & Saloniemi, H. (2006). Feed intake and oral behaviour of dairy calves housed individually or in groups in warm or cold buildings. *Livestock Science*, *105*(1-3), 94-104. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.04.033.
17. Hötzel, M. J., Longo, C., Balcao, L. F., Cardoso, C. S., & Costa, J. H. (2014). A survey of management practices that influence performance and welfare of dairy calves reared in southern Brazil. *PLoS One*, *9*(12), e114995. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114995.
18. Jensen, M. B., Vestergaard, K. S., & Krohn, C. C. (1998). Play behaviour in dairy calves kept in pens: the effect of social contact and space allowance. *Applied Animal Behaviour Science*, *56*(2-4), 97-108. https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00106-8.
19. Jensen, M. B., & Larsen, L. E. (2014). Effects of level of social contact on dairy calf behavior and health. *Journal of Dairy Science*, *97*(8), 5035-5044. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7311.
20. Jensen, M. B., Duve, L. R., & Weary, D. M. (2015). Pair housing and enhanced milk allowance increase play behavior and improve performance in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *98*(4), 2568-2575. https://doi.org/10.3168/jds.2014-8272.
21. Keil, N. M., & Langhans, W. (2001). The development of intersucking in dairy calves around weaning. *Applied*

Animal Behaviour Science, *72*(4), 295-308. https://doi.org/10.1016/S0168-1591(00)00207-0.

22. Khan, M. A., Lee, H. J., Lee, W. S., Kim, H. S., Ki, K. S., Hur, T. Y., Suh, G. H., Kang, S. J., Choi, & Y. J. (2007). Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses of Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. *Journal of Dairy Science*, *90*(7), 3376-3387. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0104.
23. Kung Jr, L., Demarco, S., Siebenson, L. N., Joyner, E., Haenlein, G. F. W., & Morris, R. M. (1997). An evaluation of two management systems for rearing calves fed milk replacer. *Journal of Dairy Science*, *80*(10), 2529-2533. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76206-4.
24. Leruste, H., Brscic, M., Cozzi, G., Kemp, B., Wolthuis-Fillerup, M., Lensink, B. J., Bokkers, E. A. M., & Van Reenen, C. G. (2014). Prevalence and potential influencing factors of non-nutritive oral behaviors of veal calves on commercial farms. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 7021-7030. https://doi.org/10.3168/jds.2014-7917.
25. Liu, S., Ma, J., Li, J., Alugongo, G. M., Wu, Z., Wang, Y., Li, S., & Cao, Z. (2019). Effects of pair versus individual housing on performance, health, and behavior of dairy calves. *Animals*, *10*(1), 50. https://doi.org/10.3390/ani10010050.
26. Miller-Cushon, E. K., & DeVries, T. J. (2016). Effect of social housing on the development of feeding behavior and social feeding preferences of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *99*(2), 1406-1417. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9869.
27. Morgan, C.K. (2018). Evaluation of single vs. pair housing Holstein calves on specific antibody concentrations to KLH. (Honors Thesis Projects).University of Tennessee, Knoxville, USA.
28. Pempek, J. A., Eastridge, M. L., Swartzwelder, S. S., Daniels, K. M., & Yohe, T. T. (2016). Housing system may affect behavior and growth performance of Jersey heifer calves. *Journal of Dairy Science*, *99*(1), 569-578. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10088.
29. Suarez-Mena, F. X., Hill, T. M., Jones, C. M., & Heinrichs, A. J. (2016). Effect of forage provision on feed intake in dairy calves. *The Professional Animal Scientist*, *32*(4), 383-388. https://doi.org/10.15232/pas.2016-01502.
30. Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., & Olsson, S. O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, *58*(3-4), 179-197. https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00046-1.
31. Svensson, C., & Liberg, P. (2006). The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. *Preventive Veterinary Medicine*, *73*(1), 43-53. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.021.
32. Tapki, İ. (2007). Effects of individual or combined housing systems on behavioural and growth responses of dairy calves. *Acta Agriculturae Scand Section A*, *57*(2), 55-60. https://doi.org/10.1080/09064700701464405.
33. Terré, M., Bach, A., & Devant, M. (2006). Performance and behaviour of calves reared in groups or individually following an enhanced-growth feeding programme. *Journal of Dairy Research*, *73*(4), 480-486. https://doi.org/10.1017/S0022029906002019.
34. Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583-3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
35. Vieira, A. D. P., Von Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2010). Effects of pair versus single housing on performance and behavior of dairy calves before and after weaning from milk. *Journal of Dairy Science*, *93*(7), 3079-3085. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2516.
36. Vieira, A. D. P., Von Keyserlingk, M. A. G., & Weary, D. M. (2012). Presence of an older weaned companion influences feeding behavior and improves performance of dairy calves before and after weaning from milk. *Journal of dairy science*, *95*(6), 3218-3224. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4821.
37. Vinay Agarwal, B. G. (1997). Examination stress: Changes in serum cholesterol, triglycerides and total lipids. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, *41*(4): 404-408.
38. Whalin, L., Weary, D. M., & Von Keyserlingk, M. A. G. (2018). Pair housing dairy calves in modified calf hutches. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 5428-5433. https://doi.org/10.3168/jds.2017-14361.
39. Zhu, L., Jones, C., Guo, Q., Lewis, L., Stark, C. R., & Alavi, S. (2016). An evaluation of total starch and starch gelatinization methodologies in pelleted animal feed. *Journal of Animal Science*, *94*(4), 1501-1507. https://doi.org/10.2527/jas.2015-9822.

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 333-343

Effect of *Seidelitzia rosmarinus* Decoction on Productive and Reproductive Performance of Fresh Holstein Dairy Cows

Hossein Abdi-Benemar[1*], Mohsen Ramezani[2], Sayyad Seifzadeh[3]

Received: 15-09-2020
Revised: 31-08-2021
Accepted: 10-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Abdi-Benemar, H., Ramezani, M., & Seifzadeh, S. (2022) Effect of *Seidelitzia rosmarinus* decoction on productive and reproductive performance of fresh Holstein dairy cow. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 333-343.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.38314.0

Introduction: Recently, herbal additives have attracted interest for research due to their positive effects on animal health and production. The effects of herbal derived feed additives to their effects on rumen fermentation, gut microflora, immune system and the overall animal performance have been studied extensively and the observed results have been attributed to their antimicrobial, anti-oxidant, anti-inflammatory, immune regulatory and metabolic effects. *Seidelitzia romarinus* is one of the medicinal plants that has been used as forage in animal feeding for a long time. Although the nutritional values of halophytes such as *S. rosmarinus* are relatively good, they make palatable forage when mixed with other pasture plants. In addition, *S. rosmarinus* has some medicinal effects and used for the treatment of some diseases based on its antimicrobial and anti-oxidative effects. In traditional medicine, *S. rosmarinus* had been used extensively to attenuate the uterus problems after parturition especially for metritis prevention and treatment. Due to lack of any scientific evidences on the effects of *S. rosmarinus* on productive and reproductive performance of fresh cows, the aim of this study was to investigate the effect of *Seidelitzia rosmarinus* decoction on production and reproduction performance of fresh Holstein dairy cows.

Materials and Methods: One hundred post-parturient Holstein dairy cows were allocated randomly to experimental treatments from their parturition day in a completely randomized design. The experimental groups were 1) control cows and 2) the cows that received the decoction of 500 grams *S. rosmarinus* for first 3 days after parturition. Milk yield and composition were recorded monthly for five months after parturition. Reproductive performance including conception rate, service per conception and metritis incidence were recorded for three months after parturition. In addition, a blood sampling was done from all cows on day 12 after parturition. All animals were examined at 3-week intervals by rectal palpation until spontaneous estrus. Artificial insemination (AI) was performed by an experienced inseminator with frozen–thawed semen 12 to 18 hours after observed standing estrus and pregnancy was determined using ultrasonography between day 40 and 48 after insemination.

Results and Discussion: Milk production and composition of cows were not affected significantly by drinking *S. rosmarinus* decoction. The decoction of *S. rosmarinus* had positive effect on reproduction performance, so conception percentage of cows with lower than 100 days in milk and 100 to 200 days in milk increased when compared to control cows. Percentage of pregnant cows with 1 to 2 services per conception was

1- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
2- M.Sc. Graduated of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
3- Ph.D. of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.
*Corresponding Author Email: abdibenemar@uma.ac.ir

higher for medical herb group. Percentage of cows with normal uterus in the decoction received group was higher than control cows, 70 % versus 50.14 %, respectively. Incidence of metritis decreased in cows received *S. rosmarinus* decoction (20 % versus 31.42 %, respectively). The observed effects from the *S. rosmarinus* decoction may be attributed to the antimicrobial effects of *S. rosmarinus* that prevented from new uterine infections or treated some sub-clinical metritis and therefore resulted in healthier uterine and better reproductive performance. Concentrations of blood glucose and non-esterified fatty acids were affected by drinking *S. rosmarinus* decoction so, the decoction received cows had higher glucose and lower non-esterified fatty acids levels. These blood parameters are the indicators of overall energy status of the cow and the observed results shoes that cows received *S. rosmarinus* had better energy status. Concentrations of blood cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, urea, and beta hydroxy butyrate and blood enzyme activities including aspartate amino transferase and alkaline phosphatase were not influenced by drinking the herbal decoction.

Conclusion: The results proposed that *S. rosmarinus* decoction may have positive effects on reproductive performance of fresh Holstein dairy cows.

Keywords: Metrit, Milk production, Post-parturient cow, Pregnant cows.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان (*Seidlitzia rosmarinus*) بر عملکرد شیردهی و تولیدمثلی گاوهای اوایل شیردهی

حسین عبدی بنمار[1*]، محسن رمضانی[2]، صیاد سیف‌زاده[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹

عبدی بنمار، ح.، رمضانی، م.، و سیف‌زاده، ص. (۱۴۰۱). اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان (*Seidlitzia rosmarinus*) بر عملکرد شیردهی و تولیدمثلی گاوهای اوایل شیردهی. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۴۳-۳۳۳.

چکیده

چوغان با نام علمی *Seidlitzia rosmarinus*، گیاهی دارویی و بومی مناطق شورپسند بوده که ریشه آن سرشار از ساپونین می‌باشد و دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدعفونی‌کننده و ضد سم است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر عملکرد شیردهی و تولیدمثلی گاوهای تازه‌زای هلشتاین بود. ۱۰۰ رأس گاو شیری تازه زا با دو تیمار و ۵۰ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی بدین منظور استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل گروه کنترل بدون افزودنی گیاهی و گروه دریافت‌کننده جوشانده ۵۰۰ گرم گیاه دارویی چوغان به‌مدت سه روز پس از زایش بودند. به‌منظور تهیه جوشانده، ۵۰۰ گرم گیاه خشک چوغان با پنج لیتر آب به‌مدت حدود ۲۰ دقیقه جوشانده شد و محلول حاصل پس از خنک و صاف شدن به دام‌ها خورانده شد. جهت تعیین فراسنجه‌های خونی، از تمامی گاوها در روز ۱۲ خون‌گیری انجام شد. همچنین فراسنجه‌های تولیدمثلی شامل روزهای باز، فاصله زایش تا آبستنی، تعداد دام‌های آبستن شده تا سه ماه پس از زایش و وضعیت بروز مشکلات و بیماری‌های تولیدمثلی برای دام‌های دو گروه ثبت گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که استفاده از جوشانده گیاه دارویی چوغان در گاوهای پس از زایش تأثیر معنی‌داری بر میانگین تولید شیر و ترکیبات شیر را در طی پنج دوره پنج ماهه پس از زایش نداشت ($P>0/05$). درصد آبستنی کمتر از ۱۰۰ روز پس از زایش و ۱۰۰ تا ۲۰۰ روز پس از زایش نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد، درصد گاوهای آبستن شده با یک الی دو تلقیح در گروه‌های دریافت‌کننده چوغان بیشترین مقدار در مقایسه با گروه شاهد بود. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که ۷۰ درصد وضعیت رحم برای گاوهای دریافت‌کننده جوشانده گیاه چوغان نرمال بود، به‌طوری‌که این مقدار برای گاوهای گروه شاهد ۵۴/۱۴ درصد مشاهده گردید. همچنین نتایج مربوط به گاوهای درگیر متریت پس از زایش نیز نشان از کاهش درگیری متریت در گروه دریافت‌کننده جوشانده گیاه چوغان بود، به‌طوری‌که این مقدار ۲۰ درصد در مقابل ۳۱/۴۲ درصد در گروه شاهد بود. غلظت خونی گلوکز تحت تأثیر خوراندن جوشانده افزایش و غلظت اسیدهای چرب غیر استریفیه کاهش یافت. غلظت‌های خونی سایر فراسنجه‌ها شامل کلسترول، تری‌گلیسیرید، پروتئین‌کل، آلبومین، اوره و بتاهیدروکسی بوتیرات تحت تأثیر جوشانده گیاه دارویی چوغان قرار نگرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که خوراندن جوشانده گیاه دارویی چوغان به گاوهای تازه زایمان کرده می‌تواند اثرات مثبتی بر عملکرد تولیدی و تولیدمثلی گاوهای تازه‌زای هلشتاین داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: گاو پس از زایمان، تولید شیر، گاو آبستن، متریت.

۱- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲-دانش آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳- دکترای تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: abdibenemar@uma.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2021.38314.0

مقدمه

به‌منظور تأمین بخشی از احتیاجات پروتئینی جوامع بشری، گاوهای شیری در گله‌های بزرگ‌تر نگهداری شده و توجه ویژه‌ای به افزایش تولید شیر آن‌ها می‌شود (Lucy, 2000) و بیشتر تحقیقات و برنامه‌های اصلاح نژادی گاوهای شیری نیز بر اساس افزایش تولید شیر بوده است (Leitch *et al*., 1994). از آنجایی که پس از زایش، دوره جدیدی از شیردهی آغاز می‌شود، راندمان تولیدی دام‌ها طی حیات به توانایی آن‌ها در آبستن شدن بستگی دارد (Lucy, 2000). کاهش عملکرد تولیدمثلی گاوهای شیری و تأثیر آن بر تولید شیر از جمله مشکلاتی است که در دوره بعد از زایش در گاوهای شیری اتفاق می‌افتد (Plaizier *et al*., 1998) که این کاهش عملکرد تولیدمثلی در نهایت، با کاهش سودآوری و ضرر و زیان اقتصادی همراه است (De Vries *et al*., 2005). در گاو، رحم نسبت به عفونت و التهاب پس از زایش بسیار آسیب‌پذیر است و طی این دوره، باکتری‌های پاتوژن به‌راحتی می‌توانند از سرویکس عبور کنند و باعث آلوده شدن رحم و ایجاد آندومتریت شوند. عفونت‌های رحمی پس از زایمان اثرات مضری بر بازده تولیدمثلی دارد و باعث ضررهای اقتصادی می‌شوند و در این شرایط میزان بروز بیماری بسیار بالا است. مشکلات تولیدمثلی که در گاوهای زایمان کرده دیده می‌شوند وابسته به هم هستند و تعداد روزهای باز، فاصله زایش تا اولین تلقیح، تعداد تلقیح به ازای هر آبستنی و فاصله دو زایش را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این بیماری‌ها همچنین موجب کاهش تولید شیر نیز میشوند (Holt *et al*., 1989). ضررهای اقتصادی ناشی از کاهش عملکرد تولیدمثلی بعد از زایش عمدتاً به‌علت افزایش هزینه‌های دامپزشکی، اختلالات باروری، کاهش عملکرد حیاتی و تولید شیر می‌باشد (Wallace, 2004).

به‌منظور پیشگیری از مشکلات تولیدمثلی و عفونت‌های رحمی پس از زایش، روش‌های مختلفی جهت تسریع در جمع شدن رحم و تخلیه و کاهش ترشحات رحمی استفاده می‌شود که می‌توان به استفاده از هورمون‌هایی از قبیل اکسی‌توسین و استرادیول اشاره نمود. از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز جهت از بین بردن یا متوقف نمودن رشد باکتری‌ها در عفونت‌های رحمی استفاده می‌شود، ولی به‌دلیل تضعیف سیستم ایمنی بدن حیوان، نفوذ این داروها در شیر و تخریب بیشتر اندومتریوم خطراتی به همراه دارند (Andrew, 2004; Foldi *et al*., 2006). گیاهان دارویی و مواد مؤثره آن‌ها، که خصوصیات ضد میکروبی دارند، موجب تنظیم گردش خون، ایجاد خاصیت آنتی اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی می‌شوند، در رابطه با این موضوع پیشنهاد شده‌اند (Wallace, 2004; Vakili *et al*., 2003).

گیاه چوغان (*Seidlitzia rosmarinus*) درختچه‌ای چند ساله متعلق به خانواده اسفنجیان (*Chenopodiaceae*) بوده که در مناطق شور انتشار می‌یابد. این گیاه در تغذیه گوسفند و شتر استفاده می‌شود و در حاشیه کویر نقش مهمی در حفاظت از خاک ایفا می‌کند. از گیاه دارویی چوغان به‌عنوان ضدعفونی‌کننده، ضد سم، پادزهر و ضد کرم‌های روده‌ای استفاده می‌شود. همچنین چوغان به‌دلیل دارا بودن ترکیبان فنولی، آلکالوئید و ساپونین‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌باشند (Ghasemi *et al*., 2013). همچنین در تحقیق دیگر داوبی و همکاران (Davabi *et al*., 2020) گزارش کردند که عصاره چوغان سرشار از اسیدآمینه گلایسن هست در سنتز پروتئین نقش مهمی ایفا می‌کند. در مطالعه دیگری، توحیدی و همکاران (Towhidi and Zhandi, 2007) گزارش کردند که چوغان حاوی ویتامین E، پروتئین و مواد معدنی مختلفی همچون پتاسیم، آهن، منگنز، مس، روی، کلسیم، فسفر و منیزیم می‌باشد. در منطقه اردبیل و مغان به‌طور سنتی از جوشانده این گیاه جهت پیشگیری از عفونت‌های رحمی پس از زایش در گاوهای تازه زایمان کرده استفاده می‌شود. لذا با توجه به اینکه اطلاعات علمی و میزان اثربخشی این گیاه در پیشگیری از عفونت‌های رحمی پس از زایش وجود ندارد، پژوهشی تحت عنوان بررسی اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر عملکرد شیردهی و تولیدمثلی در گاوهای تازه زایمان کرده هلشتاین طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان واقع در شهرستان پارس‌آباد مغان، استان اردبیل انجام شد. در مدت آزمایش حداکثر دما به ۳۰ درجه سانتیگراد رسید و میانگین شاخص رطوبت ۷۵ بود. برای اجرای این آزمایش ۱۰۰ رأس گاو تازه زایمان کرده هلشتاین چند شکم زایش با میانگین تولید شیر بیشتر از ۱۲۰۰۰ لیتر در دوره قبلی و با میانگین وزنی ۵۰۰ الی ۵۵۰ کیلوگرم، انتخاب شده و به‌طور تصادفی به دو گروه آزمایشی تقسیم شدند. گیاه دارویی استفاده شده در این پژوهش، از نواحی اطراف شهرستان پارس آباد مغان جمع‌آوری و پس از خشک شدن مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل گروه کنترل بدون افزودنی گیاهی و گروه دریافت کننده جوشانده ۵۰۰ گرم گیاه چوغان بودند. نحوه مصرف گیاه دارویی چوغان به این صورت بود که ۵۰۰ گرم گیاه دارویی چوغان با حدود پنج لیتر آب جوشانده شد و سپس محلول به دست آمده با یک صافی پارچه‌ای صاف و محلول صاف شده پس از سرد شدن، بلافاصله پس از زایش به‌مدت سه روز در اختیار حیوان قرار داده شد. با توجه به اینکه دام‌های مورد آزمایش، پس از زایش به‌مدت سه تا پنج روز به‌منظور دریافت مراقبت‌های بیشتر در باکس‌های انفرادی زایشگاه نگهداری می‌شدند و به آبشخور انفرادی دسترسی داشتند، جوشانده مورد نظر از طریق آبشخور به آن‌ها تغذیه می‌شد. سنجش

ترشحات رحمی، از طریق معاینه چشمی واژن برای ترشحات مایل به قهوه‌ای و بودار برای تشخیص متریت بعد از زایش صورت گرفت. بازگشت رحم طبق روش آرتور (Arthur, 2001) به‌وسیله توش رکتال از روز ۱۵ به بعد انجام شد و تا بازگشت کامل رحم ادامه یافت. گاوهای که رفتار فحلی را از روز ۴۲ به بعد نشان می‌دادند، توسط مأمور تلقیح، تلقیح شدند و تعداد سرویس به‌ازای آبستنی محاسبه شد. تعداد سرویس‌های بعد از بروز فحلی تا تشخیص آبستنی برای هر حیوان ثبت شد. همچنین سایر فراسنجه‌های تولیدمثلی شامل روزهای باز، فاصله زایش تا آبستنی، تعداد دام‌های آبستن شده تا سه ماه پس از زایش و وضعیت بروز مشکلات و بیماری‌های تولیدمثلی نیز برای دام‌های دو گروه ثبت گردید. رکوردگیری از تولید شیر هر ۳۰ روز یک‌بار انجام شده و میزان تولید شیر دام‌ها تا پنج ماه پس از زایش رکوردبرداری شد.

جهت تعیین ترکیبات خون، از تمامی گاوها در روز ۱۲ خون- گیری انجام شد و نمونه‌های خون جمع‌آوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و برای جداسازی سرم از پلاسما به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم به‌دست آمده با نمونه‌گیر برداشته شده و درون میکروتیوب‌های سه میلی‌لیتری ریخته شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آنالیز آزمایشگاهی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از یخ‌گشایی نمونه‌های خونی یخ زده در دمای اتاق، غلظت گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، آلبومین، نیتروژن اوره‌ای خون، بتا هیدروکسی بوتیرات، اسیدهای چرب استریفیه شده، پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینو ترانسفراز در آزمایشگاه تشخیص طبی فارابی در اردبیل ارسال شده و با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (هیتاچی ۹۱۷، کشور ژاپن) تعیین شدند.

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار و ۵۰ تکرار و طی ۱۲۰ روز انجام شدپس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آماری برای فراسنجه‌های خونی با استفاده از نرم‌افزار SAS (2009) و روش Ttest انجام شد. در حالی‌که برای داده‌های تکرار شونده از جمله داده‌های شیر، چربی شیر و پروتئین شیر از روش Mixed استفاده گردید. آنالیز داده‌های درصدی مانند درصد آبستنی، تعداد سرویس به‌ازای آبستنی و اولین وضعیت بعد از چک از رویه روش χ^2 استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تأثیر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر عملکرد تولیدی گاوهای تازه‌زای هلشتاین در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج مربوط به شیر تولیدی در پنج ماه نشان می‌دهد، مصرف جوشانده چوغان بلافاصله بعد از زایش در گاوها میانگین شیر تولیدی را نتوانست در طی پنج ماه بعد از شیردهی تحت تأثیر قرار دهد (P>۰/۰۵). همچنین ترکیبات شیر از جمله چربی و پروتئین شیر تحت تأثیر جوشانده گیاهی چوغان قرار نگرفتند. رستم‌زاده و همکاران (Rostamzadeh *et al.*, 2015) گزارش کردند که استفاده از گیاه دارویی زنیان اثری بر مقدار و ترکیبات شیر در بزهای شیرده نداشت و علت آن را عدم تأثیر معنی‌دار تیمارها بر مصرف ماده خشک دانستند، چرا که تولید شیر تابع ماده خشک مصرفی می‌باشد. بنچار و همکاران (Benchaar *et al.*, 2006) گزارش کردند که افزودن سطوح مختلفی از یک اسانس ترکیبی (حاوی ۱۰۰ الی ۳۰۰ گرم در سروزل، ریزورسینول، تیمول، گویاکول و یوگینول) در سطح دو گرم در روز بر جیره غذایی گاوهای شیری، تأثیری بر میزان شیر و ترکیبات شیر نداشت. گزارش شده است که افزودن سطح ۲۵ و ۵۰ گرم آویشن در روز در جیره بزهای نژاد مهابادی، تأثیری بر مقدار تولید شیر و ترکیبات آن نداشت (Afshar *et al.*, 2012). درحالی‌که گیاناکاپلوس و همکاران (Giannakopoulos *et al.*, 2011) با بررسی اثرات اسانس‌های گیاهی بر تولید شیر میش‌های شیرده نشان دادند که استفاده از ۱۰۰ الی ۳۰۰ گرم در کیلوگرم سروزل، ریزورسینول، تیمول، گویاکول و یوگینول اثر افزایشی بر مقدار شیر داشته، امّا اثری بر ترکیبات شیر نشان نداد. شواهدی در مورد فعالیت ضد میکروبی گیاه‌های دارویی و ترکیبات فعال آن‌ها وجود دارد که زمینه بررسی اثر ترکیبات ثانویه فعال بر تخمیر میکروبی شکمبه جهت بهبود تولید و عملکرد در نشخوارکنندگان را فراهم می‌کند (Benchaar *et al.*, 2006).

عملکرد تولیدمثلی

نتایج مربوط به تأثیر جوشانده گیاه دارویی بر عملکرد تولیدمثلی گاوهای تازه‌زای هلشتاین در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که استفاده از جوشانده گیاه دارویی چوغان در گاوهایی که تازه زایمان کرده بودند، توانست اثر مثبتی بر عملکرد تولیدمثلی داشته باشد. نتایج مربوط به آبستنی با روزهای باز زیر ۱۰۰ روز نشان داد گروهی که جوشانده گیاه دارویی دریافت کرده بودند، آبستنی ۲۵/۸۰ درصد در مقابل ۲۱/۰۵ درصد گروه شاهد داشتند. همچنین نتایج نشان داد که درصد آبستنی با میانگین روزهای باز ۱۰۰ الی ۲۰۰ روز در گاوهای دریافت‌کننده چوغان ۵۴/۸۳ درصد و در گروه شاهد ۴۴/۷۳ درصد می‌باشد که نشان از اثر مثبت جوشانده چوغان در گاوهای بعد از زایمان دارد.

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پیش و پس از زایش

Table 1- Ingredients and chemical analysis of pre- and post-parturition diets

	جیره پیش از زایش Pre-parturition diet	جیره بعد از زایش Post-parturition diet
یونجه خشک Alfalfa hay	20.06	20.5
سیلوی ذرت Corn silage	51.46	16.7
کاه گندم Wheat straw	15.44	-
تفاله چقندر Beet pulp	2.05	4.3
دانه ذرت Corn grain	2.12	4.4
دانه جو Barley grain	1.28	22.8
سبوس گندم Wheat bran	3.60	2.3
کنجاله تخم پنبه Cottonseed meal	3.60	3.9
کنجاله کلزا Canola meal	-	6.0
کنجاله سویا Soybean meal	-	5.8
تخم پنبه Whole cottonseed	-	6.3
پودر چربی Fat powder	-	1.3
اکسید منیزیم Magnesium oxide	0.15	-
بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate	-	0.8
آهک Limestone	-	1.0
مکمل ویتامینه Vitamin premix	0.15	1.4
مکمل معدنی Mineral premix	0.11	0.9
ترکیب شیمیایی Chemical composition		
پروتئین خام Crude protein (%)	13.0	17.05
الیاف نا محلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber (%)	50.06	34.4
الیاف نا محلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber (%)	31.7	21.1
عصاره اتری Ethereal extract (%)	2.64	5.80

جدول ۲– اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر عملکرد شیردهی گاوهای تازه‌زای هلشتاین

Table 2- Effect of *Seidelitzia rosmarinus* decoction on production performance of fresh Holstein dairy cows

متغیر Item	شاهد Control	جوشانده چوغان *Seidelitzia rosmarinus* decoction	سطح معنی‌داری P-value	میانگین خطای استاندارد SEM
تولید شیر (کیلوگرم) Milk yield (kg)	34.85	35.39	0.44	0.70
چربی شیر (درصد) Milk fat (%)	3.59	3.35	0.35	0.17
پروتئین شیر (درصد) Milk protein (%)	3.18	3.07	0.26	0.26

[a,b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < ۰/۰۵$).

[a,b] Means within same row with different superscripts differ ($P<0.05$).

نتایج نشان داد که جوشانده گیاه دارویی تأثیر مثبتی بر تعداد سرویس به‌ازای آبستنی گاوهای هلشتاین داشته است. به‌طوری‌که تعداد سرویس به‌ازای آبستنی با میانگین ۱/۵ تلقیح در گروهی که جوشانده گیاه دارویی دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (۶۱/۲۹ درصد در مقابل ۴۴/۷۳ درصد). تعداد سرویس به‌ازای آبستنی با میانگین ۳/۵ تلقیح در گاوهای دریافت‌کننده جوشانده چوغان ۱۶/۱۲ درصد در مقابل ۱۸/۴۲ درصد بود که این نتایج نشان‌دهنده بهبود عملکرد تولیدمثلی گاوهای پس از زایش می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تأثیر جوشانده گیاه دارویی بر بیماری‌های تولیدمثلی از جمله متریت و ترشحات چرکی نشان داد که استفاده از جوشانده گیاه دارویی چوغان توانست متریت را در دوره پس از زایمان گاوهاکاهش دهد، به‌طوری‌که گروهی که جوشانده چوغان مصرف کرده بودند، درصد متریت کمتری نسبت به گروه شاهد داشتند (۲۰/۰۰ در مقابل ۳۰/۴۲ درصد گروه شاهد). بسیاری از داروهای گیاهی با فعال کردن گردش خون مناسب سبب کاهش بیماری‌های پس از زایش و سلامت حیوان می‌شوند (Chang *et al.*, 2013; Dongan *et al.*, 2014). دونگان و همکاران (Dongan *et al.*, 2014) گزارش کردند که استفاده از ریشه چای سبز و سیاه، ریزوم زنجبیل و ریشه شیرین بیان در کاهش بیماری‌های پس از زایش و بازگشت به تولیدمثلی طبیعی موثر می‌باشد. آن‌ها همچنین بیان کردند که استفاده از گیاهان دارویی فوق سبب کاهش فاصله زایش به‌ازای اولین سرویس، کاهش بروز جفت‌ماندگی و بهبود عملکرد تولیدمثلی در گاوهای بعد زایمان می‌شود. لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2002) در پژوهش خود تأثیر مثبت گیاه خواساپتونگ را بر کاهش خون‌ریزی بعد زایمان و افزایش میزان جمع شدن رحم نشان دادند. استفاده از یک مخلوط گیاهان داروی چینی به‌نام شنگ هوانگ (ریزوم زنجبیل و ریشه شیرین بیان) باعث برگشتن انقباضات رحمی به حالات طبیعی شده‌است (Hong *et al.*, 2003). گزارش شده است که عصاره لئونوروس با تحریک انقباضات رحمی می‌تواند سبب کاهش بروز جفت‌ماندگی در گاوها شود (Chan et al., 1983; Zhao *et al.*, 2008; Ma et al., 2000). دونگان و همکاران (Dongan *et al.*, 2014) نشان دادند که استفاده از مخلوط گیاهان دارویی شامل ریشه چای سبز و سیاه، ریزوم زنجبیل و ریشه شیرین بیان روزهای باز را در گاوهای شیری کاهش می‌دهد. طبق گزارش-های هو و همکاران (Ho *et al.*, 2011) و چانگ و همکاران (Chang *et al.*, 2013) استفاده از گیاهان دارویی در دوره پس از زایش در گاوها سبب بهبود بازگشت رحمی به حالت اولیه می‌شود. دونگان و همکاران (Dongan *et al.*, 2014) با بررسی اثرات شربت-های گیاهی لئونوروس بر وضعیت تولیدمثلی گاوهای هلشتاین نشان دادند که استفاده از این شربت سبب بهبود باروری می‌شود. عزیزیان شرمه و همکاران (Azizianshermeh *et al.*, 2016) با بررسی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات طلای بیوسنتر شده با عصاره آبی چوغان نشان دادند که نانوذرات بیوسنتر شده با عصاره آبی چوغان خاصیت ضد میکروبی مؤثری داشته، به‌طوری‌که توانسته اثر کشندگی مؤثری بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولای، انتروکوکوس فکالیس* و *سالمونلا تیفی موریوم* داشته باشد. در مطالعه عزیزیان شرمه و همکاران (Azizianshermeh *et al.*, 2016) همچین گزارش گردید که استفاده از سطوح ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی چوغان، اثر باکتری‌کشی قوی نسبت به باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولای، انتروکوکوس فکالیس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشته است. گیاه دارویی چوغان دارای ترکیبات مؤثره زیادی همچون ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنل‌ها، کتون‌ها و ترکیبات فنولی است که می‌تواند نقش مؤثری در افزایش سیستم ایمنی بدن و همچنین در از بین بردن میکروب‌های مضر داشته باشد (Emad, 2012). سابقه علمی در مورد اثر گیاه چوغان بر عملکرد تولیدمثلی و عملکردی گاوهای شیری وجود ندارد بنابراین، امکان بررسی گزارشات مشابه درباره اثرات این گیاه مقدور نمی‌باشد.

جدول ۳- اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر عملکرد تولیدمثلی گاوهای تازه‌زای هلشتاین

Table 3– Effect of *Seidelitzia rosmarinus* decoction on reproductive performance of fresh Holstein dairy cows

متغیر Item	شاهد Control	جوشانده چوغان *Seidelitzia rosmarinus* decoction	سطح معنی‌داری P-value	میانگین خطای استاندارد SEM
درصد آبستنی با روزهای باز زیر ۱۰۰ روز (درصد) Cows pregnant within 100 days post-partum (%)	21.05	25.80	0.64	0.57
درصد آبستنی با روزهای باز ۱۰۰ تا ۲۰۰ روز (درصد) Cows pregnant within 100 and 200 days post-partum (%)	44.73	54.83	0.40	0.48
درصد آبستنی با روزهای باز بالای ۲۰۰ روز (درصد) Cows pregnant after 200 days post-partum (%)	15.78	9.67	0.45	0.75
میانگین سرویس به‌ازای آبستنی Mean service per conception	1.80	1.68	0.58	0.14
یک الی دو سرویس به‌ازای آبستنی (درصد) 1 and 2 service per conception (%)	44.73	61.29	0.16	0.49
سه الی چهار سروبس به‌ازای آبستنی (درصد) 3 and 4 service per conception (%)	18.42	16.22	0.80	0.64
گاوهای با وضعیت نرمال در اولین چک (درصد) Normal cows in first check (%)	54.14	70.00	0.28	0.52
گاوهای با وضعیت متریت در اولین چک (درصد) Metritis cows in first check (%)	31.42	20.00	0.29	0.58
گاوهای با ترشحات چرکی اولین چک (درصد) Cows with Purulent discharge in first check (%)	11.42	10.00	0.85	0.80

فراسنجه‌های خونی

نتایج مربوط به اثر جوشانده گیاه دارویی بر فراسنجه‌های خونی گاوهای هلشتاین ۱۲ روز پس از زایش در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد، مصرف جوشانده گیاه دارویی چوغان اثر معنی‌داری بر غلظت‌های خونی گلوکز و اسیدهای غیر استریفیه داشت، به‌طوری‌که گاوهای دریافت‌کننده جوشانده غلظت گلوکز بالاتر و غلظت پایین‌تری از اسیدهای غیراستریفیه داشتند ($P<0.05$). تغییرات خونی این فراسنجه‌ها احتمالاً نشان از بهبود وضعیت انرژی دام‌ها دارد که با کاهش مشکلات رحمی و سلامت بیشتر دام‌ها مرتبط است. به‌طوری‌که ممکن است مشکلات رحمی و تولیدمثلی کمتر در دام‌ها باعث وضعیت تغذیه‌ای و متابولیکی بهتر شده باشد. سایر فراسنجه‌های خونی شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، اوره خون، آلبومین، پروتئین کل، آلکالین فسفاتاز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و بتاهیدروکسی بوتیرات تحت تأثیر جوشانده دارویی چوغان قرار نگرفت. سندروم کبد چرب در گاوهای شیری سبب کاهش اشتها می‌شود (Cebra *et al.*, 1997) و از طرفی، کتوز در اوایل شیردهی ممکن است سبب افزایش سطح آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز در خون شود (Steen, 2001) که شاخصی از آسیب احتمالی کبد است. آنزیم‌های کبدی معمولاً در خون در سطوح پایینی قرار دارند و افزایش سطوح خونی آن‌ها نشان از آسیب‌های کبدی است (Rezai Sarteshnizi *et al.*, 2020). در مطالعه حاضر نیز مقادیر آسپارتات آمینوترانسفراز به لحاظ عددی در گروه‌های دریافت‌کننده جوشانده چوغان پایین بود که نشان از آسیب کمتر کبد در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. در مورد استفاده از گیاهان دارویی بر فراسنجه‌های خونی دام نتایج مختلفی گزارش شده است، به‌طوری‌که در مطالعه‌ای کرایگ (Craig *et al.*, 1999) اثر اسانس‌های فرار گیاهی را در کاهش کلسترول و محافظت در برابر سرطان گزارش نمودند. اردکانی و همکاران (Ardekani *et al.*, 2011) گزارش کردند که استفاده از زیره سبز باعث کاهش گلوکز،کلسترول، LDL و تری‌گلیسرید در سرم موش‌های صحرایی می‌شود. در مطالعه یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2007) افزودن سینامالدئید، اسانس سیر و اسانس توت کوهی به جیره بره‌های با وزن ۲۳ کیلوگرم، تأثیری بر میزان غلظت گلوکز خون نداشت. در تحقیقی دیگر، مشخص شد که غلظت کلسترول سرم خون بره‌هایی که با اسانس سیر تغذیه شده بودند، تغییری نداشته است، در حالی‌که تری‌گلیسرید سرم خون بره‌های تغذیه شده با سینامالدئید بیشتر از بره‌های تغذیه شده با اسانس توت و سیر بود (Swingle *et al.*, 1996). ابابکری و ریاسی (Ababakri *et al.*, 2012) عدم تأثیر معنی‌دار اسانس نعناع را بر مقدار فراسنجه‌های خونی گزارش کردند.

جدول ٤– اثر جوشانده گیاه دارویی چوغان بر فراسنجه‌های خونی گاوهای تازه‌زای هلشتاین

Table 4– Effect of *Seidelitzia rosmarinus* decoction on blood parameters of fresh Holstein dairy cows

متغیر Item	شاهد Control	جوشانده چوغان *Seidelitzia rosmarinus* decoction	سطح معنی‌داری P-value	میانگین خطای استاندارد SEM
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) glucose (mg/dL)	50.53[b]	64.88[a]	0.008	3.57
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) Cholesterol (mg/dL)	88.60	101.10	0.17	6.32
تری گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) triglyceride (mg/dL)	12.66	12.06	0.57	0.75
اوره خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) Blood urea (g/dl)	21.86	24.73	0.20	1.55
آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر) Albumin (g/dl)	2.86	2.69	0.18	0.09
پروتئین کل (گرم بر دسی‌لیتر) Total protein (g/dl)	6.99	6.76	0.45	0.21
آلکالین فسفاتاز (میلی‌مول بر لیتر) Alkaline phosphatase (mmol/l)	16.66	16.80	0.95	1.52
آسپارتات آمینو تراسفراز (میلی‌مول بر لیتر) Aspartate amino transferees enzyme (U/l)	86.23	75.60	0.24	4.57
اسید چرب‌های غیراستریفیه Non-esterified fatty acid	0.256[a]	0.136[b]	0.04	0.04
بتاهیدروکسی بوتیرات (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) Beta hydroxy butyrate	0.550[b]	0.589[a]	0.05	0.04

[a,b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (۰/۰۵ > P).

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

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از جوشانده گیاه دارویی چوغان اثر مثبتی بر درصد آبستنی با روزهای باز زیر ۱۰۰ روز، کاهش میانگین تعداد سرویس به‌ازای آبستنی، کاهش درگیری با بیماری‌های عفونی از جمله متریت داشت. همچنین میانگین تولید شیر در گروه دریافت‌کننده جوشانده چوغان افزایش یافت. بالاتر بودن سطح گلوکز خون و غلظت پایین‌تر اسیدهای چرب غیر استریفیه خون نشان از وضعیت بهتر دام‌ها از نظر انرژی و سلامت عمومی دارند. لذا استفاده از جوشانده گیاه دارویی چوغان می‌تواند در هنگام درگیری گله با مشکلات رحمی توصیه شود. با توجه به میزان اطلاعات کم در این مورد انجام تحقیقات تکمیلی توصیه می‌شود.

References

1. Ababakri, R., Riasi, A., Fathi, M. H., Naeemipoor, H., & Khorsandi, S. (2012). The effect of spearmint sativum essence added to starter diet on ruminal fermentation, weaning age and performance of Holstein calve. *Journal of Animal Science Research*, *22*, 141-152.
2. Afshar, H., Pirmohammadi, M. H., & Fajri, M. (2012). The effects of adding thymus plant to lactating goats rations on digestibility parmeters and milk yield performance. *Animal Sciences Journal (Pajouhesh and Sazandegi), 101*, 29-36.
3. Andrew, A.H. (2004). Bovine medicine disease and husbandary of cattle. W. B. Saundres. pp. 508-513.
4. Ardekani, J., Akbarian, Z., & Nazarian, A. (2011). Effects of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) oil on serum glucose and lipid levels of rats. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 19*(3), 387-97.
5. Arthur, G. (2001). Veterinary reproduction and obstetrics, 2th ed, S.W.B. Saunders. pp. 189-200, 400-404,473-480. https://doi.org/10.1016/C2014-0-04782-X.
6. Azizianshermeh, O., Valizadeh, J., Noroozifar, M., & Qasemi, A. (2016). Investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized by aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *24*(5), 92-101.
7. Benchaar, C., Duynisveld, J., & Charmley, E. (2006). Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture

of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, *861*, 91-96.
8. Cebra, C.K., Gerry, F. B., Getzy, D. M., & Fettman, M. J. (1997). Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle: Retrospective study of serum biochemical abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *4*, 231-237. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00096.x.
9. Chan, W.C., Wong, Y. C., Kong, Y. C., Chun, Y. T., Chang, H. T., & Chan, W. F. (1983). Clinical observation on the uterotonic effect of I-mu Ts'ao (*Leonurus artemisia*). *The American Journal of Chinese Medicine*, *11*, 77-83. https://doi.org/10.1142/S0192415X83000136.
10. Chang, P.J., Tseng, Y. C., Chuang, C. H., Chen, Y. C., Hsieh, W. S., Hurng, B. S., Lin, S. J., & Chen P. C. (2013). Use of herbal dietary supplement Si-Wu-Tangand health-related quality of life in postpartum women: a population-based correlational study. *Evience-Based Complementary and Alternative Medicine*. https://doi.org/10.1155/2013/790474.
11. Craig, W. (1999). Health promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, *70*, 491-499. https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.491s.
12. Davabi, M., Azadi, R., Kolahi, M., & Pourreza, N. (2020). Identification of phytochemical, determination of some primary metabolites and antioxidant capacity in ashnan (*Seedlitzia rosmarinous*). *Journal of Developmental Biology*, *12*(4), 12-23.
13. De Vries, A., Steenholdt, C., & Risco, C. A. (2005). Pregnancy rates and milk production in natural service and artificially inseminated dairy herds in Florida and Georgia. *Journal of Dairy Science*, *88*, 948-956. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72762-4.
14. Dongan, C., Hianxi, I., Xuezhi, W., Jiasheng, X., Kai, K., Xurong, W., & Yang, Z. H. (2014). Efficacy of herbal tincture as treatment option for retained placenta in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, *145*, 23-28. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.018.
15. Emad, M. (2012). Identification of medicinal and industrial plants of forest and rangeland. Vol. 6.
16. Foldi, J., kulcsar, M., Pecsi, A., Hayghe, B., Desa, C., Cox, P., & Lohuis J. A. (2006). Bacterial complication of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science*, *96*, 265-281. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.006.
17. Ghasemi, P.A., Momeni, M., & Bahmani, M. (2013). Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, *10*(2), 368-385. https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i2.24.
18. GiannaSkopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas S., & yriazakis, K. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, *94*(11), 5569-5577. https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096
19. Ho, M., Li, T. C., & Su, S. Y. (2011). The association between tradi-tional Chinese dietary and herbal therapies and uterine involutionin postpartum women. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, https://doi.org/10.1155/2011/918291.
20. Holt, L.C., Whittier, W., Gwazdausk, F.C., & Vinson, W. E. (1989). Early postpartum reproductive profiles in Holstein cows with retained placenta and uterine discharge. *Journal of Dairy Science*, *72*, 533-539. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79137-2.
21. Hong, M., Yu, L., Ma, C., & Zhu, Q. (2003). Effect of extract from shenghua decoction on myoelectric activity of rabbit uterine muscle in the latest period of pregnancy (In Chinese). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, *28*, 1162–4.
22. Leitch, H. W., Smith, C., Burnside, E. B., & Quinton, M. (1994). Genetic response and inbreeding with different selection methods and mating designs for nucleus breeding programs of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *77*, 1702-1718. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77112-5
23. Liu, D. Y., Fan, L., & Huang, Z. H. (2002). Clinical observation on treatment of postpartum hemorrhage by xuesaitong soft capsule. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, *22*(3), 182-184.
24. Lucy, M. C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*, *83*, 1635-1647. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75032-6.
25. Ma, Y., Yang, D., Tian, Z., Qu, S., Ding, Y., & Wei, Y. (2000). Effect of motherwortherb on the myoelectric activity of uterus in rats. Chin. *The Journal of Chinese Medicine*, *25*, 364–366.
26. Pinedo, P.J., & DeVries, A. (2010). Effect of days to conception in the previous lactation on the risk of death and live culling around calving. *Journal of Dairy Science*, *93*, 968-977. https://doi.org/10.3168/jds.2009-2408
27. Plaizier, J. C., Lissemore, K. D., Kelton, D., & King, G. J. (1998). Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. *Journal of Dairy Science*, *81*, 1848-1854. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75755-8.
28. Rezai Sarteshnizi, F., Abdi-benemarm, H., Seifdavati, J., Khalilvandi-Behroozyar, H., Seyedsharifi, R., & Salem A. Z. M. (2020). Influence of spray-dried rumen fluid supplementation on performance, blood metabolites and cytokines in suckling Holstein calves. *Animal*, 1849-1856. https://doi.org/10.1017/S1751731120000518.
29. Rostamzadeh, H., Pirmohamadi, R., & Alijoo, Y. A. (2015). Effect of Ajowan plant essential oil (*Carium copticum*) on performance and some blood parameters of Mahabadi goats at early lactation period. *Animal Scienc*

Journal (Pajouhesh and Sazndegi), *26*(106), 103-110.
30. SAS. (2009). Version 9.2 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
31. Steen, A. (2001). Field study of dairy cows with reduced appetite in early lactation: Clinical examinations, blood and rumen fluid analyses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *42*, 219-228.
32. Swingle, R., Glenn, E., & Squires, V. (1996). Growth performance of lambs fed mixed diets containing halophyte ingredients. *Animal Feed Science Technology*, 63, 137-148. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01018-8.
33. Towhidi, A., & Zhandi, M. (2007). Chemical composition, *in vitro* digestibility and palatability of nine plant species for dromedary camels in the province of Semnan. *Egyptian Journal of Biology*, *9*(1), 47-52.
34. Vakili, A. R., Khorrami, B., Daneshmesgaran, M., & Parand, E. (2003). The effect of thyme and cinnamon essential oil on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. *Asian-Australas Journal Animal Science*, *7*, 935-944. https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12636.
35. Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, *63*, 621–629. https://doi.org/10.3923/RJMP.2014.204.213.
36. Yang, W., Benchaarc, B., Chaves, H. E. M., & Mcallister, T. (2007). Effect of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extend of digestion ruminal fermentation and on the site and extend of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, *90*, 5671-5681. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0369.
37. Zhao, D., Liu, W. N., Wang, W., Li, Y., Jiao, J., & Ren, L. (2008). Effects of HerbaLeonuri on contractile activity of the uterine smooth muscle isolated from normal, estrogen-treated or postpartum mice. *Herbal Med. Zhao, Z.H.*, *Moghadasia*, *6*, 640–642.

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 345-357

Investigating Nutritional Value of *Bassia scoparia* Seed *in vitro* for Ruminants Nutrition in Arid and Semi-Arid Regions

Mohsen Sari*[1], Yaser Monjezi[2], Jafar Nabati[3]

Received: 10-05-2021
Revised: 24-08-2021
Accepted: 13-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Sari, M., Monjezi, Y., & Nabati, J. (2022) Investigating nutritional value of *Bassia scoparia* seed *in vitro* for ruminants nutrition in arid and semi-arid regions. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 345-357.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.70411.1025

Introduction: Halophytes are plants with ability to survive in saline and alkaline soils and are drought resistant. In many areas of the world, native and introduced halophytes are forage resources, especially for sustaining grazing livestock when other feeds are scarce. Iran is a typical country of wide deserts and saline ecosystems and halophytes plays a major role in the halophytic and xerophytic vegetation of Iran. kochia is a drought-resistant annual plant that its cultivation is increasing in Iran. Due to the possibility of irrigating this plant with saline water, it can play an important role in providing the required feed to livestock in areas with saline soil and water by producing significant grains with high protein content. The aim of this study was to investigate effect of different levels of kochia seed in high concentrate diets on rumen fermentation.

Materials and Methods: Dietary treatments included control diet (no kochia seed) and three diets levels containing 10, 20 and 30 % of ration DM kochia seed. In all treatments, soybean meal and wheat bran in the diet were substituted with kochia seed. Gas production and dual-flow continuous culture system were used in this study. In the gas production test, treatments arranged as complete randomized design. The amount of gas produced in the samples was recorded at different hours after incubation and the parameters of gas production, organic matter digestibility and metabolic energy were calculated. In the second experiment, eight dual-flow continuous culture fermenters (1320 ml) were used in two periods (7 days adaptation, 3 days sampling). In each period, fermenters were randomly assigned to treatments. Temperature (38.5°C) and liquid and (10%/h) solid (5%/h) dilution rates were kept constant in the fermenters. Anaerobic conditions were maintained by the infusion of N2 at a rate of 40ml/min. Treatments were randomly assigned to fermenters. Fermenters were fed daily with 97 g dry matter. During sampling days, collection vessels were maintained at 4ºC to impede microbial action. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 500ml sample was removed via aspiration. Upon completion of each period, effluent from the 3 days of sampling was composited and mixed within fermenter and homogenized for 1 min. Subsamples were taken for total N, ammonia-N, and VFA analyses. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS. Fermenter and period were considered random effects. Comparisons between treatments were completed with Tukey's test. Effects were considered significant at $P<0.05$.

Results and Discussion: Inclusion of kochia seed in the diet increased gas production potential and amount of produced gas compared to the control diet. Increasing levels of kochia seed in the diet linearly increased metabolizable energy, organic matter digestibility and short chain fatty acid production. Low lignin content and high hemicellulose digestibility could be the main reasons behind higher metabolizable energy and organic matter digestibility observed in kochia containing diets. The observed increase in gas production potential as well as the volume of produced gas in kochia seed containing diets also supports that this feedstuff does not

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
2- Graduated M.Sc. of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran.
3- Assistant Professor, Legume Department, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author Email: m.sari@asnrukh.ac.ir

contain antinutritional factors with antimicrobial properties or the amount of these compounds in the grain is not significant. In the dual flow continuous culture study, dry matter digestibility linearly increased with increasing levels of kochia seed in the diet. Organic matter digestibility tended to increase using kochia seed in the diet (P =0.08). An increase in protein digestibility observed in treatments containing 20 and 30 % kochia seed compared to other treatments. Total VFA concentration increased linearly in diets containing kochia seed (P = 0.01). This finding could be the result of higher organic matter digestibility in kochia seed containing diets. Also, it has been suggested that higher rumen fiber digestibility or partial replacement of starch with a digestible cell wall can increase the total VFA concentration by increasing the population of fiber-degrading bacteria, a mechanism that is especially important in high-concentrate diets. Average ammonia nitrogen concentration, the concentration before feeding and 2 hours after feeding decreased in kochia containing diets compared to control diet. Despite the increase in crude protein digestibility in diets containing 20 and 30% kochia seed, the average ammonia nitrogen concentration in these treatments was lower compared to the control treatment. This finding can be the result of higher use of ammonia nitrogen in these treatments. The higher digestibility of dry matter and the tendency to increase the digestibility of organic matter by increasing level of kochia seed in the diet could support this idea.

Conclusion: The results of this study showed that using kochia seed in the diet up to 30% of ration dry matter could support optimal rumen fermentation. Due to the low water requirement and the ability of kochia plant to grow in saline soils on the one hand and the desirable energy and protein content of kochia seeds on the other hand, this grain can be used as a suitable option to meet part of the feed needed for ruminants in saline areas. Limited information is available and more in vivo research is needed in this area.

Keywords: Fermentation Characteristics, Halophytes, High concentrate diet, Kochia seed, Nutritional value.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی ارزش تغذیه‌ای دانه گیاه شورزیست کوشیا (*Bassia scoparia*) به‌روش برون تنی جهت استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان در مناطق خشک و نیمه خشک

محسن ساری[۱*]، یاسر منجزی[۲]، جعفر نباتی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

ساری، م.، منجزی، ی.، و نباتی، ج. (۱۴۰۱). بررسی ارزش تغذیه‌ای دانه گیاه شورزیست کوشیا (*Bassia scoparia*) به‌روش برون تنی جهت استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان در مناطق خشک و نیمه خشک. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۵۷-۳۴۵.

چکیده

تأثیر استفاده از دانه کوشیا بر تخمیر شکمبه‌ای با استفاده از جیره‌های آزمایشی شامل شاهد (بدون دانه کوشیا) و سه جیره حاوی سطوح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره، مورد بررسی قرار گرفت. از روش‌های تولید گاز و کشت پیوسته دوجریانه استفاده شد. هشت فرمانتور کشت پیوسته دوجریانه (۱۳۲۰ میلی‌لیتر) در دو دوره مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از دانه کوشیا در جیره، پتانسیل تولید گاز و حجم گاز تولیدی افزایش یافت. انرژی قابل متابولیسم، قابلیت هضم ماده آلی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با افزایش سطح دانه کوشیا به‌صورت خطی افزایش یافت. با افزایش سطح دانه کوشیا، قابلیت هضم ماده خشک به‌صورت خطی افزایش یافت. قابلیت هضم ماده آلی در جیره‌های حاوی دانه کوشیا تمایل به افزایش داشت. قابلیت هضم پروتئین خام در تیمارهای حاوی ۲۰ و ۳۰ درصد دانه کوشیا در مقایسه با دیگر تیمارها بالاتر بود. غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش سطح دانه کوشیا در جیره، به‌صورت خطی افزایش یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی در قبل از خوراک‌دهی، دو ساعت پس از خوراک‌دهی و میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان‌های مختلف با افزایش دانه کوشیا کاهش یافت. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از دانه کوشیا تا ۳۰ درصد ماده خشک جیره می‌تواند با تخمیر طبیعی در شکمبه، مورد استفاده حیوان میزبان قرار گیرد و به‌دلیل نیاز آبی کم و قابلیت کشت گیاه در خاک‌های شور، می‌تواند گزینه‌ای مناسب جهت تأمین بخشی از خوراک دام‌های نشخوارکننده در این مناطق باشد. برای جمع‌بندی، مطالعات بیشتری در دام زنده موردنیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارزش تغذیه‌ای، جیره‌های پر کنسانتره، خصوصیات تخمیر، دانه کوشیا، گیاهان شورزیست.

مقدمه

حدود ۳۳ درصد از زمین‌های تحت آبیاری در جهان و ۵۰ درصد از زمین‌های تحت آبیاری در ایران با مشکل شوری مواجه هستند (Qureshi et al., 2007). این در حالی است که فراهم کردن شرایط برای جلوگیری از گسترش خاک‌های شور و یا اصلاح آن‌ها به‌دلیل هزینه‌های قابل‌توجه، دشوار و گاه غیرممکن است (Basra and Basra, 1997). در مناطق خشک و نیمه خشک عمده‌ترین محدودیت کشاورزان، کمبود باران و منابع آب شیرین است و در بسیاری از این مناطق با افزایش استفاده از آب‌های نامتعارف و شور، مشکل شوری خاک تشدید شده و چالش‌های جدی برای تولید محصولات زراعی و دامی ایجاد شده است. یکی از پایدارترین روش‌های حفاظت از زیست‌بوم‌های خشک، نیمه بیابانی و بیابانی، استفاده از گیاهان شورزیست برای تغذیه دام‌های اهلی در جهت تولید

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، اهواز، ایران.

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان. ملاثانی، اهواز، ایران.

۳- استادیار گروه بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: m.sari@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2021.70411.1025

غذا برای ساکنین این مناطق است (Kafi et al., 201015 https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.08.022.). این گیاهان در خشکسالی‌های طولانی‌مدت، نقش خوراک مکمل را در تغذیه دام بازی می‌کنند و به‌دلیل منطبق بودن بر زیست‌بوم خشک و نیمه‌خشک، می‌توانند به‌صورت پایدار، در تأمین خوراک دام در این مناطق سهیم باشند (Rezvani Moghaddam et al., 2004). کوشیا (*Bassia scoparia*) گیاهی از خانواده کنوپودیاسه است که با داشتن ۱۰ تا ۱۵ گونه، ازجمله مهم‌ترین گیاهان شورزیست ایران به‌شمار می‌آید (Rankins et al., 1991a). این گیاه به‌عنوان یک محصول علوفه‌ای در مناطق خشک و نیمه خشک و دارای چندین ویژگی قابل توجه از جمله تحمل به خشکی و شوری، عملکرد رویشی بالا و تولید دانه‌ای با محتوای قابل‌توجه پروتئین و کربوهیدرات است (Friesen et al., 2009). دامنه گسترش این گیاه وسیع است و سازگاری بالایی با دماها و اقلیم‌های متفاوت دارد (Jami Al Ahmadi and Kafi, 2008). در آزمایشی افزایش شوری خاک تا ۲۰ دسی‌زیمنس بر متر پس از ۱۱ هفته آبیاری با آب شور، هیچ تأثیر منفی بر رشد این گیاه ایجاد نکرد (Danesh Mesgaran et al., 2008). علوفه کوشیا دارای ترکیبات ضد تغذیه‌ای مانند نیترات، اگزالات، ساپونین و آلکالوئیدها نیز می‌باشد (Dickie and James1983, Galitzer and Oehme, 1978) و استفاده از آن به‌عنوان تنها منبع علوفه‌ای در جیره نشخوارکنندگان می‌تواند موجب کاهش رشد، آسیب‌های کبدی، تغییرات متابولیکی و هورمونی در خون شود (Qureshi et al, 2007; Rankins et al.,1991b; Thilsted and Hibbs, 1989; Kirkpatrick et al, 1999).

آن‌چه در مورد گیاه کوشیا جالب توجه است، قابلیت بالای آن برای تولید دانه در هکتار می‌باشد. متوسط عملکرد دانه کوشیا از سه توده بیرجند، بروجرد و سبزوار ۲۱۴۷ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (Nabati et al., 2011). از سوی دیگر، محتوای پروتئین دانه حدود ۲۹ درصد بوده است (Coxworth et al., 1969). ترکیب اسیدهای چرب غیراشباع حدود پنج درصد کل اسیدهای چرب دانه کوشیا را تشکیل می‌دهد (Whitney et al., 2004). محتوای بالای پروتئینی دانه کوشیا باعث شده است تا در تغذیه طیور نیز امکان استفاده داشته باشد (Friesen et al., 2009). با این حال، در نشخوارکنندگان، قابلیت این گیاه تنها برای استفاده به‌عنوان منبع علوفه‌ای جیره مورد توجه قرار گرفته (Danesh Mesgaran and Stern, 2005; Jami Al Ahmadi and Kafi, 2008; Rezvani Moghaddam and Koocheki, 2004; Riasi et al., 2012) و در مورد تخمیر شکمبه‌ای دانه کوشیا اطلاعاتی در دست نیست. هدف از انجام این آزمایش، بررسی ارزش تغذیه‌ای و تخمیر شکمبه‌ای دانه کوشیا با استفاده از تولید گاز و کشت پیوسته دوجریانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش، از چهار جیره آزمایشی حاوی سطوح صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره استفاده شد. اجزای جیره‌ها و ترکیب شیمیایی جیره‌ها و دانه کوشیا در جدول ۱ آمده است. دانه کوشیا از مزرعه آموزشی تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد واقع در استان خراسان رضوی (مشهد) تهیه شد.

آزمایش تولید گاز

مایع شکمبه از کل محتویات شکمبه سه رأس گاو نر هلشتاین در کشتارگاهی واقع در شهر ملاثانی (خوزستان، شهرستان باوی) جمع‌آوری شد. محتویات شکمبه به‌وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف شده و سپس درون بطری در داخل فلاکس عایق‌دار آب گرم (۳۹ °C) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت اطمینان از شرایط بی‌هوازی مایع شکمبه صاف شده گاز دی‌اکسید کربن به آن تزریق می‌شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۹ °C) قرار داشت.

آزمایش تولید گاز با استفاده از روش منک و استینگس (۱۹۸۸) انجام شد (Menke and Steingass, 1988). بدین منظور، به ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه آسیاب شده با غربال یک میلی‌متری بود، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه اضافه شد و از دی‌اکسید کربن برای حداقل‌سازی ورود اکسیژن استفاده شد. تعداد پنج تکرار به‌ازای هر تیمار (جیره آزمایشی) مورد استفاده قرار گرفت. روزانه در دو نوبت ویال‌های آزمایشی تکان داده شد. میزان گاز تولید شده در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون، به‌وسیله دستگاه فشارسنج دیجیتال ثبت شد. داده‌های گاز تولیدی با استفاده از مدل نمایی ارسکوف و مکدونالد (۱۹۷۹) تجزیه و محاسبه شد (Ørskov and McDonald, 1979).

معادله (۱) $P = b\,(1 - e^{-ct})$

در این معادله، P: پتانسیل تولید گاز، b: تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر بر ساعت)، t: زمان و e: عدد نپری می‌باشد.

انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) و قابلیت هضم ماده آلی (درصد) با استفاده از معادله منک و همکاران (Menke et al., 1979) محاسبه شد.

معادله (۲)

$$ME\ (MJ/Kg\ DM) = 2.2 + 0.136\ GP + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2$$

$$IVOMD\ (\%) = 14.88 + 0.889\ GP + 0.45\ CP + 0.0651\ XA$$

در این معادله، DM: ماده خشک، CP: درصد پروتئین خام، XA:

درصد خاکستر و GP: میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی از ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.

پارتیشینگ فاکتور پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (PF_{24}؛ مقیاسی از بازده تخمیر) به‌صورت نسبت ماده تجزیه‌شده واقعی (TDS) به حجم گاز (میلی‌لیتر) تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (یعنی ماده آلی تجزیه‌شده واقعی/کل تولید گاز (GP_{24})) محاسبه شد (Blummel et al., 1997).

جدول ۱- اجزای خوراک و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (درصد از ماده خشک)

Table 1- Ingredients and chemical composition of the experimental diets (% of DM)

اقلام Items	درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره % of kochia seed in DM of diet				دانه کوشیا Kochia seed
	0	10	20	30	
یونجه Alfalfa	15	15	15	15	–
دانه ذرت Corn grain	22	22	22	22	–
دانه جو Barley grain	22	22	22	22	–
دانه کوشیا آسیاب شده Kochia seed	0	10	20	30	–
کنجاله سویا Soybean meal	15	12	9	6	–
سبوس گندم Wheat bran	25	18	11	4	–
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.3	0.3	0.3	0.3	–
مکمل ویتامین و مواد معدنی[1] Vitamin–mineral premix	0.4	0.4	0.4	0.4	–
نمک Salt	0.3	0.3	0.3	0.3	–
جمع Sum	100	100	100	100	–
ترکیب شیمیایی اندازه‌گیری شده (درصد) Measured chemical composition (%)					
پروتئین خام Crude protein	17.9	17.9	17.9	17.9	25.0
عصاره اتری Ether extract	3.0	3.8	4.5	5.3	11.0
ماده آلی Organic matter	87.5	88.2	88.2	88.5	95.8
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	27.2	28.9	29.4	31.1	50.3
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF	13.8	16.2	18.0	19.7	40.1
کربوهیدرات‌های غیر الیافی [2] NFC	49.0	46.9	44.8	42.7	9.2

[1] هر کیلوگرم مکمل حاوی ۶۰۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین D، ۲ هزار واحد بین‌المللی و یتامین E، ۲۵۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان، ۱۹۵ گرم کلسیم، ۸۰ گرم فسفر، ۲۱۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۲۲۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۳۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۲ میلی‌گرم ید و ۱/۱ میلی‌گرم سلنیوم.

[1] Contained per kilogram of supplement: 600,000 IU of vitamin A, 200,000 IU of vitamin D, 2000 IU of vitamin E, 2500 mg of antioxidant, 195 g of Ca, 80 g of P, 21000 mg of Mg, 2200 mg of Mn, 3000 mg of Fe, 300 mg of Cu, 300 mg of Zn, 100 mg of Co, 12 mg of I, and 1.1 mg of Se.

[2] NFC = 100 − (CP + EE + Ash + NDF)

تولید پروتئین میکروبی (MP) با استفاده از معادله ۳ زیر محاسبه شد (Blummel et al., 1997):

معادله (۳)

$$MP\ (mg / g\ DM) = mgTDS-(ml\ gas \times 2.2mg / ml)$$

که در این معادله، ۲/۲: عامل استوکیومتری برحسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن موردنیاز برای ساخت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) همراه با تولید یک میلی‌لیتر گاز است (Blummel et al., 1997).

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله گتاچیو و همکاران (۲۰۰۰) به‌صورت زیر محاسبه شد (Getachew et al., 2000):

معادله (۴)

$$SCFA\ (mmol/300\ mg\ DM) = 0.0222\ GP-0.00425$$

که در این معادله، GP: گاز خالص تولیدی پس از ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر/۳۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) است.

نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS 9.2 (۲۰۰۸) آنالیز شدند. اختلاف تیمارها در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از روش دانکن مورد بررسی قرار گرفت (SAS, 2008).

آزمایش کشت پیوسته دو جریانه

این آزمایش در آزمایشگاه کشت پیوسته دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت پذیرفت. هشت فرمانتور کشت پیوسته دو جریانه با حجم ۱۳۲۰ میلی‌لیتر در دو دوره ۱۰ روزه (هفت روز عادت‌پذیری و سه روز نمونه‌گیری) مورد استفاده قرار گرفت. فرمانتورها با مایع شکمبه به‌دست آمده به روشی که شرح آن در بخش تولید گاز آمده است، تلقیح شدند. دما ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و نرخ رقت فاز مایع (۱۰ درصد بر ساعت) و فاز جامد (پنج درصد بر ساعت) ثابت نگه داشته شد. شرایط بی‌هوازی با تزریق مداوم نیتروژن با سرعت ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه حفظ شد. بزاق مصنوعی به‌طور مداوم به فلاکس‌های تخمیر تزریق شده و برای شبیه‌سازی باز چرخ نیتروژن ۰/۴ گرم بر لیتر اوره به آن افزوده شد (Van Soest, 1994). فرمانتورها روزانه با ۹۷ گرم ماده خشک در سه وعده در ساعت‌های ۸ ، ۱۶ و ۲۴ تغذیه شدند. کنترل pH با تزریق اسیدکلریدریک یک مولار یا سود پنج مولار (Hoover and Stokes, 1991) توسط pH متر (مدل ۸۲۷، شرکت Metrohm کشور سوئیس) صورت گرفت.

طی روزهای نمونه‌گیری (سه روز آخر هر دوره) مخازن جمع‌آوری خروجی‌های فلاکس‌های تخمیر[1] (فاز جامد و مایع) با قرار دادن در آب سرد با دمای چهار درجه سانتی‌گراد خنک نگه‌داشته شدند تا از فعالیت میکروبی ممانعت به عمل آید. خروجی‌های فاز جامد و مایع با یکدیگر مخلوط شده و پس از هم زده شدن به‌مدت یک دقیقه با استفاده از مخلوط‌کن، نمونه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری از کل مخلوط گرفته شد. در انتهای هر دوره نمونه‌های گرفته شده طی سه روز گذشته، یکی شده و پس از مخلوط کردن به‌مدت دو دقیقه، نمونه‌هایی برای اندازه‌گیری کل نیتروژن و نیتروژن آمونیاکی گرفته شد. مابقی نمونه خشک شده و برای ماده خشک، خاکستر، NDF و ADF آنالیز شدند (۳۶).

تجزیه شیمیایی ماده خشک خروجی‌های فلاکس‌های تخمیر با خشک کردن سه تکرار ۳۰۰ میلی‌لیتری از آن در ۶۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در هر دوره آزمایشی به‌منظور برآورد تغییرات نیتروژن آمونیاکی نمونه‌گیری تا هشت ساعت پس از ورود خوراک‌دهی به فرمانتورها انجام شد. برای تعیین نیتروژن کل از روش کجلدال استفاده شد (AOAC., 1990). غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (Biochrom مدل Libra S22 ساخت کشور انگلیس) تعیین شد (Broderik and Kang, 1980).

داده‌ها در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (SAS, 2008) آنالیز شدند. تفاوت در تیمارها در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از آزمون مقایسات چندگانه توکی (Tukey, 1953) برای قابلیت هضم و دانکن برای نیتروژن آمونیاکی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت $Yij = \mu + Bi + Cj + eij$ بود که در این مدل، Yij: متغیر وابسته، μ: میانگین، Bi: اثر دوره به‌عنوان بلوک، Cj: اثر تیمار و eij: خطای باقیمانده است.

نتایج و بحث

تولید گاز

پتانسیل و نرخ تولید گاز در شرایط استفاده از سطوح مختلف دانه کوشیا در جیره با ۸۵ درصد مواد متراکم طی ۹۶ ساعت انکوباسیون در جدول ۲ و نمودار ۱ آورده شده‌اند. پتانسیل تولید گاز در جیره شاهد نسبت به جیره‌های حاوی دانه کوشیا کمتر بود ($P\leq0.05$) و بین جیره‌های حاوی دانه کوشیا تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نرخ تولید گاز جیره‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت. حجم گاز تجمعی در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون به‌طور معنی‌داری در جیره‌های حاوی دانه کوشیا در مقایسه با شاهد بالاتر بود. جیره‌های حاوی دانه کوشیا، انرژی قابل متابولیسم ($P=0.008$) و قابلیت هضم ماده آلی ($P=0.004$) بالاتری در مقایسه با جیره شاهد داشتند. با افزایش دانه کوشیا در جیره، غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به‌صورت خطی افزایش یافت ($P=0.001$).

1- Effluent

در جیره‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر، کوشیا با داشتن ۲۵ درصد پروتئین خام و ۵۰/۳ درصد NDF، جایگزین بخشی از کنجاله سویا و بخشی از سبوس جیره شد تا جیره‌ها به لحاظ پروتئین خام با یکدیگر مشابه باشند و نیز اختلاف در محتوای NDF جیره‌ها، به حداقل برسد. بالا بودن غیر معمول مقدار ADF در دانه کوشیا (۴۰ درصد ماده خشک) در مقایسه با دیگر اقلام موجود در جیره ازجمله سبوس (۱۵/۴ درصد ماده خشک)، افزایش در محتوای ADF جیره‌های حاوی دانه کوشیا را در پی داشت. بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، مطالعه‌ای که تخمیر شکمبه‌ای دانه کوشیا را مورد بررسی قرار داده باشد در دست نیست، در عین حال بالاتر بودن غلظت کل اسیدهای چرب فرار در آزمایش دوم پژوهش حاضر (جدول ۴) با استفاده از کشت پیوسته، از تولید بالاتر گاز و غلظت بالاتر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در آزمایش اول حمایت می‌کند. بالاتر بودن حجم گاز تجمعی در زمان‌های انتهایی انکوباسیون یعنی ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از شروع تخمیر نشان می‌دهد که این افزایش به‌دلیل کربوهیدرات‌های محلول در آب یا نشاسته سریع‌تجزیه نبوده و احتمالاً دیواره سلولی قابل تخمیر و کم بودن لیگنین در دانه این تفاوت را موجب شده باشد (He et al., 2020). به‌دلیل عدم اندازه‌گیری لیگنین در آزمایش حاضر، این ساز و کار باید با احتیاط مورد توجه قرار گیرد.

نشان داده شده است که گاز تولید شده در شرایط آزمایشگاهی تا ۴۰ درصد از تخمیر سوبسترای عرضه شده از خوراک بوده و باقیمانده آن از بافرها تولید می‌شود (Satter and Slyter, 1974). بافر بی‌کربنات، برای هر مول VFA تولید شده، حدود یک مول دی‌اکسید کربن آزاد می‌کند (Makkar, 2005). هی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تولید گاز در سه تا ۲۰ ساعت و ۷۲ ساعت انکوباسیون با محتوای پروتئین سوبسترا رابطه منفی دارد (He et al., 2020). طی تخمیر پروتئین، آمونیاک تولید می‌شود که با H^+ در محلول‌های بافر متصل می‌شود و درنتیجه تعادل در بافر به‌سمت HCO_3 تغییر می‌کند تا CO_2 کمتری آزاد شود (He et al., 2020). اگرچه محتوای پروتئین خام جیره‌های آزمایش حاضر یکسان در نظر گرفته شده، ولی یافته‌های آزمایش دوم مطالعه حاضر (جدول ۵) نشان می‌دهد که میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره شاهد بالاتر از جیره‌های حاوی دانه کوشیا می‌باشد. آمونیاک تولید شده در محیط تخمیر و نیز شکمبه، قابلیت خنثی‌کنندگی اسیدها را دارد (Tripathi et al., 2007)؛ بنابراین، با افزایش غلظت آمونیاک، اسیدهای بیشتری در محیط تخمیر خنثی‌شده و این موضوع با کاهش دی‌اکسید کربن آزاد شده از خنثی‌سازی بافر، تولید گاز را کاهش می‌دهد (Satter and Slyter, 1974).

جدول ۲– فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های حاوی سطوح مختلف دانه کوشیا

Table 2- Gas production parameters of diets containing different levels of kochia seed

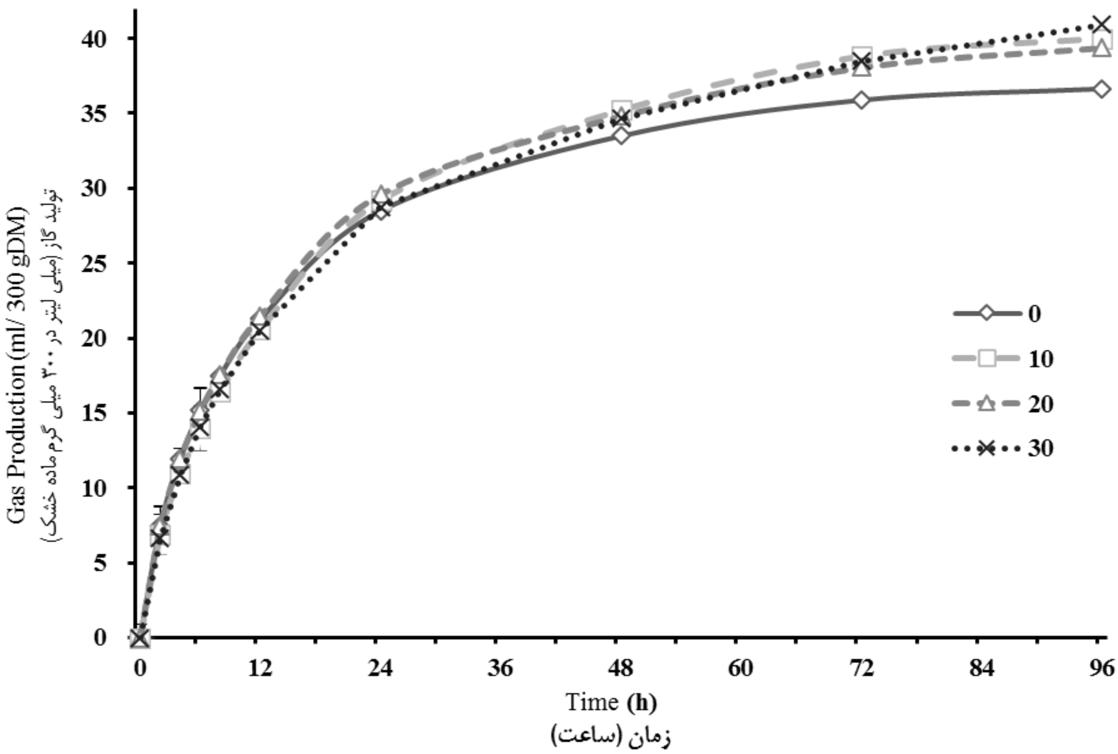
مؤلفه Parameters	درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره % of kochia seed in DM of diet				SEM [1]	*P*-value	خطی Linear	درجه دو Quadratic
	0	10	20	30				
پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر B (ml)	35.01 [b]	38.45 [a]	37.24 [a]	38.57 [a]	0.51	<0.001	0.10	0.05
نرخ تولید گاز C (ml/h)	0.086	0.069	0.080	0.067	0.003	0.20	0.50	0.54
ماده آلی هضم شده واقعی (OMTD)	185.9 [b]	184.1 [b]	191.8 [a]	194.5 [a]	2.50	0.02	0.06	0.30
انرژی قابل متابولیسم ME (MJ/kg DM)	8.23 [b]	8.45 [a]	8.46 [a]	8.62 [a]	0.07	0.008	0.001	0.73
قابلیت هضم ظاهری ماده آلی IVOMD (%)	56.39 [b]	57.85 [a]	57.81 [a]	59.19 [a]	0.44	0.004	0.007	0.92
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر SCFA (mmol)	0.82 [b]	0.85 [ab]	0.85 [ab]	0.88 [a]	0.01	0.009	0.001	0.93
فاکتور تفکیک‌کننده PF (mg/ml)	10.15	9.21	9.41	9.17	0.36	0.29	0.91	0.47

[۱] SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها،

[a,b] در هر ردیف اعداد دارای حروف غیر مشابه ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند ($P<0.05$).

[1] SEM: Standaed error of means,

[a,b] Means within a row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).



شکل ۱- اثر جیره‌های حاوی سطح مختلف دانه کوشیا بر روند تولید گاز

Figure 1- The effect of diets containing different levels of kochia seed on gas production process

اگرچه وجود برخی ترکیب‌های ضد تغذیه‌ای در علوفه کوشیا نشان داده شده است (Dickie and James, 1983; Galitzer and Oehme, 1978)، امّا گزارشی در مورد ترکیب‌های ضد تغذیه‌ای در دانه کوشیا در دست نیست. افزایش مشاهده شده در پتانسیل تولید گاز و نیز حجم گاز تولیدی با استفاده از دانه کوشیا در جیره نیز از این دیدگاه حمایت می‌کند که این ماده خوراکی حاوی ترکیب‌های با خاصیت ضد میکروبی نبوده یا مقدار این ترکیب‌ها در دانه قابل‌توجه نمی‌باشند.

کشت پیوسته دو جریانه

قابلیت هضم جیره‌های حاوی سطوح مختلف دانه کوشیا در فرمانتورهای کشت پیوسته دو جریانه در جدول ۳ آورده شده است. با افزایش سطح دانه کوشیا در جیره، قابلیت هضم ماده خشک به‌صورت خطی افزایش یافت (P=۰/۰۳) و تمایل به افزایش خطی قابلیت هضم ماده آلی در جیره‌های حاوی دانه کوشیا مشاهده شد (P=۰/۰۸). جیره‌های حاوی ۲۰ و ۳۰ درصد دانه کوشیا، بالاترین قابلیت هضم پروتئین خام را داشتند (P=۰/۰۱). تیمارها اختلاف معنی‌داری در قابلیت هضم NDF و ADF نداشتند.

کمتر بودن خاکستر در جیره‌های حاوی دانه کوشیا به افزایش ماده آلی و محتوای انرژی این جیره‌ها منتهی می‌شود. از سوی دیگر، با افزایش دانه کوشیا در جیره غلظت کربوهیدرات‌های غیر فیبری کاهش و غلظت NDF و ADF افزایش یافته است. این تغییرات در ترکیب شیمیایی جیره‌ها به همراه افزایش مشاهده شده در قابلیت هضم جیره‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً میزان لیگنینی شدن دانه کوشیا کم بوده و اجزای دیواره سلولی به‌خوبی تخمیر شده و توسط ریزجانداران شکمبه مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

اگرچه مطالعه‌ای که تخمیر شکمبه‌ای و قابلیت هضم دانه کوشیا در نشخوارکنندگان را مورد بررسی قرار داده باشد در دست نیست، ولی در یکی از محدود پژوهش‌های صورت گرفته با استفاده از دانه گیاه شورزیست *Suaeda glauca*، افزایش در قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و عصاره اتری با استفاده از سطوح افزایشی این ماده خوراکی مشاهده شد (Sun and Zhou, 2010). با توجه به افزایش مصرف پروتئین خام با استفاده از سطوح مختلف دانه *Suaeda glauca*، پژوهشگران افزایش مشاهده شده را به افزایش پروتئین خام مصرفی که محدودکننده تخمیر میکروبی بوده است، نسبت دادند.

جدول ۳- قابلیت هضم جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف دانه کوشیا در شرایط کشت پیوسته دو جریانه

Table 3- Digestibility of experimental diets containing different levels of kochia seed in continuous culture

مؤلفه Parameters	درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره % of kochia seed in DM of diet				SEM [1]	*P*-value	خطی linear	درجه دو Quadratic
	0	10	20	30				
ماده خشک Dry matter	50.6 ^{b}	53.1 ^{ab}	54.4 ^{ab}	55.2 ^{a}	1.33	0.011	0.03	0.23
ماده آلی Organic matter	46.3 ^{b}	52.4 ^{a}	51.0 ^{ab}	51.4 ^{ab}	1.70	0.08	0.08	0.10
پروتئین Crude protein	52.3 ^{b}	51.7 ^{b}	56.3 ^{a}	57.4 ^{a}	1.85	0.01	0.20	0.63
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	41.9	40.6	42.3	42.2	1.72	0.87	0.73	0.71
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF	33.7	29.8	33.2	31.3	3.02	0.79	0.78	0.76

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها،

[a,b] در هر ردیف اعداد دارای حروف غیر مشابه ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[1] SEM: Standaed error of means,

[a,b] Means within a row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

لازم به ذکر است که در پژوهش مذکور (Sun and Zhou, 2010) غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه گزارش نشده بود. اگرچه این یافته‌ها هماهنگ با افزایش مشاهده شده در قابلیت هضم پژوهش حاضر می‌باشد، ولی با توجه به مشابه بودن پروتئین خام جیره‌ها در پژوهش حاضر، ساز و کار مورد اشاره، توجیه‌کننده افزایش مشاهده شده در قابلیت هضم نمی‌باشد. در کل به‌دلیل محدودیت اطلاعات موجود، جمع‌بندی در این رابطه مستلزم انجام پژوهش‌های بیشتری است.

با افزایش سطح دانه کوشیا، غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌صورت خطی افزایش یافت (جدول ۴)، (P=۰/۰۱). تمایل به افزایش خطی (P=۰/۰۹) نسبت اسید بوتیریک با افزایش دانه کوشیا در جیره مشاهده شد. تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری در نسبت استات، پروپیونات و والرات نداشتند. بیشتر بودن غلظت کل اسیدهای چرب فرار در جیره‌های حاوی ۳۰ درصد دانه کوشیا در مقایسه با جیره شاهد می‌تواند نتیجه‌ای از بالاتر بودن قابلیت هضم ماده آلی در این جیره باشد (Yang, 2017) که با افزایش مشاهده شده در قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده آلی در آزمایش حاضر تطابق داشت. همچنین بیان شده است که قابلیت بالاتر هضم بخش الیافی در شکمبه یا جایگزینی بخشی از نشاسته با دیواره سلولی قابل‌هضم می‌تواند با افزایش جمعیت باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر، به افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار منتهی شود (Lechartier and Peyraud, 2011) که این ساز و کار به‌ویژه در جیره‌های با کنسانتره بالا دارای اهمیت است (Iraira et al., 2013).

بوتیرات یک اسید چرب کتوژنیک است که تولید آن تحت تأثیر عوامل مختلفی ازجمله غلظت قندها و الیاف جیره قرار می‌گیرد (Sun et al., 2020). در دیگر مطالعات، افزایش نسبت بوتیرات شکمبه‌ای با افزایش گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز در جیره گزارش‌شده است (Nabati et al., 2011). همچنین در پژوهشی نشان داده شده است که تغذیه منابع فیبری با قابلیت هضم بالاتر موجب افزایش نسبت بوتیرات شکمبه‌ای می‌شود (Lopez et al., 2000) که می‌تواند تمایل مشاهده شده به افزایش در غلظت بوتیرات در آزمایش حاضر را توجیه نماید.

الگوی تغییرات نیتروژن آمونیاکی تا هشت ساعت پس از خوراک‌دهی صبح در جدول ۵ آورده شده است. با افزایش سطح دانه کوشیا در جیره، غلظت نیتروژن آمونیاکی در قبل از خوراک‌دهی (P=۰/۰۱) و میانگین غلظت همه زمان‌ها (P=۰/۰۰۵) به‌صورت خطی کاهش یافت (جدول ۵). تیمارهای حاوی دانه کوشیا غلظت نیتروژن آمونیاکی کمتری نسبت به جیره شاهد در ساعت دو پس از خوراک‌دهی داشتند (P=۰/۰۱). اختلاف معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان‌های چهار، شش و هشت ساعت پس از خوراک‌دهی بین جیره‌های آزمایشی، مشاهده نشد. حداقل غلظت نیتروژن آمونیاکی که برای دستیابی به حداکثر رشد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی پیشنهاد شده است پنج میلی‌گرم در دسی‌لیتر می‌باشد (Salehi et al., 2009) که در آزمایش حاضر در همه زمان‌ها و همه تیمارها، غلظت نیتروژن آمونیاکی بالاتر از حداقل مورد اشاره بود؛ بنابراین، این عامل محدودکننده رشد ریزجانداران نمی‌باشد.

جدول ٤– تأثیر جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف دانه کوشیا بر اسیدهای چرب فرار در کشت پیوسته دو جریانه

Table 4- Effects of experimental diets containing different levels of **k**ochia seed on total and individual volatile fatty acids (VFA) in continuous culture

مؤلفه‌ها Parameters	درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره % of kochia seed in DM of diet				SEM [1]	*P*-value	خطی Linear	درجه دو Quadratic
	0	10	20	30				
کل اسیدهای چرب فرار Total VFA (mM)	96.7 [b]	97.4 [b]	101.3 [ab]	105.0 [a]	1.54	0.05	0.01	0.38
اسیدهای چرب فرار VFA (mol/100 mol)								
استیک Acetate	56.3	54.1	53.2	53.5	1.39	0.21	0.60	0.56
پروپیونیک Propionate	29.5	32.1	30.9	31.2	0.63	0.014	0.17	0.63
بوتیریک Butyrate	12.7	12.3	14.5	13.9	1.00	0.45	0.09	0.45
والریک Valerate	1.45	1.50	1.40	1.35	0.31	0.98	0.79	0.88
استیک/پروپیونیک Acetate/propionate	1.91	1.69	1.72	1.71	0.075	0.12	0.30	0.75

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها،

[a,b] در هر ردیف اعداد دارای حروف غیر مشابه ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[1] SEM: Standaed error of means,
[a,b] Means within a row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

جدول ۵– تأثیر جیره‌های آزمایشی بر نیتروژن آمونیاکی شکمبه در ساعت‌های مختلف پس از خوراک‌دهی (ساعت‌های ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸) در کشت پیوسته دو جریانه

Table 5- Effects of experimental diets containing different levels of kochia seed on ruminal ammonia N concentration in continuous culture

ساعت Hour	درصد دانه کوشیا در ماده خشک جیره % of kochia seed in DM of diet				SEM [1]	*P*-value	خطی Linear	درجه دو Quadratic
	0	**10**	**20**	**30**				
0	8.13 [a]	7.14 [ab]	6.75 [ab]	5.76 [b]	0.61	0.01	0.01	0.99
2	14.5 [a]	12.1 [b]	10.6 [b]	11.5 [b]	0.98	0.01	0.06	0.04
4	17.0	14.6	13.9	12.9	1.28	0.19	0.04	0.60
6	12.9	14.4	11.4	12.1	1.69	0.64	0.49	0.81
8	11.1	10.9	10.1	11.9	1.16	0.34	0.43	0.11
میانگین Average	12.7 [a]	11.8 [ab]	10.6 [b]	10.8 [b]	0.57	0.03	0.005	0.16

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها،

[a,b] در هر ردیف اعداد دارای حروف غیر مشابه ازنظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[1] SEM: Standaed error of means,
[a,b] Means within a row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

مقدار و سرعت آزادسازی نیتروژن غیر پروتئینی و پروتئین قابل تجزیه در شکمبه، عرضه ماده آلی قابل تخمیر و فرآیندهایی مانند دآمیناسیون اسیدهای آمینه، تخمیر میکروبی و جذب آمونیاک از دیواره شکمبه، غلظت آمونیاک را در شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Oba, 2011) که در مطالعات آزمایشگاهی به‌دلیل فقدان جذب از دیواره شکمبه، آخرین مورد، ازجمله عوامل مؤثر محسوب نمی‌شود. با وجود افزایش قابلیت هضم پروتئین خام در جیره‌های حاوی ۲۰ و ۳۰ درصد کوشیا (جدول ۳)، میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی در این تیمارها کمتر از شاهد بوده است که این یافته می‌تواند نتیجه‌ای از بالاتر بودن استفاده از نیتروژن آمونیاکی در این تیمارها باشد. بالاتر بودن قابلیت هضم ماده خشک و تمایل به افزایش قابلیت هضم ماده آلی با افزایش سطح کوشیا در جیره از این دیدگاه حمایت می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از دانه کوشیا در جیره حجم گاز تولیدی در انتهای انکوباسیون را افزایش داد و بهبود پتانسیل تولید گاز را موجب شد. در

آزمایش کشت پیوسته، افزایش قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلـی و پروتئین خام و نیز افزایش خطی غلظت کل اسیدهای چـرب فـرار بـا استفاده از دانه کوشیا در جیره، نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای ایـن مـاده خوراکی برای استفاده در جیره نشخوارکنندگان است. با توجه به اقلیم خشک ایران، قابلیت رشد گیاه کوشیا در زمین‌هـای بـا خـاک شـور و قلیایی و نیز تحمل آن در برابر تنش شوری، به ارزش آن می‌افزاید. با توجه به یافته‌های آزمایش حاضـر و محـدودیت اطلاعـات موجـود از یک‌سو و اهمیـت اسـتفاده از مـواد خـوراکی در دسـترس در شـرایط خشک‌سالی از سوی دیگر، پیشـنهاد مـی‌شـود مطالعـات بیشـتری در خصوص استفاده از دانه کوشیا در جیـره نشـخوارکنندگان بـه‌ویـژه در شرایط مزرعه‌ای صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
2. Basra, A. S., & Basra, R. K. (1997). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. *Harwood Academic Publishers*.
3. Blummel, M., Steingss, H., & Becker, K. (1997). The relationship between in vitro gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, *77*, 911–921. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81628-8.
4. Broderik, G. A., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, *63*, 64-75. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.
5. Coxworth, E., Bell, J., & Ashford, R. (1969). Preliminary evaluations of Russian thistle, kochia, and garden atriplex as potential high protein content seed crops for semiarid areas. *Canadian Journal of Plant Science*, *49*, 427-434. https://doi.org/10.4141/cjps69-071.
6. Danesh Mesgaran, M., & Stern, M. D. (2005). Ruminal and post-ruminal protein disappearance of various feeds originating from Iranian plant varieties determined by the *in situ* mobile bag technique and alternative methods. *Animal Feed Science and Technology*, *118*, 31–46. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.10.009.
7. Dickie, C. W., & James, L. F. (1983). *Kochia scoparia* poisoning in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *183*, 765-768.
8. Friesen, L. F., Beckie, H. J., Warwick, S. I., & Van Acker, R. C. (2009). The biology of Canadian weeds. 138. *Kochia scoparia* (L.) Schrad. *Canadian Journal of Plant Science*, 89, 141-167. https://doi.org/10.4141/CJPS08057.
9. Galitzer, S. J., & Oehme, F. W. (1978). *Kochia scoparia* (L.) Schrad. toxicity in cattle: A literature review. *Veterinary and Human Toxicology*, *20*, 421-423.
10. Getachew, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2000). Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition*, *84*, 73–83. https://doi.org/10.1017/S0007114500001252.
11. He, Y., Cone, J. W., Hendriks, W. H., & Dijkstra, J. (2020). Relationships between chemical composition and *in vitro* gas production parameters of maize leaves and stems. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *104*, 12–21. https://doi.org/10.1111/jpn.13221.
12. Hoover, W. H., & Stokes, S. R. (1991). Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science*, *74*, 3630-3644. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78553-6.
13. Iraira, S. P., Ruiz De La Torre, J. L., Rodríguez-Prado, M., Calsamiglia, S., Manteca, X., & Ferret, A. (2013). Feed intake, ruminal fermentation, and animal behavior of beef heifers fed forage free diets containing nonforage fiber sources. *Journal of Animal Science*, *91*(8), 3827-3835. https://doi.org/10.2527/jas.2012-5803.
14. Jami Al Ahmadi, M., & Kafi, M. (2008). Kochia (*Kochia scoparia*): To be or not to be? In: Crop and Forage Production Using Saline Waters. M. Kafi and M.A. Khan, eds. NAM S & T Centre. Daya Publisher, New Delhi.
15. Kafi, M., Asadi, H., & Ganjeali, A. (2010). Possible utilization of high salinity waters and application of low amounts of water for production of the halophyte *Kochia scoparia* as alternative fodder in saline agroecosystems. *Agricultural Water Management*, *97*, 139-147. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2009.08.022.
16. Kirkpatrick, J. G., Helman, R. G., Burrows, G. E., Von Tungeln, D., Lehenbauer, T., & Tyrl, R. J. (1999). Evaluation of hepatic changes and weight gains in sheep grazing *Kochia scoparia*. *Veterinary and Human Toxicology*, *41*, 67-70.
17. Lechartier, C., & Peyraud, J. L. (2011). The effects of starch and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed forage proportion. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2440-2454. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3285.
18. Lopez, S., Dijkstra, J., & France, J. (2000). Prediction of energy supply in ruminants, with emphasis on forages. In:

Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. D.I. Given, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omed, eds. CABI Publishing. Oxon, UK. pp. 63-94. https://doi.org/10.1079/9780851993447.0063.
19. Makkar, H. P. S. (2005). *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology*, *123*, 291–302. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.06.003.
20. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (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. https://doi.org/10.1017/S0021859600086305.
21. Menke, K.H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Researsh Development*, *28*, 6-55.
22. Nabati, J., Kafi, M., Nezami, A., Rezvani Moghaddam, P., Masoumi, A., & Zare Mehrjerdi, M. (2011). Investigation of possible production of oil and biomass in biosaline agriculture. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *9*(4), 615-622. (In Persian).
23. Oba, M. (2011). Effects of feeding sugars on productivity of lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, *91*(1), 37-46. https://doi.org/10.4141/CJAS10069.
24. O'Connor, A., McGee, M., Moloney, A., Boland, T., & O'Kiely, P. (2019). Digestion and nitrogen metabolism in beef cattle and *in vitro* rumen fermentation of autumn grass differing in fertilizer nitrogen application rate. *Grass and Forage Science*, *74*(3), 535-547. https://doi.org/10.1111/gfs.12420.
25. Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science. (Cambridge) 92*: 499–503. https://doi.org/10.1017/S0021859600063048.
26. Qureshi, A. S., Qadir, M., Heydari, N., Turral, H., & Javadi, A. (2007). A review of management strategies for salt-prone land and water resources in Iran. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute. 30 p. (IWMI Working Paper 125).
27. Rankins, D. L., Smith, G. S., & Hallford, D. (1991b). Serum constituents and metabolic hormones in sheep and cattle fed *Kochia scoparia* hay. *Journal of Animal Science*, *69*, 2941-2946. https://doi.org/10.2527/1991.6972941x.
28. Rankins, D. L., Smith, G. S., & Hallford, D. (1991a). Altered metabolic hormones impaired nitrogen retention and hepatoxicosis in lambs fed *Kochia scoparia* hay. *Journal of Animal Science*, *69*, 2932-2940. https://doi.org/10.2527/1991.6972932x.
29. Rezvani Moghaddam, P., & Koocheki, A. (2004). History of research on salt-affected lands of Iran, Present status and future prospects: Halophytic ecosystems. 83-95. In: F.K. Taba, S. Ismail and A. Jaradat, eds.
30. Riasi, A., Danesh Mesgaran, M., Stern, M. D., & Ruiz Moreno, M.J. (2012). Effects of two halophytic plants (kochia and atriplex) on digestibility, fermentation and protein synthesis by Ruminal microbes maintained in continuous culture. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *5*, 642–647. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11256.
31. Riasi, A., Danesh Mesgaran, M., Stern, M. D., & Ruiz Moreno, M. J. (2008). Chemical composition, in situ ruminal degradability and post-ruminal disappearance of dry matter and crude protein from the halophytic plants *Kochia scoparia*, *Atriplex dimorphostegia*, *Suaeda arcuata* and *Gamanthus gamacarpus*. *Animal Feed Science and Technology*, *141*, 209-219. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.014.
32. Salehi, M., Kafi, M., & Kiani, A. (2009). Growth analysis of kochia (*Kochia scoparia* L. Schrad) irrigated with saline water in summer cropping. *Pakistan Journal of Botany*, *41*, 1861-1870.
33. SAS Institute. (2009). SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC .
34. Satter, L. D., & Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, *32*, 199–208. https://doi.org/10.1079/bjn19740073.
35. Spanghero, M., Nikulina, A., & Mason, F. (2018). Use of an *in vitro* gas production procedure to evaluate rumen slow-release urea products. *Animal Feed Science and Technology*, *237*: 19-26. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.017.
36. Stern, M. D., & Hoover, H. W. (1990). The dual flow continuous culture system. pp. 17–32 in Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
37. Sun, H. X., & Zhou, D.W. (2010). Effect of dietary supplement of seed of a halophyte (*Suaeda glauca*) on feed and water intake, diet digestibility, animal performance and serum biochemistry in lambs. *Livestock Science*, *128*(1-3): 133-139. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.11.012.
38. Sun, X. Q., Wang, Y. P., Wei, R.Y., Chen, B., & Zhao, X. (2020). Effects of replacing starch with three sugars in a concentrate and forage diet on *in vitro* rumen fermentation, fatty acid composition and related bacteria. *Animal Production Science*, *60*(9), 1173-1182. https://doi.org/10.1071/AN18287.
39. Thilsted, J., & Hibbs, C. (1989). Kochia (*Kochia scoparia*) toxicosis in cattle: Results of four experimental grazing trials. *Veterinary and Human Toxicology*, *31*, 34-41.
40. Tripathi, M. K., Chaturvedi, O. H., Karim, S. A., Singh, V. K., & Sisodiya, S. L. (2007). Effect of different levels

of concentrate allowances on rumenfluid pH, nutrient digestion, nitrogen retention andgrowth performance of weaner lambs. *Small Ruminant Research*, *72*, 178–186. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.10.008.

41. Tukey, J. W. (1953). The problem of multiple comparison. Unpublished notes, Princeton Univ., Princeton, NJ. https://www.jstor.org/stable/1558730.
42. Van Soest, P. J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. 2 ed. Comstock Publ. Assoc., Ithaca, NY .
43. Whitney, H. M., Sayanova, O., Pickett, J. A., & Napier, J. A. (2004). Isolation and expression pattern of two putative acylACP desaturase cDNAs from Bassia scoparia. *Journal of Experimental Botany*, *55*, 787-789. https://doi.org/10.1093/jxb/erh072.
44. YANG, W. (2017). Factors Affecting Rumen Fermentation Using Batch Culture Technique. Fermentation Processes. *InTech*, 77-92.

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 359-377

Aerobic Stability of Corn Silages Inoculated with Novel isolate of Lactic acid bacteria Separated from Various Sources

Nahid Aghamohamadi[1], Fardin Hozhabri[2*], Dariush Alipour[3]

Received: 05-01-2021
Revised: 01-11-2021
Accepted: 21-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Aghamohamadi, N., Hozhabri, F., & Alipour, D. (2022) Aerobic Stability of Corn Silages Inoculated with Novel isolate of Lactic acid bacteria separated from Various Sources. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(3), 359-377.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.68168.1003

Introduction: Corn silage is a major source of forage for ruminants, which provides a higher energy level compared to other forages. But it is susceptible to aerobic deterioration, because yeasts utilize the lactic acid, produced by lactic acid bacteria, as a source of energy. Thus, silages become a favor environment for the growth of mold and bacteria. The susceptibility of a silage to the aerobic deterioration is an important factor since it is directly related to its quality and nutritive value. When silage is exposed to air, increase of temperature and pH may occur, resulting in soluble carbohydrates loss and fermentation of the products of microbial metabolism, reducing its quality. Aerobic stability is an important feature in the evaluation of corn silage quality. Researchers reports that the use of lactic acid bacteria can improve fermentation and aerobic stability of silage. This study aimed to investigate the changes in the chemical compositions and concentration of fermentation end products that occur in corn silages with or without microbial inoculants during aerobic exposure and to select bacterial strains that can improve the aerobic stability after silo opening.

Materials and Methods: This study was conducted to select lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from corn silage, the intestinal contents of broilers, laying hens, Turkey, Ostrich and assess their effects on the quality and aerobic stability of maize silage. The LAB strains were inoculated into aqueous extract obtained from maize to evaluate their production of metabolites, pH reduction and antimicrobial activity. One hundred and twenty-one strains were isolated from various sources in the Laboratory, which all isolates were considered to be LAB as determined by Gram-stain appearance, catalase test and lactic acid productivity. Analysis of the 16S rDNA sequence of representative strains was used to confirm the presence of the predominant groups. The sequences from the various LAB isolates showed high degrees of similarity to those of the GenBank type strains between 99% and 100%. Five LAB strains that showed the best results were assessed in experimental silos. All treatments were ensiled in laboratory-scale silos for 105 days, and then subjected to an aerobic stability test for 8 days. Silage samples were collected at 0, 4 and 8 days after aerobic exposure to determinate the changes in the chemical compositions, products of fermentation, and to evaluate the silages microbial changes to determine the aerobic deterioration. Data in the experimental design, after opening the silos, were analyzed in a completely randomized design with nine replicates by GLM procedure of SAS software. In aerobic conditions, the data were analyzed as repeated measures in time. The data were analyzed in a completely randomized design by GLM procedure of SAS software. Variance analysis and multiple comparisons of data were performed using the GLM procedure of and the means were separated by Tukey's test.

Results and Discussion: The results indicated that after 105 days of conservation, all silages had good fermentation characteristics with low pH (<3.80) and ethanol concentration and high lactic acid contents ($P<0.01$). A linear decrease in pH values and water-soluble carbohydrates contents were observed. Addition of lactic acid bacteria, increased acetic acid, but decreased ethanol contents of inoculated silages compared to the

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
*Corresponding Author Email: hozhabri@razi.ac.ir

control ($P<0.01$). Across treatments, there were significant differences in the yeast populations ($P<0.01$). The population of yeasts which was initially high in the fresh forage (5.57 log cfu g^{-1} forage) before ensiling and a drastic reduction in the numbers of yeasts was observed in all silages throughout the experiment. The addition *Lactobacillus Fermentum* resulted in a higher concentration of acetic acid and reduced populations of yeasts in silage compared to the other silage treatments, and a lower ethanol concentration in the silage ($P<0.01$). The strains tested were able to modify the fermentative and chemical parameters and the populations of yeasts of silage after aerobic exposure. Aerobic stability of corn silages was associated with high acetic acid and reduction the populations of yeasts. all Lactobacillus strains promoted an increase in aerobic stability of silage. Addition of lactic acid bacteria, further improved silage aerobic stability with more acetic acid production and reduction the populations of yeasts ($P<0.01$). After 8 days of aerobic exposure, inoculated silage with *Lactobacillus Fermentum* remained stable, but the control silage deteriorated as indicated by a reduction in lactic acid and an increase in pH, and numbers of yeast ($P<0.01$). These results proved the advantage of microbial inoculation. The best Lactobacillus strains is *Lactobacillus Fermentum* because it provides more stable pH, production higher acetic acid, higher reduction of yeasts and filamentous fungi in maize silage, thereby decreasing the aerobic deterioration by these microorganisms.

Conclusion: The results showed that application of inoculants is recommended because it promoted higher production of acetic acid, reducing the populations of yeast and filamentous fungi, a more stable pH and, therefore, improving the aerobic stability of silages. The best inoculation is *Lactobacillus Fermentum* because it provides higher reduction of yeast and filamentous fungi in maize silage, thereby decreasing the aerobic deterioration by these microorganisms. The *Lactobacillus Fermentum* strain show the best results in relation to silage aerobic stability.

Keywords: Aerobic deterioration, Fermentation products, Aerobic stability, Filamentous fungi, Yeasts

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با جدایه‌های جدید باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف

ناهید آقامحمدی[1]، فردین هژبری[2*]، داریوش علیپور[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰

آقامحمدی، ن.، هژبری، ف.، و علیپور، د. (۱۴۰۱) . پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با جدایه‌های جدید باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۷۷-۳۵۹.

چکیده

پایداری هوازی از ویژگی‌های مهم در ارزیابی کیفیت سیلاژ ذرت است. هدف از مطالعه حاضر، انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف با قابلیت بهبود ویژگی‌های تخمیری و ارزیابی اثر تلقیح این جدایه‌ها بر پایداری هوازی سیلاژ ذرت و جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ طی قرار گرفتن در معرض هوا بود. جدایه‌های باکتری اسیدلاکتیک جدا شده از منابع مختلف، برای ارزیابی تولید متابولیت‌ها، کاهش pH و فعالیت ضدمیکروبی در عصاره آبی به‌دست آمده از علوفه ذرت تلقیح شدند. ۱۲۱ جدایه از منابع مختلف در آزمایشگاه جدا شد، تجزیه و تحلیل توالی 16S ریبوزومی DNA، جدایه‌های نماینده برای تأیید حضور گروه‌های غالب استفاده شد. توالی جدایه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید، درجه شباهت بالایی به جدایه‌های نوع بانک ژن با شباهت ۹۹ و ۱۰۰ درصد نشان دادند. پنج جدایه باکتری‌های اسیدلاکتیک که بهترین نتایج را نشان دادند، به علوفه ذرت تلقیح و ۱۰۵ روز در سیلوهای آزمایشی سیلو شدند، سپس، طی هشت روز تحت آزمایش پایداری هوازی قرار گرفتند. نمونه‌های سیلاژ در صفر، چهار و هشت روز پس از قرار گرفتن در معرض هوا برای تعیین تغییرات در ترکیبات شیمیایی، فرآورده‌های تخمیر و ارزیابی تغییرات میکروبی برای تعیین فساد هوازی جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد، که همه سیلاژها دارای تخمیر خوب با مقدار pH پایین (کمتر از ۳/۸۰) و غلظت کم اتانول هستند. پایداری هوازی سیلاژ ذرت با بالا بودن اسید استیک و کاهش جمعیت مخمرها همراه بود. تمام جدایه‌ها باعث افزایش پایداری هوازی سیلاژ ذرت شدند. این نتایج مزیت تلقیح میکروبی را اثبات کرد. بهترین جدایه‌ی آزمایشی، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بود، زیرا باعث pH پایدارتر و تولید بیشتر اسید استیک، کاهش بالاتری از جمعیت مخمرها در سیلاژ ذرت تلقیح شده با این جدایه‌ی باکتری شد و بدین ترتیب فساد هوازی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پایداری هوازی، فساد هوازی، قارچ‌های رشته‌ای، محصولات تخمیر، مخمرها.

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: hozhabri@razi.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2021.68168.1003

مقدمه

سیلوکردن یک روش ذخیره‌سازی مرسوم و بهترین روش برای نگهداری محصولات علوفه‌ای است (Fabiszewska *et al*., 2019). در سیلاژ، کمبود اکسیژن و تجمع اسید لاکتیک، منجر به pH پایین شده، متابولیسم میکروبی را مهار کرده و مواد مغذی را حفظ می‌کند (Santos *et al*., 2013). با این حال، حساسیت سیلاژ به فساد هوازی عامل مهمی است، زیرا ارتباط مستقیمی با کیفیت و ارزش غذایی آن دارد (Avila *et al*., 2012).

سیلاژ ذرت منبع اصلی علوفه برای نشخوارکنندگان است که سطح انرژی بالاتری را در مقایسه با سایر علوفه‌ها فراهم می‌کند (Lee *et al*., 2019). سیلاژ ذرت، به‌خصوص در هوای گرم، به فساد هوازی حساس است، زیرا مخمرها از اسید لاکتیک تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک[1] به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (Basso *et al*., 2012). از طرفی، غلظت بالای کربوهیدرات‌های محلول در آب علوفه ذرت، باعث رشد بیش از حد قارچهای سمی در مقایسه با سایر علوفه‌ها می‌شود (Lee *et al*., 2019). بنابراین، سیلاژ به محیط مناسبی برای رشد کپک‌ها و باکتری‌ها تبدیل می‌شوند، در نتیجه سیلاژی با کیفیت پایین تولید می‌کنند (Basso *et al*., 2012). پایداری هوازی، عامل مهمی برای اطمینان از کیفیت سیلاژ ذرت و تأمین یک ماده مغذی خوب با مقدار کمی اسپورهای کپک قارچی و ترکیبات سمی است. پس از باز کردن سیلو، مخمرها و کپک‌های قارچی که پایداری هوازی را کاهش می‌دهند با تجزیه مواد مغذی و اسیدهای آلی سیلاژ رشد می‌کنند. پایداری هوازی پایین باعث کاهش استفاده و ارزش غذایی سیلاژ ذرت می‌شود (Lee *et al*., 2019). بنابراین، بهبود پایداری هوازی سیلاژ می‌تواند سود قابل توجهی برای تولیدکنندگان داشته باشد (Lee *et al*., 2019; Ranjit and Kung, 2000)

از روش‌های زیادی برای بهبود پایداری هوازی سیلاژ استفاده شده است. محققین گزارش کرده‌اند، که استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌تواند تخمیر و پایداری هوازی سیلاژ را افزایش دهد (Ranjit and Kung, 2000; Lee *et al*., 2019). بنابراین، استفاده از افزودنی‌های میکروبی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک، که علاوه‌بر تولید اسید لاکتیک قادر به تولید اسیدهای استیک یا پروپیونیک هستند، در مهار رشد و فعالیت قارچهای رشته‌ای و مخمرها مؤثرتر هستند و ممکن است ثبات هوازی سیلاژ را افزایش دهند (Avila *et al*., 2012). اطلاعات مربوط به رشد میکروبی مانند باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمرها و کپک‌ها در هنگام مواجهه هوازی سیلاژ محدود است. در حقیقت، این اطلاعات می‌تواند سهم این میکروب‌ها را در تخمین ماندگاری سیلاژ پس از باز شدن سیلو تسهیل کند. بنابراین، این مطالعه به‌منظور برآورد پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شد و همچنین تغییرات در ترکیب شیمیایی و میکروبی در هنگام مواجهه هوازی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه‌های گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی همدان در سه مرحله انجام شد:

۱) کشت و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

کشت و جداسازی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک از منابع مختلف (سیلاژ ذرت، محتویات روده مرغ‌های تخم‌گذار، گوشتی، بوقلمون و شترمرغ) به روش‌های زیر انجام شد:

کشت و جداسازی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک طبق روش ارائه شده توسط آویلا و همکاران (Avila *et* Avila *et al*., 2009; *al*., 2014) انجام شد. باکتری‌های مولد اسید لاکتیک به‌روش انکوباسیون بی‌هوازی با استفاده از محیط کشت آگار ام آر اس[2] حاوی سیستئین هیدروکلراید (۰/۱ درصد) و سیکلوهگزامید (۰/۴ درصد) کشت شدند. کلنی باکتری‌های رشدیافته روی پتری‌دیش‌های دارای حداقل ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی[3] شمارش شدند، و از پتری‌های حاوی کلنی‌های منفرد و با کیفیت خوب، به‌طور تصادفی یک کلنی انتخاب، علامت‌گذاری و برای شناسایی جداسازی شدند، و مجدداً درون محیط کشت مایع ام آر اس[4]، در شرایط تاریک و بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت در یک جار بی‌هوازی انکوبه شدند. جدایه‌های انتخاب و جدا شده، مجدداً برای خالص‌سازی بیشتر توسط آگار ام آر اس، روی پتری‌های محتوی محیط کشت جامد، کشت شدند. این کار برای خالص‌سازی بیشتر چندین بار تکرارشد. سپس، جدایه‌های خالص‌شده، انتخاب و یک کلنی به لوله‌های هانگیت محتوی پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع ام آر اس منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در آون ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن، جدایه‌های خالص شده و رشد یافته درون محیط کشت مایع با محلول گلیسرول ۲۰ درصد (v/v) حفظ و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های بعدی ذخیره شدند.

مطابق با روش‌های ذکرشده برای کشت باکتری‌ها، جدایه‌ی

1- Lactic Acid Bacteria (LAB)

2-- De Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar)
3- Colony forming units (CFU)
4- De Man Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth)

باکتری‌ها با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های آزمایشگاهی (Avila et Avila et al., 2009; Pang et al., 2011; al., 2014)، به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک فرضی، از منابع مختلف ذکر شده، جدا شدند. سپس، برای بررسی رشد، کاهش در مقدار pH و تولید متابولیت‌ها، جدایه باکتری‌های جداشده (جدایه‌های باکتری) در عصاره آبی تهیه شده از گیاه ذرت علوفه‌ای تلقیح شدند و توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ، ارزیابی شد (Saarisalo et al., 2007; Santos et al., 2013). پس از کشت مجدد هر جدایه‌ی باکتری، رشد از طریق اندازه‌گیری کدورت با دستگاه اسپکتروفوتومتر[1] در طول موج ۶۰۰ نانومتر ارزیابی شد. از pHمتر دیجیتال[2] برای اندازه‌گیری pH استفاده شد و از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[3] برای تجزیه و تحلیل تولید متابولیت‌های اسیدلاکتیک، اسیدهای استیک و پروپیونیک، همچنین الکل‌های اتانول و پروپان‌دی‌اُل استفاده شد (Santos et al., 2013; Avila et al., 2014). جدایه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک، که بهترین رشد و کارایی را در کاهش pH از خود نشان دادند، برای بررسی توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمایش‌های مهار، با استفاده از روش انتشار آگار مطابق روش توصیف شده توسط سانتوس و همکاران (Santos et al., 2013)، انجام شد. ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده، در مرکز محیط کشت، مجدداً کشت و فعال شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، به‌استثنای جدایه‌ی *کلوستریدیم‌پرفرینجنس* که تحت شرایط بی‌هوازی در یک جار بی‌هوازی به‌مدت هفت روز انکوبه شد. گونه‌های مخمر و قارچ‌ها به‌ترتیب در محیط عصاره مخمر-پپتون-گلوکز[4]، محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار[5] و همچنین، جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک انتخاب شده در محیط کشت ام آر اس به‌مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مجدداً کشت و انکوبه شدند. پس از آن، سوسپانسیون استانداردی از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده تحت آزمایش آماده شد، و با استاندارد شماره ۰/۵ مقیاس مک‌فارلند (تقریباً $1/5\times10^8$ کلنی به‌ازای هر میلی‌لیتر) مقایسه شد، در حالی‌که، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک به‌وسیله مقایسه با استاندارد شماره ۱ مقیاس مک‌فارلند (تقریباً 3×10^8 کلنی به‌ازای هر میلی‌لیتر) استاندارد شد (Santos et al., 2013).

پیش انتخاب جدایه‌های باکتریایی براساس ارزیابی رشد، کاهش در مقدار pH و تولید متابولیت‌ها، همچنین، توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ انجام شد (Saarisalo et al., 2007; Santos et al., 2013). از آن جا که، اسید لاکتیک در درجه اول مسئول کاهش مقادیر pH در سیلاژ است، بهترین جدایه‌های تولیدکننده اسید لاکتیک که نقش مؤثری در کاهش pH و همچنین سرعت رشد بالایی داشتند، و از طرفی، در آزمایش مهار ریزجانداران نامطلوب، مؤثر بودند، انتخاب و برای مطالعات مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد، با استفاده از روش‌های مولکولی، مراحل استخراج DNA باکتری‌ها و تکثیر DNA استخراج شده، توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[6] انجام شد. جدایه‌های باکتری (جدایه‌های باکتری) جداسازی و انتخاب شده، برای ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی با تعیین‌توالی DNA شناسایی شدند. استخراج DNA باکتری‌های جداشده و خالص‌سازی آن‌ها و همچنین، تکثیر DNA استخراج شده، طبق روش‌های توصیف شده توسط سانتوس و همکاران (Santos et al., 2013) و سیلوا و همکاران (Silva et al., 2018) انجام شد. DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت تجاری[7] استخراج شد. غلظت DNAهای استخراج شده با استفاده از طیف‌سنجی نانودراپ[8] مورد بررسی قرار گرفت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندروف (اپندورف، هامبورگ، آلمان) استفاده شد. منطقه کدکننده توالی ژن 16SrDNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در یک سیکلر حرارتی PCR تکثیر شد. از آغازگرهای عمومی برای شناسایی جدایه‌ی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی RNA بودند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مستقیماً با کیت PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی DNA، P027F (50- GAGTTTGATCCTGGCTCA-30) و 1492R (50- ACCTTGTTACGACTT-30) تعیین شد (Silva et al., 2018). محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌دست آمده برای تصفیه و تعیین‌توالی به شرکت ماکروژن[9] ارسال و توسط این شرکت تعیین‌توالی شدند. توالی نوکلئوتید هر جدایه توسط نرم‌افزار بیوادیت[10] ویرایش ۷/۲ مشاهده و بخش مورد نظر آن انتخاب شد. سپس، توالی انتخاب شده به‌وسیله ابزار بلاست[11] وارد و با توالی‌های موجود در

1- VARIAN, Cary100 UV-Vis spectrophotometer, Australia
2- JENWAY, 350 pH meter manual, UK.
3- High-Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu model LC-10Ai)
4- Yeast Extract Peptone Glucose (YEPG) Medium
5- Potato Dextrose Agar (PDA)

6- Polymerase Chain Reaction (PCR)
7- Wizard_ Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, WI, USA
8- Thermo Scientific 2000, Waltham, MA, USA
9- Macrogen (Seoul, South Korea)
10- BioEdite
11- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

پایگاه داده‌های بانک ژن، موجود در وب سایت مرکز ملـی اطلاعـات بیوتکنولوژی[1] مقایسه شدند. پس از تجزیه توالی‌هـا توسـط بلاسـت، ریزجانداران ثبت شده‌ای که بیشترین قرابت ژنتیکی را با جدایـه‌هـای خالص شده آزمایش داشتند، شناسایی شدند. سپس، توالی‌ها بـا روش اتصالات مجاور توسط نرم‌افزار مگا[2] ویرایش شش بررسی شد.

۲) تلقیح جدایه‌های انتخاب شده به علوفه ذرت برای تهیـه سیلاژ در سیلوهای آزمایشگاهی

در این مرحله با توجه به نتایج تعیین توالی جدایه‌های توالی‌یـابی شده و نتایج حاصل از آزمایش‌های قبل از قبیل؛ نرخ رشد سریع‌تـر در طی تخمیر، کاهش مؤثر pH و تولید غلظت‌های مناسب متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی، پنج جدایه که بهترین نتایج را نشان دادند بـرای تلقیح به ذرت علوفه‌ای برای سیلوکردن انتخـاب شـدند. بـرای ایـن آزمایش شش تیمار در نظر گرفته شد: شاهد (سیلاژ کنترل بدون هیچ افزودنی میکروبی)، و پنج تیمار محتوی باکتری‌های جداسازی شـده و انتخـاب شـده بـه‌صـورت مجـزا (*لاکتوباسـیلوس‌پـانیس، لاکتوباسـیلوس‌سـالیواریوس، پـدیوکوکوس‌اسـیدی‌لاکتیسـی، لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم و انتروکوکوس‌فاسیوم*). بـرای هـر تیمـار، نُـه تکرار در نظر گرفته شد (شش تیمار و ۵۴ مینی‌سیلو). علوفه تازه ذرت با طول برش ۱/۵ سانتی‌متر خرد شده با جدایه باکتری‌هـای انتخـابی مخلوط شد و در سیلوهای آزمایشـی پلـی‌وینیـل‌کلریـد بـا قطـر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر، مجهز به درهـای محکـم کـه فقـط امکان انتشار گاز را فراهم می‌کند، ذخیره شد. هر مینی‌سیلو بـا حـدود ۳۰۰۰ گرم (وزن مرطوب) علوفه خرد شده پر و به چگالی تقریباً ۶۰۰ کیلوگرم در مترمکعب فشرده شد. جدایه‌های باکتری تولیدکننده اسـید لاکتیک مطابق با استانداردهای کدورت مقیاس مک‌فارلند آماده‌سازی شدند، و تلقیح با جمعیت $۱۰^{۶}$ کلنی به‌ازای هر گرم علوفه تـازه انجـام شد. تلقیح باکتری‌ها براساس روش‌های پیشنهاد شده توسـط آویـلا و همکاران (Avila *et al*., 2014) و سانتوس و همکاران (Santos *et al*., 2013) انجام شد. شاهد (کنترل) بدون هیچ‌گونه تلقیح باکتریایی، فقـط آب مقطـر بـه علوفـه اضـافه و ذخیـره شـد. در همـه تیمارهـا باکتری‌های تلقیح شده با غلظت ۱×۱۰^{۶} cfu/g FM برای اطمینان از تسلط بر تخمیر استفاده شد. مقدار ذرت خردشده بـرای هـر تیمـار بـا تکرارهای آن مشخص شده، توزین، سپس با محلول محتوی بـاکتری تلقیحی مخلوط شد. باکتری‌ها با استفاده از سـم‌پـاش گیـاهی (بـرای جلوگیری از آلودگی از یک سم‌پاش جداگانـه بـرای هـر تیمـار)، روی علوفه ذرت اسپری، با دست مخلوط و سپس مینی‌سـیلوها پـر شـدند. سیلوها قبل و بعد از پر شدن توزین شدند تـا مقـدار واقعـی علوفـه‌ی سیلو شده مشخص شـود. پـس از هـواگیری و فشـرده‌سـازی کامـل، سیلوها در دمای اتاق (به‌طور متوسط ۲۳ درجه سانتی‌گراد) نگهـداری شـده و از نـور خورشـید و بـاران محافظـت شـدند. پـس از ۱۰۵ روز سیلوکردن، هر سیلاژ ابتدا توزین و سپس باز شدند (Santos *et al*., 2013).

۳) اندازه‌گیری پایداری هوازی سیلاژها

جهت ارزیابی پایـداری هـوازی هـر سـیلاژ طبـق روش آویـلا و همکـاران (Avila *et al*., 2014) و کاروالهو و همکـاران (Carvalho *et al*., 2014) اقدام شد. به‌طور خلاصه، پس از ۱۰۵ روز سیلوکردن، مینی‌سیلوها باز شدند و نمونه‌های تقریباً دو کیلوگرمی از هر مینی‌سیلو برداشته در سطل‌های پلاسـتیکی پـنج کیلـوگرمی قـرار گرفتنـد و در اتاقی با دمای کنترل‌شـده ۲۳ درجـه سـانتی‌گـراد (۱/۵ ±) نگهـداری شدند. ظروف سـیلاژ بـا دو لایـه پارچـه پنبـه‌ای پوشـانده شـد تـا از خشک‌شدن، آلودگی گرد و غبار جلوگیری کند. برای ارزیابی پایـداری هوازی آن‌ها یک دماسنج به‌مـدت هشـت روز درون تـوده سـیلاژ، در عمق ۱۰ سانتی‌متر قرار داده شد. دماسنجی که برای اندازه‌گیری دما هر دو ساعت برنامه‌ریزی شده بود، در مرکز هـر سـطل قـرار گرفـت. دمای هر سیلاژ هر ۱۲۰ دقیقه ثبت شد. دمای محـیط بـا اسـتفاده از دماسنج واقع در نزدیکی سطل‌ها اندازه‌گیـری شـد. پایـداری هـوازی به‌عنوان مجموع ساعاتی که دمای سیلاژ قبل از افـزایش بـیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط ثابت ماند، تعریف شده است.

نمونه‌برداری‌ها از علوفـه تـازه قبـل از سـیلوکردن و همچنـین از علوفه سیلوشده پس از ۱۰۵ روز تخمیـر در سـیلو، پـس از بـاز شـدن مینی‌سیلوها، روزهای صفر (روز باز شدن سیلوها)، چهار و هشت، پس از قـرار گـرفتن در معـرض هـوا بـرای تجزیـه و تحلیـل شـیمیایی، محصـولات نهـایی تخمیـر و میکروبـی، انجـام شـد. یـک بخـش از نمونه‌ها، وزن و به‌مـدت ۷۲ سـاعت در آون دارای فـن در دمـای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. بخش دیگری از نمونه‌ها، در نایلون‌هـای برچسب‌دار برای تجزیه‌های بعدی در فریـزر ۲۰- درجـه سـانتی‌گـراد ذخیره شد. بخش سوم نمونه‌ها، برای تهیه عصاره آبی به‌منظور تعیین مقدار pH، ارزیـابی جمعیـت میکروبـی و محصـولات نهـایی تخمیـر استفاده شد. برای انـدازه‌گیـری ترکیبـات شـیمیایی در علوفـه تـازه و نمونه‌هـای سـیلاژ از روش‌هـای اسـتاندارد اسـتفاده شـد (AOAC, 1990).

یک نمونه ۲۵ گرمی از علوفه تازه قبل سیلوکردن و همچنـین، از هر سیلاژ بعد بازکردن مینی‌سیلوها، طـی روزهـای قـرار گـرفتن در معرض هوا، جمع‌آوری و با ۲۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر اسـتریل محتـوی پپتون ۰/۱ درصد مخلوط شد و در یک مخلوط‌کن به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰ دور در دقیقه همگن شد، سپس از طریق کاغذ فیلتر واتمن

1- NCBI: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)
2- MEGA

شماره چهار صاف شد (Santos *et al*., 2016). از عصاره آبی تهیه شده برای تعیین pH، کربوهیدرات‌های محلول در آب و محصولات تخمیری استفاده شد. pH هر نمونه با دستگاه pHمتر مشخص شد. کربوهیدرات‌های محلول در آب با استفاده از روش اسید سولفوریک- آنترون طبق روش دریاز (Deraize, 1961) تعیین شد. بخشی از عصاره‌های آبی (دو میلی‌لیتر) با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) اسیدی شدند و قبل از تجزیه و تحلیل برای اندازه‌گیری محصولات نهایی تخمیر منجمد شدند (Santos *et al*., 2013). عصاره‌های آبی اسیدی شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای تعیین غلظت اسیدهای لاکتیک، استیک و اتانول مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل میکروبی در ذرت علوفه‌ای تازه قبل از سیلوکردن و در سیلاژ در زمان باز شدن مینی‌سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا انجام شد. از عصاره آبی تهیه شده در چندین رقت تهیه شده (10^{-1} تا 10^{-8}) برای تعیین جمعیت باکتری‌های لاکتیک‌اسید، مخمرها و قارچ‌ها استفاده شد. برای بررسی و شمارش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در علوفه تازه و هر سیلاژ پتری‌های محتوی محیط کشت آگار ام آر اس طبق روش آویلا و همکاران (Avila *et al*., 2014) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. جمعیت مخمرهای موجود در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ در محیط عصاره مخمر- پپتون- آگار طبق روش آویلا و همکاران (Avila *et al*., 2009) و جمعیت قارچ‌های رشته‌ای موجود در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ در محیط سیب زمینی-دکستروز- آگار حاوی ۱/۵ درصد محلول اسید تارتاریک (۱۰ درصد وزنی/حجمی) جهت اسیدی شدن طبق روش سیلوا و همکاران (Silva *et al*., 2018) انجام شد. پتری‌دیش‌های محتوی محیط‌های کشت مخمرها و قارچ‌ها به‌مدت سه تا پنج روز به‌صورت هوازی در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌های قابل مشاهده در محیط آگار در رقت‌های مناسب (حداقل ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ واحد تشکیل-دهنده کلنی) شمارش شده و تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم سیلاژ بیان شد و به‌صورت لگاریتم کلنی شمارش شده در هر گرم علوفه تازه یا سیلاژ[1] نشان داده شدند.

این پژوهش در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با شش تیمار و نه تکرار انجام شد. پس از باز شدن سیلوها داده‌ها بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. معادله ۱ مدل آماری طرح را نشان می‌دهد:

$$Yij = \mu + Ti + eij \quad \text{(۱) معادله}$$

که در این مدل، Yij: مقدار هر مشاهده، μ: میانگین صفت مورد مطالعه، Ti: اثر تیمار و eij: اثر خطای آزمایشی بود.

1- Log cfu/g FM

در شرایط هوازی پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا، داده‌ها به‌عنوان اندازه‌گیری‌های تکرار شونده در زمان، بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. معادله ۲ مدل آماری طرح را نشان می‌دهد:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + Ea_{i.k} + B_j + AB_{ij} + Eb_{ijk} \quad \text{(۲) معادله}$$

در این مدل، Y_{ij}: مشاهده مربوط به تیمار i و زمان اندازه‌گیری j در تکرار k؛ μ: میانگین کلی مشاهدات، A_i: اثر تیمار i؛ $Ea_{i.k}$: اثر اشتباه اصلی؛ B_j: اثر زمان اندازه‌گیری j؛ AB_{ij}: برهم‌کنش تیمار i و زمان اندازه‌گیری j و Eb_{ijk}: اشتباه فرعی هستند. تجزیه اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۴ (SAS, 2013)، با رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و سطح معنی-داری ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ انجام شد. تمام شمارش‌های میکروبی بر پایه لگاریتمی ($\log_{10}$ cfu) تبدیل شد.

نتایج و بحث

انتخاب و شناسایی جدایه‌های باکتری لاکتیک‌اسید

از تعداد ۱۲۱ جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک، ۱۰۰ جدایه نتایج قابل قبولی نشان دادند و رشد آن‌ها (اندازه‌گیری در واحد جذب) و کاهش مقادیر pH در عصاره ذرت به‌ترتیب از ۰/۹۵ تا ۲/۴۵ و از ۱/۰۵ تا ۲/۸۹ متفاوت بود. باکتری‌های جدا شده از محتویات روده بوقلمون در فرآیند انتخاب حذف شدند، زیرا رشد آن‌ها در عصاره ذرت از شدت کمتری برخوردار بود یا برخی رشد نکردند. در میان ۱۰۰ جدایه باقی‌مانده، جدایه‌هایی که نتایج بهتری نشان دادند، به‌ترتیب تولید اسیدهای لاکتیک و استیک را از ۰/۸۸ تا ۷/۹۶ و از ۰/۸۵ تا ۵/۷۵ گرم در لیتر نشان دادند. تمام جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مقادیر کمی اسید پروپیونیک تولید کردند که از ۰/۰۵ تا ۰/۱۸ گرم در لیتر متغیر بود. با این حال، جدایه ۱۶ (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) به‌دلیل تولید بیشتر این اسید (۰/۲۵ گرم در لیتر) و اسید استیک (۶/۵۱ گرم در لیتر) برجسته شد. همه جدایه‌ها تولید اتانول کم (از ۰/۰۲ تا ۰/۰۸ گرم در لیتر) داشتند، به‌استثنای پنج جدایه که تولید اتانول تقریباً ۰/۵۱ گرم در لیتر را نشان داد.

از مجموع کل جدایه‌هایی که بهترین رشد را نشان دادند و مؤثر در کاهش pH بودند، تعداد ۳۵ جدایه اثر مهاری بر رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده داشتند و منجر به تشکیل یک هاله مهاری با اندازه‌های بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر شدند. دیگر جدایه‌ها هاله مهاری تشکیل ندادند یا بسیار کوچک بود. جدایه‌هایی که فعالیت ضدمیکروبی بهتری علیه مخمرها و قارچ‌ها نشان دادند، برای فرآیند سیلوکردن انتخاب شدند، زیرا رشد خوبی در عصاره آبی ذرت داشتند، همچنین تولید متابولیت بیشتر (اسیدهای چرب فرار و اسیدلاکتیک) و غلظت اتانول کمتری داشتند.

در این مطالعه، علاوه‌بر بررسی سرعت رشد و کاهش pH محیط، ارزیابی متابولیت‌های تشکیل‌شده و فعالیت ضدمیکروبی به‌عنوان عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌ها برای فرایند سیلوکردن استفاده شدند. بنابراین، انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک برای تلقیح به علوفه ذرت در فرآیند سیلوکردن عمدتاً بر اساس میزان رشد و تولید متابولیت‌ها برای بهبود تخمیر و فعالیت ضدمیکروبی برای افزایش پایداری هوازی بود. غلظت متابولیت‌های تولید شده توسط جدایه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک در محیط کشت ذرت بسیار متغیر بود. اختلافات موجود در تولید متابولیت‌ها بین جدایه‌های باکتری به‌دلیل متابولیسم باکتری‌ها بود. جدایه‌هایی که تولید بالایی از اسید لاکتیک را نشان دادند، به‌عنوان باکتری‌های با تخمیر ناهمگن اختیاری شناخته شدند، در حالی که جدایه‌هایی که اسیدهای استیک تولید می‌کردند، باکتری‌های با تخمیر ناهمگن اجباری در نظر گرفته شدند (Santos *et al.*, 2013). برای بیشتر جدایه‌های آزمایشی مشاهده ارتباط بین رشد، از طریق قرائت جذب، و کاهش pH محیط امکان‌پذیر بود. همبستگی بین این دو فاکتور با تولید اسیدها توسط باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک توضیح داده می‌شود (Santos *et al.*, 2013). فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک در درجه اول مربوط به تولید اسیدهای آلی است. اثرات ضدمیکروبی می‌تواند به کاهش pH در محیط کشت، کاهش pH داخل سلولی به‌دلیل عبور اسیدها از غشای سلولی، تغییر در نفوذپذیری سلول از طریق تداخل پروتئین‌های غشایی مربوط به انتقال فعال مواد مغذی یا سمیت سلول به‌دلیل تجمع ترکیبات قلیایی در داخل سلول مربوط باشد (Santos *et al.*, 2013). همچنین، فعالیت ضدمیکروبی می‌تواند مربوط به تولید باکتریوسین‌ها باشد (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018). گرچه در مطالعه سانتوس و همکاران (Santos *et al.*, 2013)، ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به‌عنوان عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌ها برای فرآیند سیلوکردن کارآمد نبود و انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک برای سیلاژ ذرت را بر اساس دو فاکتور سرعت رشد جدایه‌ها از طریق قرائت جذب، و کاهش pH در محیط کشت انجام دادند. بنابراین، اثرات تلقیح میکروبی بر تخمیر سیلاژ عمدتاً به‌دلیل توانایی تسلط سریع بر تخمیر و تولید متابولیت‌ها، علاوه‌بر تغییرات در pH است (Santos *et al.*, 2013). علاوه‌براین، سازگاری بین علوفه و باکتری‌های اسید لاکتیک انتخاب شده، یک فاکتور تعیین‌کننده برای دستیابی به‌هدف کاربرد افزودنی میکروبی است. بنابراین، می‌توان از این ویژگی‌ها به‌عنوان معیار انتخاب مواد تلقیحی جدید استفاده کرد (Saarisalo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013; Avila *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). در انتخاب جدایه‌های تلقیحی، در نظر گرفتن بقای جدایه انتخاب شده تا پایان تخمیر بسیار مهم است، که همچنین، می‌تواند باعث بهبود پایداری هوازی سیلاژ شود (Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

در این مطالعه، جدایه‌های انتخاب شده، غلظت‌های بالایی از اسیدهای استیک و پروپیونیک تولید کردند. طبق نظر محققین، اسیدهای پروپیونیک و استیک یک اثر هم‌افزایی نشان می‌دهند، که قادرند رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای را کاهش داده و ثبات هوازی سیلاژ را افزایش دهند (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). بر مبنای گزارش محققین، اسیدهای با بالاترین pK در مهار و یا کاهش رشد و فعالیت ریزجانداران نامطلوب مؤثرتر هستند. وقتی pH سیلاژ زیر ۴/۷۳ باشد، اسیدهای استیک و پروپیونیک، در pH کمتر از pKa (۴/۷۳)، در درجه اول خود را به شکل تفکیک نشده نگه می‌دارند، در این فرم، غشاهای مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای به این اسیدها نفوذپذیر می‌شوند. به‌طور خلاصه می‌توان بیان کرد که به‌دلیل خصوصیت چربی‌دوستی اسیدهای استیک و پروپیونیک است که دریافت اسید از طریق غشا ریزجانداران (غشای نفوذپذیر به اسیدها) به‌روش انتقال غیرفعال صورت می‌گیرد. در داخل سلول، که pH برابر ۷/۰ (بالاتر از pKa اسید) است، اسید تجزیه شده، که آزادکننده پروتون‌هاست. آزادسازی یون‌های H^+، که از بین بردن آن‌ها به‌معنی انرژی صرف شده توسط ریزجانداران است، یک فرآیند انتقال فعال می‌باشد که باعث کاهش pH داخل سلولی می‌شود و در نتیجه، سرعت رشد را کاهش داده و امکان مرگ سلول فراهم می‌شود (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). نتایج حاصل از آزمایش حاضر این گفته‌ها را تأیید می‌کند و جدایه‌هایی که غلظت‌های بالایی از اسیدهای استیک و پروپیونیک را تولید کردند، فعالیت ضدمیکروبی بهتری را نشان دادند.

بر اساس نتایج به‌دست آمده طی آزمایش‌های مختلف در ارزیابی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک در این پژوهش، جدایه‌هایی که نتایج بهتری از نظر تولید متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند، جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند (نتایج ارائه نشده است). مطابق با نتایج تعیین‌توالی منطقه 16S rRNA، و همچنین، نتایج حاصل از آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری فراسنجه‌های رشد، کاهش pH، تولید متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی میان جدایه‌های توالی‌یابی شده، پنج جدایه به‌منظور ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی انتخاب شدند. شباهت توالی 16S rRNA در مقایسه با کد دسترسی موجود در بانک ژن برای این جدایه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج تعیین توالی منطقه 16S rRNA، جدایه‌های انتخاب شده نشان داد که همه آن‌ها حداقل ۹۹ درصد شباهت را با توالی ریزجانداران موجود در بانک ژن نشان دادند. اگر شباهت ژنتیکی بین میکروارگانیسم مورد نظر و میکروارگانیسم بانک ژن، ۹۹ درصد باشد می‌توان با اطمینان گفت که همان باکتری یا همان گونه است (Pang *et al.*, 2011).

جدول ۱– جدایه‌ها، منبع جداسازی و تشخیص مولکولی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده از منابع مختلف

Table1- Isolates, source isolation, and molecular identification lactic acid bacteria strains isolated from various

جدایه‌ها Isolate	منبع جداسازی Isolation Source	هم ترازی درBLAST BLAST alignment	کد در NCBI NCBI[1]accession No.	درصد شباهت Similarity (%)
جدایه ۲ Strain 2	سیلاژ ذرت Corn Silage	*لاکتوباسیلوس پانیس* *Lactobacillus Panis* (LP)	LC145560.1	99
جدایه ۷ Strain7	محتویات روده مرغ‌های گوشتی Intestinal contents of Broilers	*لاکتوباسیلوس سالیواریوس* *Lactobacillus salivarius (LS)*	LT852760.1	100
جدایه ۱۱ Strain 11	سیلاژ ذرت Corn Silage	*پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* *Pedicoccus acidilatici (PA)*	KY549392.1	99
جدایه ۱۶ Strain 16	محتویات روده مرغ‌های تخم گذار Intestinal contents of laying hens	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* *Lactobacillus fermentum (LF)*	GQ231445.1	100
جدایه ۱۹ Strain 19	محتویات روده شترمرغ Intestinal contents of Ostrich	*انتروکوکوس فاسیوم* *Enterococcus faecium (EF)*	KY682304.1	100

[۱] وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی

[1]National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

خصوصیات علوفه ذرت قبل از سیلو شدن

ترکیبات شیمیایی و جمعیت میکروبی علوفه ذرت قبل از سیلوکردن در جدول ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه، علوفه ذرت از ویژگی‌های مناسبی برای تولید سیلاژی باکیفیت بالا برخوردار بود. موفقیت در تولید سیلاژی با کیفیت بالا به دو عامل اصلی بستگی دارد؛ اولاً، ترکیب شیمیایی، که ظرفیت بافری و ضریب تخمیر علوفه را تعیین می‌کند و ثانیاً، ماهیت مواد سیلوشده، که جمعیت میکروبی را تعیین می‌کند (Jatkauskas *et al*., 2018). گزارش شده است که سیلاژهای کاملاً تخمیر شده می‌تواند از علوفه‌ای تولید شود که دارای خصوصیاتی مانند؛ مقدار ماده خشک کافی (۲۵۰–۴۰۰ g/kg FM)، غلظت بالای کربوهیدرات محلول در آب (۶۰–۱۲۰ g/kg DM)، ظرفیت بافری کم (۲۰۰–۲۵۰ mE/kg)، و باکتری‌های اسید لاکتیک کافی برای رقابت در برابر میکروب‌های مضر قبل از سیلوکردن باشد (Chen *et al*., 2017; Silva *et al.*, 2017; Kung *et al*., 2018; Silva *et al*., 2018). در این مطالعه، محتوای ماده خشک علوفه ذرت تازه در لحظه سیلوکردن کافی بود (۳۵۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم؛ جدول ۲) که در دامنه ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم برکیلوگرم ماده خشک پیشنهاد شده توسط آسیس و همکاران (Assis *et al*., 2014) و سیلوا و همکاران (Silva *et al*., 2017) قرار داشت، که علوفه ذرت برای فرایند سیلوکردن بالاترین ارزش غذایی را دارا است و ماده خشک آن مناسب و کافی است. همچنین، غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب ذرت خرد شده تازه ۹۷/۱۶ گرم بر کیلوگرم ماده خشک بود که برای فرآیند سیلوسازی در هنگام سیلوکردن کافی گزارش شده است (Silva *et al*., 2018).

تغییرات دمایی سیلاژ پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا

یکی از شاخص‌های نشان‌دهنده فاسد شدن سیلاژ افزایش درجه حرارت درون توده سیلاژ بالاتر از دمای محیط است. لذا برای ارزیابی فساد هوازی، بررسی تغییرات دمایی نمونه‌های سیلاژ طی روزهای قرار گرفتن در معرض هوا بررسی شد. نتایج حاصل در شکل ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است. حداکثر دما[1]، زمان دستیابی به حداکثر دما [2]، و پایداری هوازی[3] تحت تأثیر تلقیح باکتری‌ها قرار گرفت. لذا کاهش حداکثر دما، افزایش زمان دستیابی به حداکثر دما و بهبود پایداری هوازی پس از ۱۰۵ روز تخمیر در سیلاژهای محتوی افزودنی باکتریایی مشاهده شد (شکل ۱، جدول ۳). در این مطالعه، سیلاژهای تلقیح شده نسبت به سیلاژ شاهد در طول ارزیابی اولیه افزایش دمای کندتری را و نرخ افزایش دمای پایین‌تری را نشان دادند بنابراین، پایداری هوازی بالاتری داشتند (جدول ۳). علاوه‌بر بررسی تغییرات دمایی و پایداری هوازی سیلاژها، حداکثر دما و زمان مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر دما محاسبه شد که تفاوت معنی‌داری بین سیلاژهای با و بدون افزودنی میکروبی برای این متغیرها مشاهده شد (شکل ۱). بالاترین دمای حداکثر در سیلاژ شاهد مشاهده شد (۳۸/۵۰ درجه سانتی‌گراد)، حداکثر دما در دیگر سیلاژهای ارزیابی شده کمتر (به‌طور متوسط ۳۲ درجه سانتی‌گراد) و تقریباً مشابه یکدیگر بود (شکل ۱).

1- Tmax: Maximum Temperature Reached (ºC)
2- TMT: Time spent to reach Maximum Temperature (hours)
3- AS: Aerobic Stability (AS)

جدول ۲– ترکیبات شیمیایی و میکروبی ذرت قبل از سیلو شدن
Table 2- Chemical and microbialo composition of maize before ensiling

متغیرها **Variables**	میانگین Average
pH	5.20
ماده خشک (گرم بر کیلوگرم علوفه تازه) Dry matter (g/kg of fresh matter)	350.02
ظرفیت بافری (میلی اکی والان بر کیلوگرم ماده خشک) Baffering capacity [1] (mEq/kg of dry matter)	210.00
ضریب تخمیر Fermentation coefficient (FC) [2]	35.39
ترکیب شیمیایی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) Chemical composition (g/kg of dry matter)	
کربوهیدرات محلول در آب Water-soluble carbohydrates (WSC)	97.160
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber (NDF)	480.00
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	265.00
پروتئین خام Crude protein	80.04
جمعیت میکروبی (کلنی جمعیت میکروبی شمارش شده در علوفه بر پایه لگاریتم) Microbial population (log cfu/g of forage)	
باکتری‌های لاکتیک اسید Lactic acid bacteria (LAB)	5.73
مخمرها Yeasts	5.57
قارچ‌ها Molds	3.20

[۱] بر اساس میلی‌اکی والان سود ۰/۲ نرمال مورد نیاز برای رساندن pH یک کیلو گرم ماده خشک علوفه از ۴ به ۶
[۲] ضریب تخمیر= FC= DM%+8WSC/BC (Addah et al., 2011)
داده های شیمیایی بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک می باشند و ترکیب اجزای میکروبی برحسب لگاریتم واحد تشکیل کلونی به ازای هر گرم علوفه تازه است.
[1] Expressed as mEq of 0.2 N NaOH required to raise pH of 1 kg (DM) of forage from 4 to 6.
[2] Co-efficient of fermentation:FC= DM%+8WSC/BC (Addah *et al.*, 2011).
Chemical data are in g/kg dry matter (DM), and microbial composition is in log colony-forming units (cfu)/g of fresh forage.

در بررسی زمان رسیدن به حداکثر دما، سیلاژهای تیمار شده با باکتری‌ها زمان بیشتری برای دستیابی به حداکثر دما گذراندند. این سیلاژها به‌طور متوسط پس از ۹۱ ساعت به حداکثر دما رسیدند، در حالی‌که سیلاژ شاهد پس از ۳۶ ساعت به حداکثر دما رسید (شکل ۱). پس از بازکردن سیلوها، طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا، سیلاژ شاهد پس از گذشت تقریباً ۶۶ ساعت شروع به گرم‌شدن کرد، بعد از ۷۲ ساعت پایداری هوازی آن از بین رفت و بیش از دو درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای محیط افزایش دما داشت و بعد از ۱۰۸ ساعت دمای آن به حداکثر دما (۳۸/۵۰ درجه سانتی‌گراد) رسید که ۱۵/۵۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط بود (جدول ۳). در سیلاژ محتوی باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که بالاترین پایداری هوازی را نشان داد، افزایش دما بعد از تقریباً ۱۹۲ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا رخ داد، پس از ۱۹۶ ساعت دمای سیلاژ بیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط شد و پس از ۲۶۵ ساعت به حداکثر دما (هفت درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط) رسید (شکل ۱، جدول ۳). سیلاژ تلقیح شده با جدایه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، در کل دوره ارزیابی با سرعت کمتری گرم شد، دمای آن به دمای محیط نزدیکتر بود که نشان‌دهنده پایداری هوازی بالاتری است.

افزایش دمای علوفه سیلوشده و نگهداری آن با گذشت زمان از شاخص‌های اصلی فساد و تخریب هوازی است که منعکس‌کننده فعالیت مخمرها و رشد قارچ‌های رشته‌ای است (Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). رشد و فعالیت مخمرها شرایطی را ایجاد می‌کند که باعث تحریک رشد قارچ‌ها می‌شود که ممکن است تأثیر مستقیمی بر افزایش دما در مطالعه حاضر داشته باشد. تغییرات درجه حرارت سیلاژ هنگام قرار گرفتن در معرض هوا عمدتاً به‌دلیل رشد قارچ‌ها به نظر می‌رسد (۱۸). در این پژوهش، حداکثر دمای

سیلاژهای ذرت رابطه منفی با پایداری هوازی سیلاژها داشت (جدول ۳) و سیلاژهای با پایداری هوازی کمتر، حداکثر دمای بالاتری داشتند که نشان‌دهنده کاهش فعالیت متابولیکی ریزجانداران تخریب‌کننده سیلاژ است (۲۵).

در این مطالعه، سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بهترین نتیجه را پس از قرار گرفتن در معرض هوا به نمایش گذاشت که نشان‌دهنده زوال کمتر توسط ریزجانداران است. با توجه به شکل ۱، سیلاژ تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مدت زمان بیشتری برای رسیدن به حداکثر دما نشان داد و از بقیه سیلاژها جدا شد. همچنین به‌دلیل پایین بودن دمای این سیلاژ نسبت به سایر سیلاژهای تلقیح شده برجسته شد. در این سیلاژ، ثبات هوازی بیشتر ممکن است به‌دلیل غلظت بیشتر اسید استیک مشاهده شده باشد (جدول ۵). اسید استیک رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای را کاهش می‌دهد و به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در برابر میکروب‌های نامطلوب نقش دارد، در نتیجه ثبات هوازی بیشتری برای سیلاژ ایجاد می‌کند (Avila et al., 2010; Nkosi et al., 2011; Santos et al., 2013; Santos et al., 2016; Lee et al., 2019).

پایداری هوازی سیلاژ پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا

پایداری هوازی سیلاژ که به‌عنوان تغییرات در ترکیبات شیمیایی، میکروبی و خصوصیات تخمیری مورد مطالعه قرار گرفت، در جدول ۴ و ۵ ارائه شده است. دینامیک تعداد ریزجانداران زنده برای هر سیلاژ در هنگام قرار گرفتن در معرض هوا در جدول ۴ نشان داده شده است. اثر باکتری‌های تلقیحی، روزهای قرار گرفتن در معرض هوا و اثر متقابل آن‌ها بر جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای مشهود بود (P<۰/۰۱). برای جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک، تعداد مخمرها و قارچ‌ها، پس از باز شدن سیلوها، بین باکتری‌های تلقیحی و زمان ارزیابی در سیلاژ اثر مشترک معنی‌داری وجود داشت که نشان می‌دهد باکتری‌های مورد استفاده در لحظه سیلوکردن بر جمعیت این ریزجانداران در مرحله هوازی تأثیر می‌گذارند. در روز باز شدن سیلوها، پس از ۱۰۵ روز تخمیر (زمان صفر)، جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک برای هر سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها در مقایسه با سیلاژ شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۱؛ جدول ۴). این اثر احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که در شرایط اسیدی قابلیت زیست برخی باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است کاهش یابد و فقط باکتری‌های اسید لاکتیک تخصصی همانند باکتری‌های اسیدلاکتیک تخمیرکننده ناهمگن می‌توانند فعال بمانند (Assis et al., 2014; Silva et al., 2018). همچنین، افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک نشان می‌دهد که این ریزجانداران در مقایسه با مخمرها و قارچ‌ها بر روند تخمیر تسلط دارند، که یک ویژگی مثبت محسوب می شود (Assis et al., 2014).

جدول ۳- دینامیک دمایی سیلاژهای ذرت علوفه‌ای با و بدون افزودنی میکروبی طی هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا

Table 3- Dynamics of temperature during aerobic exposure of corn silages without inoculants and inoculated with strains of lactic acid bacteria (LAB)

تیمارهای آزمایشی Experimental Treaments[1]	فراسنجه[2] نرخ افزایش دما Rate (ºC/h)	فساد هوازی AD (ºC)	پایداری هوازی AS (h)
Control	0.144 [a]	15.50 [a]	72.00 [e]
LP	0.063 [b]	11.00 [b]	117.00 [d]
LS	0.033[e]	8.00 [e]	156.00 [b]
PA	0.045[c]	10.00 [c]	120.00 [c]
LF	0.026 [f]	7.00 [f]	196.00 [a]
EF	0.039 [d]	9.00 [d]	120.00 [c]
SEM	0.001	0.156	0.152
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001

[a,b] میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است (P<0.05).

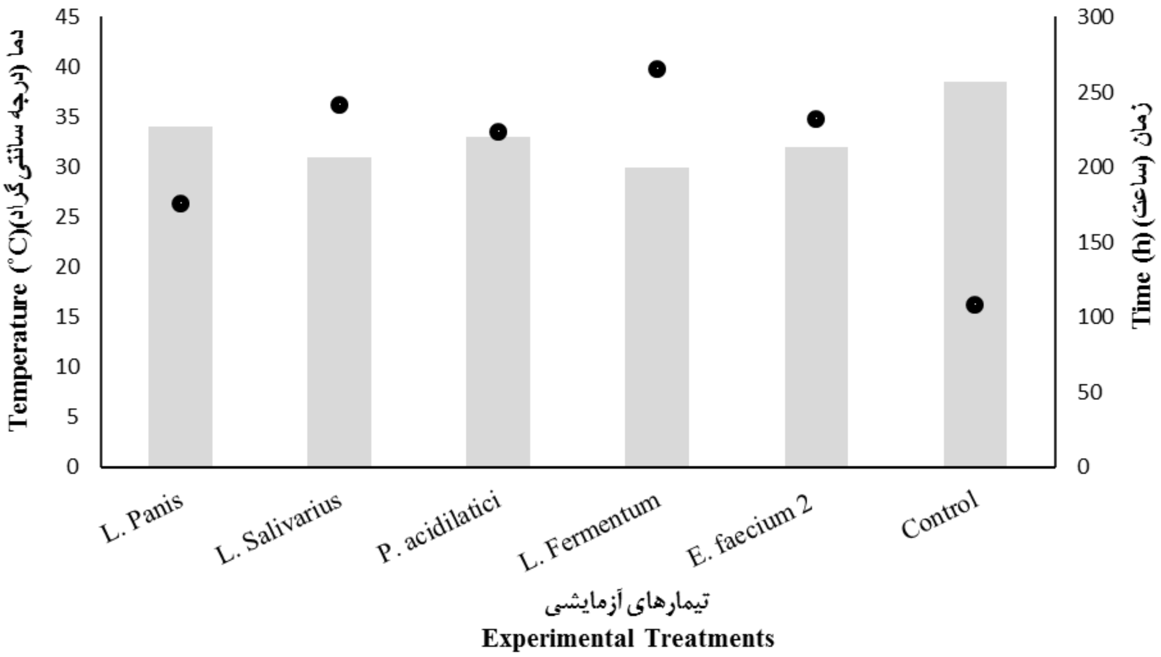
[1] کنترل، بدون افزودنی؛ *لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسدیلاکتیسی؛ لاکتولاسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[2] نرخ= نرخ افزایش دما (درجه سانتی‌گراد در ساعت)؛ زمان ۲ درجه سانتی‌گراد= زمان افزایش دما در ۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان پایداری هوازی تعریف شد (AS)؛ AD= تخریب هوازی به عنوان مجموع افزایش دمای روزانه (درجه سانتی‌گراد) بالاتر از دمای مرجع در طول ۸ روز اول هوازی تعریف شد.

[a,b] The means within the same columns with different letter have significant difference (P < 0.05).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA, Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] Rate= temperature rise rate (ºC/hour); Time 2 ºC= time to raise the temperature in 2 ºC defined as Aerobic Stability (AS); AD= Aerobic deterioration was defined as the sum of the daily temperature increases (°C) above the reference temperature during the first 8 d of aerobiosis.



شکل ۱ – حداکثر دما (نمودار میله‌ای) و زمان مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر دما (نقاط مشکی)

Figure 1- Maximum temperature achieved (bars) and the time required to achieve it (black spots) for different treatments after 8 d of aerobic exposure

بیشترین جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در سیلاژ با جدایه *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* مشاهده شد. این نتایج ممکن است به‌دلیل توانایی زنده ماندن این جدایه طی فرآیند تخمیر باشد و سریع‌تر از سایرین این باکتری تلقیحی تکثیر شده باشد (Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک در سیلاژ شاهد مشاهده شد. در روزهای صفر و چهار، هر سیلاژ محتوی باکتری‌های تلقیحی در مقایسه با سیلاژ شاهد تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتری را نشان دادند. طی قرار گرفتن در معرض هوا، باکتری‌های اسید لاکتیک هنوز هم می‌توانندچهار تا پنج روز رشد کنند، زیرا چندین جدایه به‌عنوان بی‌هوازی‌های مقاوم به هوا طبقه‌بندی می‌شوند، مانند *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم، لئوکونستوک مزنتریودیس و استرپتوکوکوس لاکتیس*. همچنین وضعیت بی‌هوازی در ته ظرف سیلاژ هنوز باعث رشد باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود (Lee *et al.*, 2019). با این حال، پس از هشت روز قرارگرفتن در معرض هوا، افزایش این ریزجانداران در سیلاژ شاهد وجود داشت، همچنین سیلاژ با ماده تلقیحی *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتری را نشان داد (جدول ۴).

مطالعات اندکی برای ارزیابی جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در طول قرار گرفتن در معرض هوا وجود دارد. از آن جا که برخی از ریزجانداران که به این گروه تعلق ندارند، ممکن است در محیط ام آر اس مورد استفاده برای شمارش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک رشد کنند، این تعداد می‌تواند بیش از حد تخمین زده شود (Avila *et al.*, 2010; Assis *et al.*, 2014). با این حال، آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2009) با استفاده از همان محیط، مشاهده کردند که ۷۲ جدایه جداشده در سیلاژ نیشکر همه از جنس لاکتوباسیلوس بودند. در مطالعه حاضر، پس از باز شدن سیلاژهای تلقیح شده، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت مخمر و کپک‌ها را مهار کرد. در لحظه باز شدن سیلوها، تعداد مخمرها در تمامی سیلاژها زیر سطح حداقل تعیین شده برای تشخیص (10^2 cfu/g FM) بود. از آن جا که شرایط هوازی تکثیر سلول‌ها را افزایش می‌دهد، افزایش تعداد مخمرها در سیلاژها انتظار می‌رفت. با این حال، در سیلاژ شاهد جمعیت مخمرها طی چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت، امّا در بقیه سیلاژها جمعیت مخمرها همچنان پایین بود. در سیلاژهای تلقیح شده، این افزایش به‌دلیل محتوای بالاتر اسید استیک (جدول ۵) کندتر اتفاق افتاد (جدول ۴).

به‌خوبی مشخص شده است که مخمرها مسئول اصلی فساد هوازی سیلاژ هستند. فرضیه این است که سیلاژ دارای جمعیت مخمر

بیشتر از 5 log$_{10}$cfu/g FM کیفیت میکروبی نامناسبی را در سیلاژ ایجاد کرده و بیشتر در معرض فساد هوازی هستند (Addah *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). علاوه‌براین، غلظت‌های بالای اسید لاکتیک و باقی‌مانده کربوهیدرات‌های محلول در آب در سیلاژی با کیفیت خوب، سوبستراهایی برای مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی هستند (Silva *et al.*, 2018)، به‌ویژه اگر مخمرها مصرف‌کنندگان لاکتات در مقایسه با مصرف‌کنندگان کربوهیدرات‌های محلول در آب باشند (Addah *et al.*, 2011). در پژوهش حاضر، طی قرار گرفتن نمونه‌های سیلاژ در معرض هوا، تعداد مخمرها در سیلاژ بدون باکتری تلقیحی (سیلاژ شاهد) به‌سرعت افزایش یافت و از مقدار مشخص 5 log$_{10}$cfu/g FM فراتر رفت. در حالی که در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده، به‌خصوص در سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، افزایش تعداد مخمرها به‌کندی انجام شد. جمعیت ذکر شده فقط در صورتی معتبر است که حاوی مخمرهایی باشد که از لاکتات استفاده می‌کنند و جمعیت بالایی از مخمرها لزوماً فاسد شدن سیلاژ را نشان نمی‌دهد (Carvalho *et al.*, 2014). بین جمعیت مخمر در سیلاژ و از دست دادن ثبات هوازی همبستگی وجود دارد (Carvalho *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر در زمان باز کردن سیلوها، هیچ گونه قارچی مشاهده نشد و جمعیت قارچ‌ها در هر سیلاژ زیر سطح حداقل تعیین شده برای تشخیص (۱۰^{۲} cfu/g FM) بوده و قابل شمارش نبودند. پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا جمعیت قارچ‌ها در سیلاژ شاهد افزایش یافت و به محدوده سطح قابل تشخیص cfu/g FM ۱۰^{۲} رسید. جمعیت قارچ‌ها در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها در طول چهار روز که در معرض هوا قرار داشت، همچنان زیر سطح حداقل قابل تشخیص بود و در طول هشت روز جمعیت آن‌ها در این سیلاژها در محدوده ۱۰^{۲} cfu/g FM قرار گرفت، به‌استثنای سیلاژ تلقیح‌شده با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که در طول هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا هیچ قارچی مشاهده نشد. امّا در سیلاژ شاهد تعداد قارچ‌ها در روز هشتم بیش از cfu/g FM ۱۰^{۲} بود. طبق گزارش آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2010) مهار رشد قارچ‌ها می‌تواند به‌دلیل غلظت کم اکسیژن، غلظت زیاد اسید لاکتیک و استیک یا باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در تمامی سیلاژها در زمان باز کردن سیلو رخ دهد. همچنین، طبق مشاهده لی و همکاران (Lee *et al.*, 2019) عدم وجود قارچ و محتوای ناچیز بوتیرات در تمام سیلاژها ممکن است به‌دلیل اسیدی بودن و pH پایین در سیلاژ باشد. در مطالعه چن و همکاران (Chen *et al.*, 2017) نیز مشابه این مطالعه جمعیت قارچ‌ها از حداقل سطح قابل تشخیص تعیین شده (2> cfu/g FM) کمتر گزارش شده است. مهار باکتری‌های هوازی (از طریق pH پایین) و قارچ‌ها (از طریق از بین بردن اکسیژن) در فرآیند تخمیر سیلاژ از عوامل کلیدی می‌باشد که مسئول ایجاد سیلاژی با کیفیت بالا هستند و در صورت قرار گرفتن در معرض هوا پایدارتر است (Pang *et al.*, 2011).

شاخص pH فراسنجه خوبی برای تعیین میزان وخامت هوازی سیلاژ است؛ زیرا اسید لاکتیک توسط مخمرهای جذب‌کننده لاکتات طی مدت زمانی‌که سیلاژ در معرض نفوذ هوا قرار می‌گیرد، مصرف می‌شود و سیلاژ برای رشد سایر ریزجانداران نامطلوب مانند کپک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی مطلوب می‌شود (Basso *et al.*, 2012; Kung *et al.*, 2018). pH تمامی سیلاژها پس از قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت، امّا این افزایش به‌طور متفاوتی بین تیمارها اتفاق افتاد (P<۰/۰۱؛ برای اثر مشترک معنی‌دار بین روز یا ساعت قرار گرفتن در معرض هوا و سیلاژ). پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ شاهد شروع به افزایش کرد، در حالی که کاهش جزئی pH برای سیلاژهای تلقیحی مشاهده شد (شکل ۲).

پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ شاهد بالاتر از pH سیلاژهای تلقیح‌شده با باکتری‌ها بود، البته در سیلاژ محتوی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی چهار روز همچنان کاهش pH نسبت به روز صفر مشاهده شد. با این حال، تمام سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌ها در چهارمین روز قرار گرفتن در معرض هوا مقادیر pH پایینی نسبت به سیلاژ شاهد داشتند (P<۰/۰۱). سیلاژ تلقیح‌شده با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در طول دوره هشت روز اندازه‌گیری پایداری هوازی، pH نسبتاً ثابت و کمی را حفظ کرد و افزایش کمی نشان داد. به‌عنوان مثال، برخی محققین گزارش دادند که پس از سه روز قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ ذرت از ۳/۸ به ۵/۸ افزایش یافت (Ranjit and Kung, 2000)، در مطالعه ما، پس از ۹۶ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا، pH تمام سیلاژهای تلقیح‌شده هنوز هم در حد مطلوب سیلاژ ذرت (۳/۷ – ۴/۲) (Kung and Shaver, 2001) قرار داشت. به عبارت دیگر، pH تقریباً پس از گذشت چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت. مقدار pH در سیلاژ محتوی باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در روز هشتم کم بود؛ این مطلب با تعداد کمتر مخمر در این تیمار و غلظت بالاتر اسیداستیک می تواند ارتباط داشته باشد (جدول ۴ و ۵). افزایش pH پس از باز شدن سیلوها در تحقیقات قبلی نیز مشاهده شده است (Avial *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). pH در سیلاژهای تلقیح‌شده با جدایه‌های باکتریایی طولانی‌تر از سیلاژ شاهد پایدار باقی ماند، به‌ویژه در سیلاژ با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که یک باکتری با تخمیر ناهمگن اجباری است. سیلاژ شاهد غلظت بالاتری از اسید لاکتیک و غلظت کمتری از اسید استیک را نشان داد که منجر به زوال سریع‌تر آن شد. در سیلاژ شاهد و دیگر سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌ها افزایش

همزمان با کاهش در غلظت اسید لاکتیک و استیک اسید اتفاق افتـاد (جدول ۵) و می‌تواند به مصرف این اسیدهای تولید شده طـی تخمیـر مرتبط باشد (Carvalho *et al*., 2014; Silva *et al*., 2018).

تأثیر باکتری‌های تلقیحی بر خصوصیات تخمیری سـیلاژ ذرت در هنگام قرار گرفتن در معرض هـوا مشـهود بـود (P<۰/۰۱). روزهـای قرار گرفتن در معرض هوا نیز تـأثیر معنـی‌داری بـر پایـداری هـوازی داشت. اثر متقابل بین تیمار و روز قرار گرفتن در معرض هوا بـه‌طـور معنی‌داری خصوصیات تخمیری سیلاژ را تحت تأثیر قرار داد (جـدول ۵). یک اثر مشـترک معنـی‌دار (P<۰/۰۱) بـین روز قـرار گـرفتن در معرض هوا و باکتری‌های تلقیحی بر غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب سیلاژها وجود داشت (جدول ۵).

جدول ٤– ترکیب میکروبی سیلاژهای ذرت تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده با باکتری اسید لاکتیک در زمان‌های متفاوت قرار گرفتن در معرض هوا (لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر)

Table 4- Microbial composition of corn silages without inoculants and inoculated with Lactic acid bacteria (LAB) at different times of aerobic exposure (log_{10}cfu/g FM)

متغیرها Variable	تیمارها Treaments[1]	روزهای هوازی Days of air exposure (d) 0	4	8	Mean	SEM[2]	Analysis of variance[3] (P-value) T	D	T×D
باکتری‌های اسیدلاکتیک LAB	Control	8.00[d]	7.51[d]	9.13[a]	8.22[d]	0.007	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	8.80[c]	8.90[c]	8.97[b]	8.89[c]				
	LS	8.95[b]	9.01[b]	8.81[c]	8.93[b]				
	PA	8.83[c]	8.88[c]	8.94[b]	8.88[c]				
	LF	9.26[a]	9.30[a]	8.85[c]	9.14[a]				
	EF	8.84[c]	8.90[c]	8.86[c]	8.87[c]				
	SEM	0.017	0.008	0.013	0.007				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
مخمرها Yeast	Control	2.92[a]	6.35[a]	7.98[a]	5.75[a]	0.010	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	2.11[b]	2.88[c]	6.21[c]	3.73[c]				
	LS	1.57[d]	1.98[e]	5.93[d]	3.16[e]				
	PA	2.11[b]	3.18[b]	6.53[b]	5.94[b]				
	LF	1.48[e]	1.65[f]	5.00[e]	2.71[f]				
	EF	1.98[c]	2.68[d]	6.16[c]	3.61[d]				
	SEM	0.016	0.012	0.027	0.010				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
قارچها Fungi	Control	ND[4]	2.89 [a]	3.98[a]	2.29[a]	0.008	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	ND	ND [b]	2.56[bc]	0.85[bc]				
	LS	ND	ND [b]	2.48[c]	0.83[c]				
	PA	ND	ND [b]	2.58[b]	0.86[b]				
	LF	ND	ND [b]	0.00 [d]	0.00[d]				
	EF	ND	ND [b]	2.51[bc]	0.84[bc]				
	SEM	0.000	0.012	0.021	0.008				
	P-value	…….	<0.0001	0.014	<0.0001				

[a,b] میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است (P<0.05).

[۱] *کنترل، بدون افزودنی؛ لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسدیلاکتیسی؛ لاکتولاسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[۲] SEM: اشتباه معیار میانگین

[۳] T، اثر تیمار؛ D، اثر روزهای در معرض هوا؛ T × D، برهم‌کنش تیمار و روزهای در معرض هوا.

[۴] شناسایی نشد، کمتر از ۲ لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر؛ غیر قابل شناسایی (در رقت $۱۰^{-۱}$).

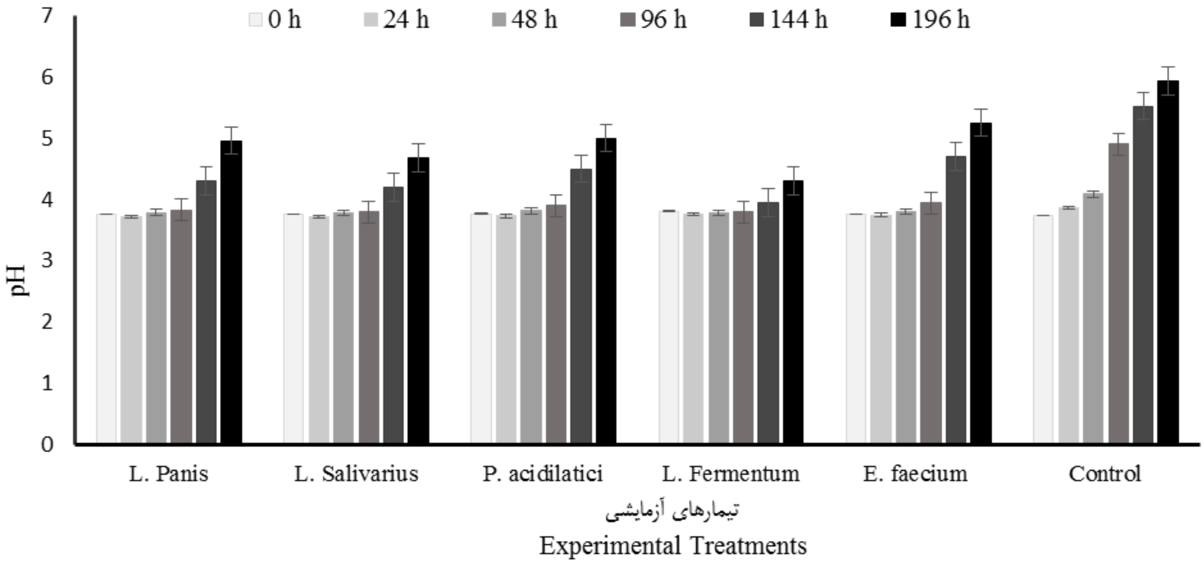
[a,b] The means within the same columns with different letter have significant difference (P < 0.05).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA, Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] SEM, standard error of means

[3] T, effect of treatment; D, effect of aerobic exposure day; T × D, interaction between treatment and aerobic exposure day.

[4] Not detectable, < 2.00 log_{10}cfu/g FM； ND, non-detectable (dilution 10^{-1}).



شکل ۲– اثر تلقیح سیلاژهای ذرت بر تغییرات pH، طی ۸ روز قرارگرفتن در معرض هوا

Figure 2- Effect of inoculation of corn silages on changes in pH during 8 d of aerobic exposure

پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها به‌طور جزئی کاهش یافت، امّا این کاهش در سیلاژ شاهد بیشتر بود. محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب در تمام سیلاژهای تلقیح‌شده به‌تدریج طی هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا کاهش کمی نشان داد، امّا در سیلاژ شاهد این کاهش چشمگیر بود. با این حال، کاهش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب کمتر از اسید لاکتیک در طول آزمون پایداری هوازی بود.

محتویات اسید لاکتیک در روز چهارم در سیلاژ شاهد به‌شدت کاهش یافت (P<۰/۰۱) و در پایان آزمون پایداری هوازی به کمترین مقدار بین سیلاژها رسید و به‌سرعت pH سیلاژ شاهد را افزایش داد. نتایج این پژوهش میزان سریع‌تر تخریب لاکتات را نسبت به باقی‌مانده کربوهیدرات محلول در آب در سیلاژ شاهد نشان می‌دهد، در این زمینه، ما تصور می‌کنیم که تعداد مخمر جذب‌کننده لاکتات از مخمر جذب‌کننده کربوهیدرات‌های محلول در آب بالاتر بود. مخمرهای جذب‌کننده لاکتات، اسید لاکتیک را مصرف می‌کنند و در نتیجه، با قرار گرفتن در معرض هوا باعث افزایش pH سیلاژ می‌شوند (Chen *et al.*, 2017).

غلظت لاکتات در سیلاژهای تلقیح شده طی چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا نسبتاً ثابت باقی ماند، امّا بعد از هشت روز برای تمامی سیلاژها به‌طور چشمگیری کاهش یافت، به‌استثنای سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که کاهش کمتری داشت. نتایج مطالعه حاضر، یافته‌های محققین دیگر را تأیید می‌کند که گزارش کردند که مقدار بالای اسید لاکتیک تولید شده با تولید ناکافی اسیدهای چرب فرار در طول دوره تخمیر سیلاژ باعث افزایش فعالیت مخمرهای جذب‌کننده لاکتات می‌شود و فرآیند فساد در سیلاژ را آغاز کرده، اسید لاکتیک را به دی‌اکسیدکربن و آب متابولیزه و باعث افزایش pH سیلاژ می‌شوند (Ranjit and Kung., 2000; Chen *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). همان‌طور که مشاهده شد، تعداد مخمرها در سیلاژ شاهد در ابتدای آزمون پایداری هوازی (روز صفر) نسبت به سیلاژهای تلقیح شده بالاتر بود و از ابتدای آزمون پایداری هوازی تا روز هشت، افزایش تعداد مخمرها در سیلاژ شاهد ادامه پیدا کرد و هم‌زمان با رشد مخمرها محتوای اسید لاکتیک کاهش یافت (P<۰/۰۱)، چرا که مخمرها قادر به استفاده از اسید لاکتیک به‌عنوان منبع کربن هستند (Carvalho *et al.*, 2014)، و این امر به‌سرعت pH سیلاژ را افزایش داد. با افزایش pH، ریزجانداران دیگری که در سیلاژ غیرفعال بودند، ظاهر می‌شوند، در نتیجه سیلاژ بیشتر فاسد می‌شود (Addah *et al.*, 2011; Avila *et al.*, 2012). در مورد سیلاژهای تلقیح شده، افزایش pH، ناشی از کاهش اسیدهای آلی، شرایط را برای تولید مخمرها فراهم می‌کند که کاهش اسید لاکتیک و افزایش pH، پس از چهار روز مشاهده شد و در روز هشت آزمون پایداری هوازی مقدار pH سیلاژها بالا بود.

جدول ۵- خصوصیات تخمیری سیلاژهای ذرت تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده با باکتری اسیدلاکتیک در زمان‌های متفاوت قرار گرفتن در معرض هوا (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

Table 5- Fermentation characteristics of corn silages without inoculants and inoculated with Lactic acid bacteria strains at different times of aerobic exposure (g/kg of DM).

متغیرها Variable	تیمارها Treaments[1]	روزهای هوازی Days of air exposure (d)			Mean	SEM[2]	Analysis of variance[3] (P-value)		
		0	4	8			T	D	T×D
کربوهیدرات محلول‌درآب WSC	Control	10.00[a]	6.50[c]	2.64[d]	6.38[c]	0.112	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	7.24[d]	7.07[bc]	4.64[bc]	6.32[c]				
	LS	7.78[c]	7.65[b]	6.06[a]	7.17[b]				
	PA	7.27[d]	6.70[c]	4.30[c]	6.09[c]				
	LF	5.70[e]	5.65[d]	5.20 [b]	5.52[d]				
	EF	9.36[b]	9.05[a]	5.12[b]	7.84[a]				
	SEM	0.069	0.143	0.157	0.112				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اسید لاکتیک Lactic acid	Control	75.62[a]	40.27[d]	15.29[e]	43.73[d]	0.398	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	75.03[a]	73.13[a]	19.56[d]	55.91[c]				
	LS	73.98 [ab]	72.85[ab]	30.36[b]	59.06[b]				
	PA	74.90[ab]	70.04[c]	19.44[d]	54.79[c]				
	LF	71.70[b]	70.80[bc]	50.12[a]	64.21[a]				
	EF	73.13[ab]	71.76[abc]	22.20[c]	55.70[c]				
	SEM	0.786	0.520	0.085	0.398				
	P-value	0.010	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اسید استیک Acetic acid	Control	30.89[e]	15.00[d]	7.00[d]	17.63[e]	0.325	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	37.35[cd]	38.56[c]	11.51[c]	29.14[c]				
	LS	40.66[b]	42.70[b]	14.03[b]	32.46[b]				
	PA	37.39[c]	38.05[c]	10.49[c]	28.64[cd]				
	LF	50.06[a]	52.50[a]	25.01[a]	42.52[a]				
	EF	35.67[d]	36.51[c]	11.14[c]	27.77[d]				
	SEM	0.408	0.759	0.293	0.325				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اتانول Ethanol	Control	15.02[a]	10.37[a]	1.66[b]	9.02[a]	0.160	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	12.51[b]	7.37[b]	1.93[ab]	7.27[b]				
	LS	10.50[c]	7.06[b]	2.13[ab]	6.57[b]				
	PA	11.92[bc]	7.56[b]	1.95[ab]	7.14[b]				
	LF	10.70[bc]	6.94[b]	2.32[a]	6.65[b]				
	EF	10.32[c]	8.06[b]	1.69[b]	6.69[b]				
	SEM	0.393	0.327	0.118	0.160				
	P-value	<0.0001	<0.0001	0.014	<0.0001				

[a,b] میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است (P<0.05).

[۱] کنترل، بدون افزودنی؛ *لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسیدیلاکتیسی؛ لاکتوباسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[۲] SEM: اشتباه معیار میانگین

[۳] T، اثر تیمار؛ D، اثر روزهای در معرض هوا؛ T × D، برهم‌کنش تیمار و روزهای در معرض هوا.

[۴] شناسایی نشد، کمتر از ۲ لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر؛ غیر قابل شناسایی (در رقت $۱۰^{-۱}$).

[a,b] The means within the same columns with different letter have significant difference ($P < 0.05$).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA, Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] SEM, standard error of means

[3] T, effect of treatment; D, effect of aerobic exposure day; T × D, interaction between treatment and aerobic exposure day.

[4] Not detectable, < 2.00 $\log_{10}$cfu/g FM; ND, non-detectable (dilution 10^{-1}).

برای غلظت‌های اسید استیک و اتانول اثر متقابل معنی‌داری بین مواد تلقیحی و زمان ارزیابی مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین غلظت اسید استیک در زمان باز شدن سیلوها (روز صفر قرار گرفتن در معرض هوا)، در تیمار با جدایه *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* مشاهده شد. در رابطه با اسید استیک، کاهش غلظت آن در روز چهارم ارزیابی پایداری هوازی در شاهد مشاهده شد (جدول ۵). با این حال، پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، غلظت اسید استیک در تمام سیلاژهای محتوی باکترهای تلقیحی، به‌ویژه در سیلاژهای تلقیحی با *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس‌سالیواریوس* افزایش یافت. طبق نظر رنجیت و کانگ (Ranjit and Kung., 2000) و باسو و همکاران (Basso *et al.*, 2012) تولید استات توسط باکتری‌های تخمیرکننده ناهمگن ممکن است در طول قرار گرفتن در معرض هوا ادامه یابد. این افزایش غلظت استات را نمی‌توان جزء اتلاف ماده خشک به حساب آورد. بنابراین، ممکن است از ادامه تولید استات توسط باکتری‌های با تخمیر ناهمگن در طول قرار گرفتن در معرض هوا بوده باشد (Ranjit and Kung., 2000).

پس از گذشت چهار روز غلظت اسید استیک اسید تا روز هشتم قرار گرفتن در معرض هوا، در تمامی سیلاژها کاهش یافت، گرچه غلظت اسید استیک در سیلاژ تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس‌فرمنتوم* کاهش کمتری نشان داد (جدول ۵). بر اساس گزارش‌های محققین، کاهش اسیدهای استیک، پروپیونیک و بوتیریک، و غلظت‌های اتانول ممکن است به‌دلیل فرار شدن آن‌ها طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا باشد (Carvalho *et al.*, 2014). طبق گزارش‌های آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2012) و کاروالهو و همکاران (Carvalho *et al.*, 2014) کاهش غلظت اسید استیک ممکن است به‌دلیل فرار شدن این اسید یا استفاده آن توسط باکتری‌های اسید استیک اتفاق افتاده باشد. پس از استفاده از اتانول، این باکتری‌ها می‌توانند اسید استیک را به‌طور کامل (به‌خوبی اسید لاکتیک) به دی‌اکسیدکربن و آب متابولیزه کرده و باعث افزایش شدید pH شوند. به‌طورکلی، مشاهده شد که محصولات متابولیسم میکروبی تولید شده طی تخمیر پس از قرار گرفتن در معرض هوا، در سیلاژ شاهد با سرعت بیشتری در مقایسه با سیلاژهای دیگر از بین رفتند. داده‌ها نشان می‌دهند که در سیلاژهای تلقیح شده، محتوای اسیدهای استیک و لاکتیک تا چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا بالاتر است (جدول ۵). اسید استیک بسیار ضدمیکروب است و نشان داده شده است که مخمرها را مهار می‌کند (Basso *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2018).

در حالت دوم، ممکن است اسید استیک عامل اصلی رشد کندتر مخمر در دوره پس از باز شدن سیلوها باشد (Avila *et al.*, 2012)؛ مخمرهایی که لاکتات را جذب می‌کنند در وهله اول مسئول فساد سیلاژ هنگام قرار گرفتن در معرض هوا هستند (Basso *et al.*, 2012). رابطه بین اسید استیک و پایداری هوازی توسط محققین گزارش شده است؛ به نحوی که افزایش غلظت اسید استیک باعث مهار فساد توسط ریزجانداران می‌شود، بنابراین پایداری هوازی را افزایش می‌دهد. به گفته این محققان، افزایش غلظت اسید استیک در سیلاژ ثبات هوازی را بهبود می‌بخشد. ثبات بهبود یافته به عملکرد اسید استیک روی مخمرها و قارچ‌ها نسبت داده شده است (Avila *et al.*, 2010; Nkosi *et al.*, 2011; Basso *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014). همچنین استات به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در برابر میکروب‌های نامطلوب نقش دارد (Lee *et al.*, 2019). علاوه‌براین، در سیلاژهایی که دارای باکتری‌های تلقیحی هستند، میزان بیشتر اسیدپروپیونیک (داده‌ها گزارش نشده است) و اسید استیک در لحظه باز کردن سیلوها ممکن است در رشد کمتر مخمرها (جدول ۴) نقش داشته باشد (Avila *et al.*, 2012).

در طول دوره ارزیابی پایداری هوازی، اتانول پس از قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا از بین رفت (جدول ۵). کاهش اتانول پس از قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا به‌دلیل فرار شدن یا استفاده از آن برای تولید اسید استیک توسط باکتری‌ها است (Avila *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014)؛ از آن جایی‌که طی ارزیابی روز چهارم غلظت اسید استیک افزایش یافت، می توان نتیجه گرفت که کاهش غلظت اتانول به‌دلیل فرار شدن نبوده است (Carvalho *et al.*, 2014). همان‌طور که در نتایج حاصل از این مطالعه مشاهده شد، تلقیح سیلاژها با باکتری‌های اسید لاکتیک منجر به غلظت بالای اسید استیک و pH پایین پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا شد. این الگو می‌تواند به‌دلیل تأثیر باکتری‌های استیک اسید هوازی، عمدتاً جنس استوباکتر و گلوکونوباکتر باشد. این باکتری‌ها می‌توانند کربوهیدرات‌های محلول در آب و یا اتانول را به‌صورت هوازی به اسید استیک تبدیل کنند (Silva *et al.*, 2018). در سیلاژ شاهد چون طی ارزیابی پس از گذشت هشت روز غلظت اسید استیک افزایش نیافت، می‌توان فرض کرد که کاهش غلظت اتانول به‌دلیل فرار شدن باشد (Avila *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014). مفاهیم مربوط به تغییرات غلظت محصولات نهایی تخمیر طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا پیچیده است. زیرا این متابولیت‌ها با گروه‌های مختلف ارگانیسم‌ها در ارتباط هستند (Carvalho *et al.*, 2014). پایداری هوازی سیلاژ عمدتاً با مهار رشد ریزجاندارانی است که می‌توانند در حضور اکسیژن در سیلوها رشد کنند. قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها اصلی‌ترین ریزجاندارانی هستند که در تخریب هوازی سیلاژ نقش دارند (Santos *et al.*, 2016). مواد تلقیحی حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک تخمیرکننده ناهمگن که غلظت بالایی از اسید استیک تولید می‌کنند به‌دلیل اثر مهاری این اسید برای کنترل مخمر مناسب‌تر هستند (Silva *et al.*, 2018).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، جدایه‌های باکتری اسیدلاکتیک آزمایش شده به‌عنوان باکتری‌های تلقیحی قادر به اصلاح پارامترهای تخمیری و شیمیایی سیلاژ ذرت پس از قرار گرفتن در معرض هوا بودند و اثرات مثبتی بر روی تخمیر و پایداری هوازی سیلاژ ذرت نشان دادند. استفاده از آن‌ها توصیه می‌شود، زیرا منجر به تولید بیشتر اسید استیک، pH پایدارتر، کاهش جمعیت مخمرها و قارچها، در نتیجه بهبود پایداری هوازی سیلاژهای تلقیح شده در مقایسه با سیلاژ شاهد شدند. با این حال، بهترین نتیجه هنگام قرار گرفتن نمونه‌های سیلاژ در معرض هوا، در سیلاژ تلقیح‌شده با جدایه ۱۶، جدایه تخمیرکننده ناهمگن اجباری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد؛ که ممکن است در نتیجه غلظت بالای اسید استیک تولید شده در این سیلاژ، همچنین جمعیت کمتر مخمرها و عدم رشد قارچها ایجاد شده باشد. بنابراین، این جدایه برای تولید افزودنی میکروبی سیلاژ مؤثر است. با این حال، نویسندگان توصیه می‌کنند که جدایه‌های باکتری‌ها در یک سیلوی با مقیاس مزرعه آزمایش شوند تا اثرات واقعی آن‌ها بررسی شود.

References

1. Addah, W., Baah, J., Groenewegen, P., Okine, E. K., & McAllister, T. A. (2011). Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. *Canadian Journal of Animal Science*, *91*, 133–146. https://doi.org/10.4141/CJAS10071
2. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Vol. 1. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
3. Assis, F. G. V., Avila, C. L. S., Pinto, J. C. & Schwan, R. F. (2014). New inoculants on maize silage fermentation, Revista Brasileira de Zootecnia, *43*(8), 395-403. https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000800001
4. Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., & Schwan, R. F. (2009). Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *Grass and Forage Science*, *64*, 384–394. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2009.00703.x
5. Avila, C. L. S., Valeriano, A. R., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., Rezende, A.V., & Schwan, R. F. (2010). Chemical and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with microbial inoculants. *Brazilian Journal of Animal Science*, *39*, 25–32. https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000100004
6. Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Oliveira D. P., & Schwan, R. F. (2012). Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus sp*. isolated from sugar cane. *Brazilian Journal of Animal Science*, *41*, 249–255. https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000200003
7. Avila, C. L. S., Carvalho, B. F., Pinto, J. C., Duarte W. F., & Schwan, R. F. (2014). Use of *Lactobacillus hilgardii* strains for enhancing quality of sugarcane silage. *Journal of Dairy Science*, *97*, 940–951. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987
8. Basso, F. C., Bernardes, T. F., Roth, A. P. T. P., Lodo, B. N., Berchielli, T. T., & Reis, R. A. (2012). Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *41* (7), 1789-1794. https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000700032
9. Carvalho, B. F., Avila, C. L. S., Miguel, M. G. C. P., Pinto, J. C., Santos, M. C., & Schwan, R. F. (2014). Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria.*Grass and Forage Science*, *70*, 308-323. https://doi.org/10.1111/gfs.12117
10. Chen, L., Yuan, X. J., Li, J. F., Wang, S. R., Dong, Z. H., & Shao, T. (2017). Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and *in vitro* gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. *Journal of Integrative Agriculture*, *15*(7), 1592–1600. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61482-X
11. Silva, T. C., Silva, L. D., Santos, E. M., & Oliveira, J. S. (2017). Importance of the fermentation to produce high-quality silage. pp. 1-22 in Fermentation Processes Croatia. A. Jozala, ed. IntechOpen.
12. Deraize, R. E. (1961). Routine analysis of carbohydrate and lignin in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *12*, 152-159. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740120210
13. Fabiszewska, A. G., Zielinska, K. J., & Wrobel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: A minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(76), 1-8. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2
14. Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., & Stoskus, R. (2018). Variations in fermentation, bacterial population and aerobic stability in maize silage. *Zemdirbyste-Agriculture*, *105*(4), 377–382. https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.048
15. Kung, L., and R. Shaver. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage, 3: 1–5. https://fyi.extension.wisc.edu/forage/interpretation-and-use-of-silage-fermentation-analysis-reports.
16. Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, *101*, 4020–4033.

https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909

17. Lee, S. S., Lee, H. J., Paradhipta, D. H. V., Joo, Y. H., Kim, S. B., Kim, D. H., & Kim, S. C. (2019). Temperature and microbial changes of corn silage during aerobic exposure. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, *32*, 988–995. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0566
18. Nkosi, B. D., Meeske, R., Langa, T., & Thomas, R. S. (2011). Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams. *South African Journal of Animal Science*, *41*, 350–359. https://doi.org/10.4314/sajas.v41i4.5
19. Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 125–132. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
20. Pang, H., Zhang, M., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., & Cai, Y. (2011). Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Animal Science Journal*, *82*, 642–653. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00894.x
21. Ranjit, N. K., & Kung, L. (2000). The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, *83*, 526–535. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5
22. Saarisalo, E., Skytta, E., Haikara, A., Jalava, T., & Jaakkola, S. (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Applied and Environmental Microbiology*, *102*, 327–336. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03103.x
23. Santos, A. O., Avila, C. L. S., & Schwan, R. F. (2013). Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. *Journal of Dairy Science*, *96*, 7777–7789. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6782
24. Santos2016, A. O., Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Carvalho, B. F.Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2016). Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *120*, 266–279. https://doi.org/10.1111/jam.12980
25. SAS Institute. 2013. SAS User's Guide. Version 9.4. SAS Inst. Inc.,Cary , NC.
26. Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C., Leandro, E. S., Paula, R. A., Santos, S. A., Ribeiro, K. G., & Valadares Filho, S. C. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. *Grass and Forage Science*, *73*, 660–670. https://doi.org/10.1111/gfs.12360

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 379-398

Effects of Kallequchi Pistachio Green Hull (*Pistacia vera)* and Its Processed with Urea on Performance, Immune Response, and Blood Biochemical Indices and Jejunal Morphology in Broiler Chickens

Razieh Ahmadi-kohanali[1], Seyyed Javad Hosseini Vashan[2]*, Mohsen Mojtahedi[3], Hadi Sarir[4]

Received: 12-08-2021
Revised: 16-11-2021
Accepted: 20-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Ahmadi-kohanali, R., Hosseini Vashan, S. J., Mojtahedi, M., & Sarir, H.(2022). Effects of Kallequchi pistachio green hull (*Pistacia vera)* and its processed with urea on performance, immune response, and blood biochemical indices and jejunal morphology in broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 379-398.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.71865.1036

Introduction: The use of agricultural and food industry by-products in animal feed leads to a reduction in breeding costs. In addition application of agricultural waste in poultry feed also reduces the environmentally harmful effects. One of these by-products is pistachio green peel, which is produced in food industries. Common pistachio (common pistachio in the market) with the scientific name Pistacia vera is a plant of the genus Anacardiaceae. Iran is the world's largest pistachio producer with 58% of the world's pistachio production. Research has shown that about four hundred thousand tons of pistachio by-products are produced annually in Iran and large volumes in the harvest season and high humidity of these products cause environmental pollution and pistachio orchards. Pistachio green peel has a parenchymal and fibrous structure and contains water, sugars, proteins, fats, minerals, vitamins, color compounds and terpenes. Green pistachio skin contains 4425.45 Kcal/kg of gross energy, 32.64% of dry matter, 11.24% of crude protein, 15.38% of crude fiber, 13.13% of ash, 5.79% of ether extract, 1.08 of calcium, 0.11% of phosphorus, 0.31% of magnesium, 4.44% of potassium. The concentrations of iron, manganese, copper and zinc in pistachio green peel are 660.68, 23.6, 16.23 and 5.27 mg/kg, respectively. There are significant amounts of alpha-pinene, alpha-terpinolene, flavonoids and phenolic compounds. Food sources rich in phenolic compounds have a set of physiological properties including antioxidant, antimicrobial, anti-mutagenicity, lipoprotein oxidation inhibitor and have platelet aggregation, anti-inflammatory activity and strengthen the immune response. The use of pistachio green peel extract improved the growth performance of broiler chickens, blood lipids and abdominal fat. The use of pistachio green skin extract in the diet of broiler infected with Staphylococcus aureus improved growth performance, increased antibody titer against sheep erythrocytes, decreased blood lipids and microbial population of the gastrointestinal tract of broilers. Therefore, the aim of this research was to investigate the effect of Green Pistacia of kallequchi and it's processed with urea on growth performance, blood indices, immune response and jejunum morphology of broiler chickens .

Materials and Methods: A total of 280 male broilers were randomly distributed in 28 experimental units including 7 treatments, 4 replicates and 10 chicks each. The experimental diets consisted of the levels of 0, 1.5, 3, and 5% of the raw and processed green hull of kallequchi pistachio. The broilers were fed with three dietary programs including starter (1-10 days), grower (11-24 days), and finisher (25-42 days). At the end of each period, the body weight gain and feed consumption were recorded and the feed conversion ratio was calculated. Two birds of each replicate were slaughtered and their blood was gathered to analyze the biochemical blood indices at 42 days of age. The data were analyzed with SAS software and the mean was compared with the

1- Postgraduate in poultry production and husbandry management, Animal Science Department, University of Birjand, Birjand, Iran.
2- Associate professor in Poultry Nutrition, Animal Science Department, University of Birjand Birjand, Iran.
3- Assistant professor in Animal Nutrition, Animal Science Department, University of Birjand Birjand, Iran.
4- Associate professor in Immunology, Animal Science Department, University of Birjand Birjand, Iran.
*Corresponding Author Email: jhosseiniv@birjnd.ac.ir

Tukey test at 0.05.

Results and Discussion: The addition of green hull of pistachio and its processed to diets cause a decrease in the feed conversion ratio during the starter and the whole period of the experiment (P≤0.05). In the starter period, adding 3% of the green hull of the pistachio increased the body weight gain compared to the control (P <0.05). The pistachio green hull increased total antibody and immunoglobulin G antibody titer against sheep red blood cells compared to control (P≤0.05). Experimental diets decreased serum cholesterol and LDL concentrations compare to control (P≤0.05). The green hull of kallequchi pistachio and its processed increased the villus height and decreased villus width and the ratio of height to crypt depth compared to the control (P≤0.05). Different levels of kallequchi pistachio green hull and its processed increased relative weight of the breast, heart, burs fabricius and decreased abdominal fat compared to control (P≤0.05). The same findings were reported by researchers that pistachio green hull extract decreased blood lipids and increased the immune response of broiler chickens (Yousefi et al., 2018; Hosseini Vashan et al., 2020).

Conclusion: It is concluded that adding green hull of kallequchi pistachio up to 5% into broiler diets may improve growth performance, however, the addition of 3% could reduce cholesterol, FCR and improve the immune response of broiler chickens.

Keywords: Antibodies, Broiler chicks, Cholesterol, Lipid profiles, Pistachio.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر تغذیه پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده با اوره بر عملکرد، پاسخ ایمنی، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و ریخت‌شناسی ژژنوم جوجه‌های گوشتی

راضیه احمدی کهنعلی[۱]، سید جواد حسینی واشان[۲]*، محسن مجتهدی[۳]، هادی سریر[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹

احمدی کهنعلی، ر.، حسینی واشان، س. ج.، مجتهدی، م.، و سریر، ه. (۱۴۰۱). اثر تغذیه پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده با اوره بر عملکرد، پاسخ ایمنی، شاخص‌های بیوشیمیایی خون و ریخت‌شناسی ژژنوم جوجه‌های گوشتی. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۹۸-۳۷۹.

چکیده

این پژوهش، به‌منظور ارزیابی اثرات پودر پوست سبز پسته کله قوچی‌خام و فرآوری شده با اوره بر عملکرد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون، پاسخ ایمنی و ریخت‌شناسی روده جوجه‌های گوشتی انجام شد. تعداد ۲۸۰ قطعه جوجه خروس گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی در هفت تیمار، چهار تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار توزیع شدند. جیره‌های آزمایشی شامل سطوح صفر، ۱/۵، ۳ و ۵ درصد پوست سبز پسته کله‌قوچی خام و فرآوری شده بود. پوست سبز پسته کله‌قوچی یا فرآوری شده آن ضریب‌تبدیل خوراک را در دوره آغازین و کل دوره پرورش در مقایسه با شاهد کاهش داد ($P<0/05$). در دوره آغازین، افزودن سه درصد پوست سبز پسته کله‌قوچی باعث وزن بدن بالاتر در مقایسه با شاهد و تیمار پنج درصد پوست پسته کله‌قوچی شد ($P\leq0/05$). افزودن پوست پسته کله قوچی موجب افزایش عیار پادتن تام و ایمونوگلوبولین G علیه گلبول‌قرمز گوسفند در مقایسه با شاهد شد ($P<0/05$). جیره‌های آزمایشی باعث کاهش غلظت کلسترول و LDL سرم خون در مقایسه با شاهد شدند ($P<0/05$). سطح سه درصد پوست پسته خام و فرآوری شده، بیشترین افزایش ارتفاع پرز و کمترین عرض پرز ژژنوم را نسبت به سایر سطوح نشان داد و افزایش وزن نسبی سینه، قلب، بورس‌فابرسیوس و کاهش درصد چربی بطنی در سطح سه درصد پوست پسته در مقایسه با شاهد مشاهده شد ($P<0/05$). نتیجه نهایی، این که افزودن پوست سبز پسته کله‌قوچی تا سطح پنج درصد باعث بهبود صفات عملکردی شد، هرچند سطح سه درصد می‌تواند باعث کاهش کلسترول، ضریب تبدیل و بهبود پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی شود.

واژه‌های کلیدی: پسته، جوجه های گوشتی، عیار پادتن، کلسترول، نیمرخ لیپیدی.

مقدمه

پرورش و تولید طیور به‌عنوان یکی از روش‌های مقرون به‌صرفه و کارآمد جهت تأمین پروتئین حیوانی مورد نیاز انسان محسوب می‌شود. با توجه به رشد روز افزون جمعیت دنیا و ضرورت نیاز انسان به منابع پروتئینی، افزایش میزان تولید فرآورده‌های گوشتی به‌ویژه گوشت طیور که از لحاظ اقتصادی و تغذیه‌ای، یک فرآورده ارزشمند است، ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه بخشی از مواد خوراکی مورد استفاده در جیره طیور با مواد غذایی انسانی مشترکند، بنابراین همواره محققین به‌دنبال یافتن مواد خوراکی جدید با قیمت مناسب‌تر و ارزش غذایی مناسب هستند. استفاده از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی در تغذیه دام به کاهش هزینه‌های پرورشی منجر می‌شود و از طرف دیگر، مصرف ضایعات کشاورزی در تغذیه طیور خطرات زیست‌محیطی ناشی از دفع آن‌ها را نیز کاهش می‌دهد (Persia *et al.*, 2003). یکی از این محصولات فرعی، ضایعات فرعی پوست سبز پسته است که در کارخانجات صنایع غذایی تولید می‌شود. پسته معمولی (پسته

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد پرورش و مدیریت تولید طیور، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۲- دانشیار تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۳- استادیار تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

۴- دانشیار ایمنی‌شناسی، گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

(*- نویسنده مسئول: (Email: jhosseiniv@birjnd.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2021.71865.1036

خوراکی رایج در بازار) با نام علمی *Pistacia vera* از گیاهان تیره آناکاردیاسه یا تیره پسته است. گونه‌های مختلف جنس پسته، عموماً درختان وحشی، خودرو و مقاوم در مقابل خشکی هستند. تنها پسته ایران از نظر شکل، رنگ، ساختار ظاهری، اندازه و ابعاد و مشخصات مغز آن، ارقام بسیار متنوعی دارد، به‌طوری‌که از نظر کیفیت طعم و تنوع شکل، در دنیا بی‌همتاست (Ahmadi *et al.*, 2020). ایران با داشتن حدود سی درصد تولید پسته دنیا و مقدار ۳۳۷ هزار تن پسته، در رتبه دوم بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته جهان قرار دارد (Ahmadi *et al.*, 2020). تحقیقات نشان داده است که سالانه حدود چهارصد هزار تن محصولات فرعی پسته در کشور تولید می‌شود و حجم انبوه در فصل برداشت و رطوبت بالای این محصولات باعث آلودگی محیط زیست و باغهای پسته می‌شود (Bohluli *et al.*, 2010).

رقم اوحدی با ۶۰ درصد سطح زیر کشت رتبه اول و رقم کله قوچی رتبه دوم سطح زیر کشت پسته کشور را دارند. همه ساله در تمامی نقاط پسته‌خیز کشور به‌خصوص استان کرمان طی فرآیند پوست‌گیری از پسته تازه، پوست زیادی تولید و بیشتر دور ریخته می‌شود (Tangestani *et al.*, 2011). این بقایا در کمتر از ۲۴ ساعت فاسد شده و بستر مناسبی را برای زمستان‌گذرانی قارچ مولد آفلاتوکسین (*آسپرژیلوس فلاوس*[1]) فراهم می‌کند که باعث آلودگی محصول پسته و کم ارزش شدن محصول پسته و در نهایت، باعث آلودگی زیست محیطی می‌شوند (Shakeri and Fazaeli, 2007). از کاربردهای پوست سبز پسته می‌توان به تولید اسانس، وجود ترکیبات پاداکسنده، مواد ضد قارچی و ضد میکروبی اشاره کرد (Aminian and Shaker Ardakani, 2008). گلی و همکاران (Goli *et al.*, 2005) گزارش کردند که پوست سبز پسته، درصد قابل توجهی ترکیبات فنولیک دارد. مقدار ترکیبات فنولیک رقم کله کوچی ۱۵/۳، فندقی۱۵/۶، فروتنی۱۸/۳، احمد آقایی ۳۱/۱ میلی گرم/گرم معادل گالیک اسید گزارش شده است (Rajaei *et al.*, 2010). تمام رقم-های پوست پسته به‌دلیل دارا بودن سطح قابل توجه ترکیبات فنولیک خاصیت پاداکسندگی (آزمون خاصیت ضدرادیکالی با دی فنیل پیکریل هیدرازیل (Diphenyl-1-Picrylhydazyl, DPPH) و ضدمیکروبی مناسبی دارند که در برخی از موارد حتی از بتاهیدروکسی تولوئن (2, 6-Di-Tert-Butyl-4-Methylphenol, BHT) آزمون خاصیت ضد رادیکالی با آزینوبیس اتیل بنزوتیازولین سولفونیک اسید (2,2, (Azinobis 3-Ethylbenzothiazolin-6-Solfonicacid, ABTS) بیشتر بود که طبق یافته‌های این پژوهش‌ها پوست سبز پسته می تواند به‌عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس ترکیبات فعال زیستی استفاده شود (Rajaei *et al.*, 2010).

پوست سبز پسته ساختمان پارانشیمی و فیبری دارد و در آن آب، مواد قندی، پروتئین، چربی، مواد معدنی، ویتامین‌ها، ترکیبات رنگی و ترپنی وجود دارد (Vahmani *et al.*, 2006). پوست سبز پسته حاوی ۴۴۲۵/۴۵Kcal/kg انرژی خام، ۳۲/۶۴ درصد ماده خشک، ۱۱/۲۴ درصد پروتئین خام، ۱۵/۳۸ درصد فیبر خام، ۱۲/۱۳ درصد خاکستر خام، ۵/۷۹ درصد چربی خام، ۱/۰۸ درصد کلسیم، ۰/۱۱ درصد فسفر، ۰/۳۱ درصد منیزیم، ۴/۴۴ درصد پتاسیم است غلظت عناصر آهن، منگنز، مس و روی به‌ترتیب برابر ۶۶۰/۶۸، ۲۳/۶، ۱۶/۲۳ و ۵/۲۷ میلی‌گرم در کیلوگرم است در پوست سبز پسته؛ مقادیر قابل توجهی آلفا پینن و آلفا ترپینولن، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک وجود دارد (Chahed *et al.*, 2007). منابع خوراکی غنی از ترکیبات فنولیک مجموعه‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیکی شامل پاداکسندگی (Rajaei *et al.*, 2010)، ضد میکروبی (Pereira *et al.*, 2007)، بازدارنده اکسایش لیپوپروتئین و تجمع پلاکت‌ها، فعالیت ضدالتهابی و تقویت سامانه ایمنی را دارند (Wang *et al.*, 1999). استفاده از عصاره پوست سبز پسته باعث بهبود عملکرد رشد جوجه گوشتی، لیپیدهای خونی و چربی بطنی شد (Yosefi *et al.*, 2018). استفاده از عصاره پوست سبز پسته در جیره آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث بهبود عملکرد رشد، افزایش عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفندی، کاهش لیپیدهای خونی و جمعیت میکروبی مجرای گوارشی جوجه-های گوشتی شد (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020).

از آن جایی که این محصول رطوبت بالا و فسادپذیری سریعی دارد و از طرفی، ماده ضدتغذیه‌ای تانن دارد، می‌توان با سیلو کردن، هم از فساد آن جلوگیری کرد و هم میزان تانن موجود در پوست پسته را تا ۳۴ درصد کاهش داد. غفاری و همکاران (Ghaffari *et al.*, 2014) گزارش کردند، محصولات جانبی فرآوری پسته می‌تواند بدون تداخل در تولید و ترکیب شیر بعنوان علوفه تا سطح ۳۰ درصد در جیره بزهای شیری استفاده شود. مطالعات علمی حاکی از آن است که سیلو نمودن و استفاده از افزودنی‌هایی مانند اوره، می‌توانند باعث بهبود ارزش تغذیه‌ای این پسماندها و محصولات فرعی شود (Ebrahimpour *et al.*, 2014). نوبخت (Nobakht, 2014) گزارش نمود، عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با سه درصد تفاله انگور فرآوری شده با اوره بالاترین درصد تخم‌گذاری و وزن تخم مرغ، توده تخم مرغ تولیدی مشاهده شد. با توجه به کمبود نهاده‌های دامی، توجه به استفاده از فرآورده‌های جانبی گیاهان به‌عنوان مواد خوراکی جدید و حاوی ترکیبات پاداکسنده و نیز کمبود اطلاعات در این زمینه؛ تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثرات استفاده از پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره بر صفات عملکرد رشد، شاخص‌های بیوشیمیایی خون، پاسخ ایمنی، ریخت شناسی روده جوجه‌های گوشتی اجرا شد.

1- *Aspergillus Flavus*

مواد و روش‌ها

پوست سبز پسته مورد آزمایش از ارقام پسته کله قوچی و از منطقه بم کرمان به‌مقدار ۴۰ کیلوگرم تهیه شد. به‌منظور فرآوری، ابتدا پوست سبز پسته توسط آسیاب با قطر منافذ پنج میلی‌متر خرد شد. سپس هر کیلو از پوست سبز با ۲۰ گرم اوره مخلوط شد، سپس با نسبت وزنی ۱:۱ پودر پوست سبز پسته و آب در کیسه‌های پلاستیکی (چند کیسه پلاستیکی داخل هم قرار گرفت تا از نفوذ احتمالی هوا جلوگیری شود) ریخته شد و پس از اطمینان کامل از عدم نفوذ هوا، کیسه‌های پلاستیکی به‌مدت ۶۰ روز سیلو شد (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020) تا محیط بی‌هوازی مناسبی برای فعالیت میکروبی و تجزیه تانن فراهم شود. نمونه‌های پوست سبز پسته فرآوری شده و نشده مورد تجزیه تقریبی قرار گرفت. میزان انرژی خام (کیلوکالری در کیلوگرم)، درصد ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر، فیبر نامحلول در شوینده خنثی و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی به‌روش انجمن ملی تجزیه شیمی (AOAC, 2005) تعیین شد.

در این آزمایش، از برنامه سه مرحله‌ای جیره آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی)، رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) استفاده شد. جیره‌ها بر اساس احتیاجات توصیه شده توسط شرکت راس و با استفاده از نرم‌افزار UFFDA تنظیم شدند و اندازه ذرات با توجه به سن جوجه‌ها، در سه مرحله تهیه جیره‌های آزمایشی تغییر داده شد (جداول ۲ و ۳).

تعداد هفت تیمار آزمایشی شامل شاهد، پوست سبز پسته کله قوچی در سه سطح (۱/۵، ۳ و ۵ درصد)، پوست سبز پسته کله قوچی فرآوری شده با اوره در سه سطح (۱/۵، ۳ و ۵ درصد) بودند که هر تیمار دارای چهار تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه جوجه بود، مجموعاً از ۲۸۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه راس ۳۰۸ استفاده شد. این طرح در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای اندازه-گیری صفات عملکردی، در روز اول، ۱۰، ۲۴ و ۴۲ جوجه‌ها توزین شدند تا میزان وزن بدن و افزایش وزن جوجه‌ها ثبت شود، برای رکوردبرداری مصرف خوراک ابتدا میزان خوراک توزیع شده در هر روز، وزن و سپس در روزهای ۱۰، ۲۴ و ۴۲ میزان مازاد مصرف خوراک جمع‌آوری و میزان مصرف خوراک مصرف شد و برای بازه-های زمانی فوق میزان ضریب تبدیل خوراک مصرف شد. شاخص تولید (PI) نیز برای دوره پایانی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد

(ضریب تبدیل خوراک×طول دوره پرورش)/ (درصد زنده مانی ×افزایش وزن به کیلوگرم) =PI

برای این منظور، در سنین ۲۴ و ۴۲ روزگی از هر واحد آزمایشی به‌طور تصادفی دو قطعه جوجه انتخاب شد که به‌ترتیب از ورید زیر بال و از طریق ورید وداج در حین کشتار نمونه‌ی خون جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و با دستگاه سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسما و سرم جدا شد. غلظت آلبومین، کلسترول، پروتئین، گلوکز، تری‌گلیسرید، HDL و LDL پلاسمای خون با استفاده از کیت‌های تشخیص کمّی شرکت پارس آزمون و دستگاه طیف‌سنجی نوری خودکار (اسپکتوفتومتر اتوآنالایزر) مدل جسان چم ۲۰۰ (Geasan chem 200, Italy) تعیین شد.

جدول ۱- ترکیبات پوست سبز پسته کله قوچی و پوست سبز پسته کله قوچی فرآوری شده با اوره

Table 1- The chemical composition of raw and urea-treated pistachio green hull

مواد مغذی Nutrients	واحد Unit	پوسته سبز پسته Pistachio green hull	پوسته سبز فرآوری شده با اوره Urea treted pistachio green hull
انرژی خام Gross Energy	kcal/kg	4069.33	4177.34
ماده خشک Dry matter	g/kg	95.04	45.06
پروتئین خام Crude protein	g/kg	12.90	19.94
چربی خام Ether extract	g/kg	7.38	5.67
خاکستر Ash	g/kg	12.12	12.60
فیبر نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	g/kg	54.11	26.49
فیبرنامحلول درشوینده اسیدی Acid detergent fiber	g/kg	17.08	15.24

جدول ۲- اجزای مواد خوراکی (%) جیره جوجه گوشتی حاوی پوست سبز پسته خام و فرآوری شده با اوره

Table 2- Ingredients (%) of the broiler chicken diets contained pistachio green hull

دوره Period	تیمار Treatment	دانه ذرت Corn grain	کنجاله سویا Soybean meal	پودر ماهی Fish meal	روغن Oil	پوست سبز پسته Pistachio	سنگ آهک Limestone	دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate (DCP)	نمک Salt	مکمل ویتامینه و معدنی Vit & min. premix[1]	دی-ال متیونین DL-methionine
آغازین Starter (1-10 days)	شاهد Control	53.05	37.70	3.42	2.00	0.00	1.44	1.51	0.25	0.50	0.13
	1.5% UPGH [۱]	51.78	37.18	3.75	2.00	1.50	1.44	1.52	0.21	0.50	0.12
	3% UPGH	50.51	36.85	3.87	2.00	3.00	1.44	1.51	0.20	0.50	0.12
	5% UPGH	49.82	35.50	3.95	2.00	5.00	1.40	1.51	0.20	0.50	0.12
	1.5% PGH	51.75	37.26	3.72	2.00	1.50	1.44	1.51	0.20	0.50	0.12
	3% PGH	50.55	36.83	3.85	2.00	3.00	1.44	1.51	0.20	0.50	0.12
	5% PGH	49.85	35.43	3.91	2.00	5.00	1.48	1.51	0.20	0.50	0.12
رشد Grower (11-24 days)	Control	58.45	34.80	0.00	3.00	0.00	1.49	1.46	0.30	0.50	0.00
	1.5% UPGH	57.13	34.82	0.00	2.97	1.50	1.39	1.49	0.20	0.50	0.00
	3% UPGH	54.66	34.90	0.00	3.86	3.00	1.34	1.54	0.20	0.50	0.00
	5% UPGH	52.40	34.97	0.00	4.53	5.00	1.30	1.10	0.20	0.50	0.00
	1.5% PGH	57.07	34.80	0.00	3.00	1.50	1.39	1.49	0.25	0.50	0.00
	3% PGH	54.76	34.85	0.00	3.85	3.00	1.34	1.50	0.20	0.50	0.00
	5% PGH	52.47	34.90	0.00	4.53	5.00	1.30	1.10	0.20	0.50	0.00
پایانی Finisher (25-42 days	Control	62.32	30.10	0.00	4.00	0.00	1.38	1.40	0.30	0.50	0.00
	1.5% UPGH	60.53	30.24	0.00	4.28	1.50	1.33	1.42	0.20	0.50	0.00
	3% UPGH	58.13	30.31	0.00	5.13	3.00	1.28	1.45	0.20	0.50	0.00
	5% UPGH	55.70	30.42	0.00	5.96	5.00	1.22	1.00	0.20	0.50	0.00
	1.5% PGH	60.55	30.19	0.00	4.31	1.50	1.33	1.42	0.20	0.50	0.00
	3% PGH	58.11	30.26	0.00	5.21	3.00	1.28	1.44	0.20	0.50	0.00
	5% PGH	55.85	30.35	0.00	6.00	5.00	1.10	1.00	0.20	0.50	0.00

[۱] PGH: پوست سبز پسته خام؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] هر کیلوگرم مکمل تأمین‌کننده ۳/۶ گرم ویتامین A؛ ۰/۳۶گرم ویتامین B1؛ ۱/۶۵ گرم ویتامین B2؛ ۲ گرم ویتامین B3؛ ۰/۶ گرم ویتامین B6؛ ۰/۳ گرم ویتامین B12؛ ۰/۸ گرم ویتامین D3؛ ۷/۲ گرم ویتامین E؛ ۰/۸ گرم ویتامین K3؛ ۰/۲۵ گرم ویتامین B9؛ ۶ گرم ویتامین B5؛ ۲ گرم ویتامین H؛ ۳۲ گرم اکسید منیزیم؛ ۵۰ گرم سولفات آهن؛ ۲۲ گرم اکسید روی؛ ۸ گرم اکسید مس؛ ۴ گرم سلنیوم؛ ۰/۳۲ گرم یدات سدیم؛ ۲۰۰گرم کولین کلراید و ۰/۲ گرم آنتی اکسیدانت

[1] PGH: Pistachio green hull; UPGH: urea-treated Pistachio green hull

[2] Supplied per Kg of permix: 3.6 g Vitamin A; 0.36 g Vitamin B1; 1.65 g Vitamin B2; 2 g Vitamin B3; 0.6 g Vitamin B6; 0.3 g Vitamin B12; 0.8 g Vitamin D3; 7.2 g Vitamin E; 0.8 g Vitamin K3; 0.25 g Vitamin B9; 6 g Vitamin B5; 2 g Vitamin H; 32 g MnO; 50 g $Fe_2(SO_4)_3$; 22 g ZnO; 8 g CuO; 4 g Selenium Permix; 0.32 g $NaIO_3$; 200 g Choline Chloride; 0.2 g Antioxidant

جدول ۳- ترکیب شیمیایی جیره‌های حاوی سطوح مختلف پوست سبز پسته خام و فرآوری شده با اوره در تغذیه جوجه گوشتی

Table 3- The chemical composition of the broiler chicken diets contained pistachio green hull

دوره Period	تیمار Treatment	انرژی سوخت و ساز Metabolizable energy (kcal/kg)	پروتئین خام Crude protein (%)	چربی خام Ether extract (%)	فیبر خام Crude fiber (%)	لیزین Lysine (%)	متیونین+ سیستئین Met+ cys (%)	کلسیم Calcium (%)	فسفر قابل دسترس Available phosphorus (%)
آغازین Starter (1-10 days)	Control	2990	23.05	2.26	3.87	1.13	0.92	1.05	0.52
	1.5% PGH [۱]	2992	23.02	2.28	3.87	1.13	0.92	1.04	0.52
	3% PGH	2993	23.00	2.29	3.91	1.12	0.92	1.05	0.52
	5% PGH	2888	23.00	2.30	3.98	1.12	0.92	1.05	0.52
	1.5% UPGH	2990	23.02	2.27	3.87	1.13	0.92	1.05	0.52
	3%UPGH	2994	23.00	2.28	3.90	1.14	0.92	1.04	0.52
	5%UPGH	2990	23.00	2.29	3.94	1.13	0.92	1.05	0.51
رشد Grower (11-24 days)	Control	3110	21.00	3.15	3.97	1.20	0.82	0.95	0.47
	1.5% PGH	3110	21.01	3.28	4.06	1.20	0.82	0.95	0.47
	3% PGH	3109	21.00	4.12	4.15	1.20	0.82	0.95	0.47
	5% PGH	3110	21.00	4.78	4.29	1.20	0.82	0.95	0.47
	1.5% UPGH	3108	21.00	3.56	3.97	1.20	0.82	0.95	0.47
	3%UPGH	3109	21.02	4.11	4.06	1.19	0.82	0.95	0.47
	5%UPGH	3110	21.03	4.72	4.15	1.20	0.82	0.95	0.47
پایانی Finisher (25-42 days)	Control	3200	18.52	4.53	3.65	1.01	0.76	0.85	0.42
	1.5% PGH	3195	18.50	4.64	3.75	1.01	0.76	0.85	0.42
	3% PGH	3195	18.50	5.24	3.83	1.01	0.76	0.85	0.42
	5% PGH	3195	18.50	6.25	3.99	1.01	0.76	0.85	0.42
	1.5% UPGH	3195	18.50	4.52	3.72	1.01	0.76	0.85	0.42
	3%UPGH	3195	18.51	5.73	3.79	1.01	0.76	0.85	0.42
	5%UPGH	3195	18.52	6.55	3.90	1.01	0.76	0.85	0.42

[۱] PGH: پوست سبز پسته خام؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[1] PGH: Pistachio green hull; UPGH: urea-treated Pistachio green hull

ریخت‌شناسی روده: پس از کشتار در ۴۲ روزگی، دو قطعه جوجه از هرتکرار، یک سانتیمتر از قسمت میانی ژژنوم روده باریک جدا و توسط سرم فیزیولوژی نه درصد شستشو و جهت تثبیت بافت، نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت اولیه، محلول فرمالین تعویض و تا زمان انجام آزمایش در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها برای تهیه برش و اندازه‌گیری شاخص‌های بافت شناسی به آزمایشگاه منتقل شد. برای بررسی بافت‌های تهیه شده، از میکروسکوپ نوری متصل به کامپیوتر استفاده شد. سپس با کمک دوربین نصب شده روی میکروسکوپ عکس‌هایی از محل مناسب تهیه و با استفاده از نرم‌افزار مربوطه، ارتفاع ویلی (از نوک ویلی تا محل اتصال کریپت)، عرض ویلی، عمق کریپت به‌روش (Laudadio *et al.*, 2012) محاسبه شد.

پاسخ ایمنی: به‌منظور تعیین میزان عیار پادتن تام علیه گلبول قرمز گوسفند به سیاهرگ زیر بالی در ۱۸ و ۳۵ روزگی به‌ترتیب تزریق یک میلی‌لیتر سوسپانسیون ۱۰و ۱۵ درصد گلبول قرمز گوسفند (SRBC[۱]) به سه قطعه جوجه از هرتکرار تزریق شد. هفت روز بعد از سیاهرگ بال جوجه‌ها با استفاده از سرنگ پنج میلی لیتری خون‌گیری به‌عمل آمد، از هر پن دو جوجه در ۴۲ روزگی به‌صورت تصادفی خون‌گیری شد و سرم آن برای تعیین عیار پادتن تام و ایمونوگلوبین G و M بر ضد SRBC به‌روش هموگلوتیناسیون استفاده شد (Hosseini-Vashan *et al.*, 2012).

تجزیه آماری: داده‌ها پس از بررسی نرمال بودن توسط نرم‌افزار آماری SAS (۹/۱) و رویه خطی عمومی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند، مدل آماری مورد استفاده به‌شرح ذیل بود. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمونه توکی کرامر در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد و برای بررسی اثر فرآوری، از آزمونه مستقل اورتوگنال استفاده شد و اثر فرآوری در برابر خام با هم مقایسه شد (P <۰/۰۵).

$$Y_{ijk}= \mu+A_i+ e_{ij} \quad \text{معادله (۱)}$$

که در آن، Y_{ijk}: مقدار هر مشاهده؛ μ: میانگین جمعیت؛ A_i: اثر جیره آزمایشی و e_{ij}: اثر خطای آزمایش می‌باشند.

2- Sheep Red Blood Cells

نتایج و بحث

عملکرد رشد: نتایج مربوط به اثر پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده بر شاخص‌های عملکرد رشد شامل مصرف خوراک، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی در جدول ۴ ارائه شده است. افزودن سطح پنج درصد پوست سبز پسته کله قوچی فرآوری شده در دوره آغازین، رشد و کل دوره باعث کاهش مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک نسبت به شاهد شد ($P<0.05$) هر چند وزن بدن جوجه‌ها در هیچ یک از دوره‌ها تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. صفات عملکرد رشد شامل مصرف خوراک، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی بین پوست سبز پسته خام و فرآوری شده اختلافی نشان نداد.

کاهش مصرف خوراک در هنگام تغذیه با پوست پسته احتمالاً به‌دلیل وجود ترکیبات فنلی و تانن باشد، جیره‌های حاوی تانن به‌دلیل مزه قابض تانن عموماً سبب کاهش مصرف خوراک می‌شوند (Provenza, 1996). افزایش مصرف خوراک در پرندگان تغذیه شده با جیره رقیق شده با سلولز به‌عنوان منبع فیبر نامحلول، در نتیجه تخلیه سریع‌تر خوراک از دستگاه گوارش است (Hetland and Sevihus, 2001). از طرفی، استفاده از منابع فیبر نامحلول شامل پوسته یولاف، پوسته برنج و پوسته آفتابگردان در جیره جوجه گوشتی موجب بهبود افزایش وزن روزانه و ضریب‌تبدیل خوراک در جیره‌های با درصد فیبر پایین شد (Jiménez-Moreno *et al.*, 2016; Salarinia *et al.*, 2020). استفاده از فیبر نامحلول در جیره نیمچه تخم‌گذار لوهمن از یک روزگی تا پنج هفتگی باعث افزایش میانگین وزن روزانه و میانگین خوراک مصرفی شد. بهبود افزایش وزن بدن و ضریب‌تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی سلولز گزارش شده است (Salarinia *et al.*, 2020).

از طرفی، یوسفی و همکاران (Yosefi *et al.*, 2018) گزارش کردند عصاره آبی پوست پسته در سطوح مختلف بر مصرف خوراک و وزن بدن جوجه گوشتی اثر نداشت که این تفاوت به‌دلیل استفاده از عصاره پوست پسته بود، ولی در مطالعه حاضر از پودر پوست پسته استفاده شد که ماهیت مطالعه با هم متفاوت است. طی تحقیقاتی پودر پوست انار ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی را در دوره پایانی بهبود می‌بخشید (Rezvani *et al.*, 2016). شاخص تولید در جوجه‌-های تغذیه شده با پوست سبز پسته نسبت به شاهد افزایش یافت ($P=0.022$) هر چند بین تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته خام و فرآوری شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعات پیشین گزارش شده است، پودر سبز پسته و پوست انار به‌دلیل داشتن فیبر و تانن بالا، باعث کاهش مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه از طریق افزایش گوارش‌پذیری مواد مغذی می‌شوند، ولی استفاده از پودر پوست انار فرآوری شده با اوره به‌دلیل کاهش درصد فیبر خام و تانن، در سطوح ۱/۵ تا ۵ درصد پوست انار باعث بهبود مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه شد (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020). این مواد خوراکی به‌دلیل داشتن ترکیبات با خاصیت پاداکسندگی، زمینه را برای بهبود گوارش و جذب مواد مغذی و نهایتاً افزایش راندمان مواد خوراکی و افزایش وزن بیشتر فراهم می‌نمایند.

درصد زنده‌مانی: اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد زنده‌مانی جوجه‌های گوشتی، طی دوره پرورش در جدول ۵ آورده شده است. اگر چه افزودن سه درصد پوست پسته سبز پسته فرآوری شده به جیره جوجه گوشتی موجب زنده‌مانی ۱۰۰ درصد نسبت به سایر تیمارها در سه دوره پرورش شد، امّا افزودن سطوح مختلف پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده به جیره پایه بر درصد زنده‌مانی جوجه‌های گوشتی در کل دوره پرورش تأثیر معنی‌داری نداشت. همچنین درصد زنده‌مانی جوجه‌های گوشتی بین پوست سبز پسته خام و فرآوری شده با اوره اختلافی نشان نداد. در مرگ و میر جوجه‌ها عوامل بسیار متعددی شامل بیماری‌ها، مشکلات روده‌ای و آب آوردگی بطنی و تنش‌های گوناگون نقش دارند و با توجه به اینکه برخی تنش‌های محیطی مثل تنش حرارتی در صورتی باعث افزایش تلفات می‌شوند که با یک یا چند عامل تنش‌زای دیگر، مثل ابتلا به برخی بیماری‌ها مانند نیوکاسل همراه شده و توانایی پرنده برای سازگاری با محیط کاهش یابد (North and Bell, 1990).

اجزای لاشه: اثر جیره‌های آزمایشی بر درصد وزن نسبی اجزای لاشه (وزن زنده) در سن ۴۲ روزگی، در جدول ۶ ارائه شده است. افزودن سطح سه درصد پوست پسته کله قوچی خام و فرآوری شده به جیره پایه جوجه‌های گوشتی بر وزن نسبی سینه نسبت به شاهد اثر گذاشت ($P<0.05$). اگرچه سطوح مختلف جیره آزمایشی باعث افزایش عددی درصد وزن نسبی لاشه و ران نسبت به شاهد شد ($P>0.05$). تیمارهای مختلف آزمایشی تأثیری بر وزن نسبی پیش معده، پانکراس، صفرا، سنگدان و کبد در پایان ۴۲ روزگی نداشتند. اگرچه سطح سه درصد پوست سبز پسته کله قوچی خام موجب افزایش عددی وزن نسبی سنگدان نسبت به سایر تیمارها شد، امّا از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. سطوح مختلف تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد موجب کاهش درصد چربی بطنی شد ($P<0.05$).

سطح پنج درصد پوست سبز پسته کله قوچی خام باعث افزایش وزن نسبی قلب نسبت به شاهد شد ($P<0.05$). صفات اجزای لاشه بین تیمارهای حاوی پوست سبز پسته خام با فرآوری شده اختلافی نشان نداد به‌جز در مورد درصد چربی بطنی که در تیمارهای حاوی پوست سبز پسته خام در مقایسه با تیمارهای حاوی پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره پایین‌تر بود.

جدول ٤- مقایسه میانگین شاخص‌های عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 4- Comparison the mean of growth performance indices in broilers fed diets contained pistachio green hull

صفات Traits	دوره Period (days)	شاهد Control	۱/۵ درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH [1]	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز پسته خام 3% PGH	پنج درصد پوست سبز پسته خام5% PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی- داری P-value	سطح معنی‌داری فرآوری P-value [2] processed
افزایش وزن Body weight gain (g/bird)	0-10	158.43	176.60	178.55	157.33	171.65	171.35	166.08	7.080	0.0884	0.8409
	11-24	626.76	638.54	627.08	604.15	658.44	627.12	642.13	25.744	0.8531	0.4098
	25-42	1103.17	1212.90	1294.03	1148.88	1207.8	1279.8	1194.7	65.303	0.4150	0.8703
	0-42	1921.7	2071.3	2143.2	1953.5	2081.3	2121.4	2046.1	70.925	0.2766	0.8465
مصرف خوراک Feed intake (g/bird)	0-10	203.72^{ab}	208.12^{a}	211.00^{a}	185.77^{c}	194.24^{bc}	191.22^{bc}	209.30^{a}	4.692	0.0043	0.3882
	11-24	1100.2^{a}	964.97^{bc}	1016.3^{abc}	937.77^{c}	995.93^{bc}	1025.7^{abc}	1056.4^{ab}	34.410	0.0536	0.0733
	25-42	2061.5	2019.1	2011.4	1783.9	1995.1	1982.9	1985.6	65.93	0.1409	0.3660
	0-42	3365.4^{a}	3192.3^{ab}	3238.8^{a}	2907.4^{b}	3185.3^{ab}	3199.8^{a}	3251.3^{a}	79.164	0.0244	0.1393
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio	0-10	1.37^{a}	1.18^{b}	1.20^{b}	1.18^{b}	1.13^{b}	1.12^{b}	1.26^{ab}	0.051	0.0319	0.6652
	11-24	1.78	1..51	1.62	1.55	1.51	1.63	1.64	0.071	0.1614	0.5855
	25-42	1.88	1.67	1.55	1.57	1.66	1.57	1.67	0.092	0.2102	0.5958
	0-42	1.75^{a}	1.54^{b}	1.51^{b}	1.49^{b}	1.53^{b}	1.51^{b}	1.59^{ab}	0.054	0.0366	0.4758
شاخص تولید Production index	0-42	41.51^{b}	55.08^{a}	59.61^{a}	48.18^{ab}	52.85^{a}	56.06^{a}	51.35^{a}	3.482	0.0022	0.0821

[۱] PGH: پوست سبز پسته خام؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته خام و پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۳] اشتباه معیار میانگین

[a,b] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

[1] PGH: pistachio green hull; UPGH: urea-treated pistachio green hull

[2] The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated pistachio green hull

[3] SEM: Standard error of means.

[a,b] Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$).

جدول ۵- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته خام و فرآوری شده

Table 5- Comparison the mean of livability index in broilers fed diets contained pistachio green hull

دوره Period (days)	شاهد Control	۱/۵ درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH [1]	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز 3%پسته خام PGH	پنج درصد پوست سبز 5%پسته خام PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی-داری P-Value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value [۲] processed
0-10 days	100.0	100.0	100.0	97.5	100.0	95.00	100.0	1.44	0.1362	0.5798
11-24 days	100.0	97.5	100.0	97.5	100.0	95.0	97.5	1.34	0.5577	0.6305
25-42 days	90.0	97.5	100.0	87.5	92.5	95.0	95.0	2.73	0.0598	0.2351

[۱] PGH: پوست سبز پسته؛UPGH : پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

[۳] اشتباه معیار میانگین

[a,b] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

[1] PGH: Pistachio green hull; UPGH: urea-treated Pistachio green hull

[2] The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated Pistachio green hull

[3] SEM: Standard error of means

[a,b] Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

در آزمایشی افزودن عصاره آبی پوست سبز پسته به جیره بر وزن نسبی اجزای لاشه و اندام‌های گوارشی جوجه‌های گوشتی تأثیری مشاهده نشد (Yosefi *et al.*, 2018). صادقی و نوبخت (Sadeghi and Noakht, 2016) گزارش کردند استفاده از تفاله لیمو، انگور و سیب به‌عنوان ترکیبات پاداکسنده در جیره جوجه‌های گوشتی موجب افزایش وزن نسبی لاشه و سینه در مقایسه با شاهد شد. در آزمایشی دیگر، افزودن پودر گل راعی (حاوی ترکیبات فنلی) به جیره بر وزن نسبی اجزای لاشه جوجه‌های گوشتی تأثیری نداشت (Landy *et al.*, 2012). حسینی واشان و همکاران (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020) نیز نشان دادند افزودن پوست انار فرآوری شده با اوره و عصاره پوست انار به جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش، بر میانگین وزن نسبی سنگدان، پانکراس و کبد در تیمارهای آزمایشی و شاهد تأثیری نداشت، ولی باعث افزایش وزن نسبی سینه شد. کاهش وزن نسبی چربی بطنی در تیمارهای آزمایشی می‌تواند به‌دلیل افزایش سرعت عبور مواد مغذی در روده در اثر فیبری شدن جیره‌ها و افزایش دفع صفرا و مصرف قسمتی از چربی جذب شده در باز تولید صفرا شود (North and Bell, 1990).

اندام‌های لنفاوی: داده‌های مربوط به وزن نسبی بورس، طحال و عیار ایمنوگلوبولین های M، G و عیار پادتن تام علیه گلبول قرمز گوسفندی (SRBC) در ۴۲ روزگی در جدول ۷ آورده شده است. سطوح مختلف پوست پسته کله قوچی خام و فرآوری شده از لحاظ آماری تأثیری بر وزن نسبی طحال نداشت. ولی جیره‌های حاوی پوست پسته وزن نسبی بورس فابرسیوس را نسبت به شاهد افزایش دادند ($P<۰/۰۵$). افزودن پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده به جیره پایه بر عیار پادتن تام علیه گلبول‌قرمز گوسفند و عیار پادتن بر ضد ایمنوگلوبولین G در ۴۲ روزگی نسبت به شاهد اثر گذاشت ($P<۰/۰۵$). در حالی‌که عیار پادتن تام علیه گلبول‌قرمز در ۴۲ روزگی با افزودن سه و پنج درصد پوست سبز پسته کله قوچی فرآوری شده به جیره پایه نسبت به شاهد افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). شاخص‌های ایمنی شامل وزن نسبی اندام‌های لنفاوی و عیارپادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفندی در تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته خام در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته فرآوری شده اختلافی نشان نداد به‌جز عیار ایمنوگلوبین G بر ضد SRBC که در تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته فرآوری شده در مقایسه با خام بالاتر بود.

یوسفی و همکاران (Yosefi *et al.*, 2018) گزارش کردند افزودن سطوح مختلف عصاره آبی پوست پسته کله قوچی بر اندام‌های لنفاوی و عیار پادتن تام علیه گلبول‌قرمز گوسفند، عیار پادتن بر ضد ایمنوگلوبولین M و عیار پادتن بر ضد ایمنوگلوبولینG اثر نداشت که با یافته‌های حاضر مطابقت ندارد. در تحقیقات دیگری که از گیاهان دارویی در جیره طیور استفاده شده بود (درمنه که حاوی ترکیبات فنلی بوده و دارای خاصیت پاداکسیدانی است و پونه که حاوی تانن است) نیز کاهش وزن اندام لنفاوی گزارش شد (Rezvani *et al.*, 2016).

مارزو و همکاران (Marzo *et al.*, 2002) بیان کردند تانن‌ها بر جذب قند و اسیدآمینه در روده اثر می گذارند. قابلیت دسترسی اسیدهای آمینه در جیره‌های حاوی تانن، کاهش می‌یابد که منجر به کاهش سنتز پروتئین در بافت‌های لنفاوی می‌شود. رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون چربی، باعث کاهش کارایی سامانه ایمنی هومورال می‌شود (Purreza *et al.*, 2005). احتمالاً یکی از دلایل افزایش میزان پاسخ ثانویه ایمنی ضد SRBC در تیمارهای آزمایشی حاوی پوست سبز پسته کله قوچی خام و فرآوری شده در مقایسه با گروه شاهد، کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون چربی‌ها است.

ریخت شناسی روده باریک: جدول ۸ تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی بر طول نسبی دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و ریخت-شناسی روده در جوجه‌های گوشتی را نشان می‌دهد. هیچ یک از تیمارهای مختلف آزمایشی بر طول دوازدهه، ژژنوم و ایلئوم جوجه‌ها در پایان ۴۲ روزگی تأثیری نداشتند. اگرچه پوست سبز پسته خام و فرآوری شده باعث افزایش عددی طول روده نسبت به شاهد شده است، امّا از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. افزودن سطوح مختلف پوست پسته کله قوچی خام و فرآوری شده به جیره پایه موجب افزایش ارتفاع پرز و عمق کریپت نسبت به شاهد شد ($P<۰/۰۵$). تیمارهای آزمایشی موجب کاهش عرض پرز ژژنوم نسبت به شاهد شد ($P<۰/۰۵$). جیره‌های آزمایشی بر نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت ژژنوم روده جوجه‌ها اثر نداشت. افزودن سه درصد پوست پسته کله قوچی خام و سه درصد پوست پسته کله قوچی فرآوری شده باعث بیشترین افزایش طول و کاهش عرض پرزها نسبت به دیگر سطوح در ژژنوم شد.

جدول ٦– مقایسه میانگین وزن نسبی اجزای لاشه (درصدی از وزن زنده) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 6- Comparison the mean of relative weight of carcass organs (percentages of live weight) in broilers fed diets contained pistachio green hull

دوره Period (days)	شاهد Control	۱/۵درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز 3%پسته خام PGH	پنج درصد پوست سبز 5%پسته خام PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی- داری P-Value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value [۲] processed
لاشه Carcass	61.49	63.50	63.20	61.57	63.48	63.80	62.99	0.687	0.1019	0.2846
سینه Breast	20.24^{c}	21.12^{abc}	21.56^{ab}	19.93^{c}	21.57^{ab}	22.32^{a}	20.32^{bc}	0.455	0.0043	0.5686
ران Thigh and drumestic	19.14	20.08	19.50	19.65	19.57	19.57	19.17	0.360	0.4272	0.1586
قلب Heart	0.51^{d}	0.58^{abcd}	0.54^{bcd}	0.60^{ab}	0.58^{abc}	0.52^{cd}	0.61^{a}	0.022	0.0157	0.7911
پانکراس Pancrease	0.23	0.24	0.23	0.23	0.26	0.23	0.26	0.020	0.7690	0.3319
کبد Liver	2.47	2.47	2.26	2.31	2.30	2.29	2.45	0.136	0.8188	0.9917
پیش معده Proventriculus	0.42	0.46	0.44	0.46	0.44	0.47	0.43	0.025	0.8348	0.6592
سنگدان Gizard	1.69	1.90	2.04	1.91	2.01	1.82	1.85	0.104	0.3046	0.5561
کیسه صفرا Gall blader	0.14	0.12	0.12	0.15	0.13	0.13	0.12	0.019	0.9224	0.8532
چربی بطنی Abdominal fat	2.05^{a}	1.30^{b}	1.31^{b}	1.31^{b}	1.51^{b}	1.53^{b}	1.62^{b}	0.135	0.0029	0.0295

[۱] PGH: پوست سبز پسته؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

[۳] اشتباه معیار میانگین

[a,b] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

[1] PGH: Pistachio green hull; UPGH: urea-treated Pistachio green hull

[2] The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated Pistachio green hull

[3] SEM: Standard error of means

[a,b] Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

جدول ۷– مقایسه میانگین وزن نسبی اندام‌های لنفاوی (درصدی از وزن زنده) و عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفندی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 7- Comparison the mean of relative weight of lymphoid organs (percentages of live weight) and antibody titer against sheep red blood cells in broilers fed diets contained pistachio green hull

دوره Period (days)	شاهد Control	۱/۵درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH [۱]	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز 3% پسته خام PGH	پنج درصد پوست سبز 5% پسته خام PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی-داری P-value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value [۲] processed
طحال Spleen	0.13	0.18	0.18	0.19	0.20	0.21	0.21	0.018	0.0620	0.1424
بورس Bursa of fabricus	0.11^{b}	0.15^{ab}	0.19^{a}	0.18^{a}	0.18^{a}	0.17^{a}	0.18^{a}	0.014	0.0096	0.9722
پادتن تام بر ضد گلبول گوسفندی Total antibody against SRBC	4.50^{b}	5.75^{ab}	5.25^{ab}	5.75^{ab}	5.75^{ab}	6.25^{a}	6.25^{a}	0.370	0.0411	0.1128
ایمنوگلوبین G IgG against SRBC	2.25^{b}	2.25^{b}	2.75^{ab}	3.00^{ab}	3.75^{a}	3.25^{ab}	3.50^{ab}	0.322	0.0194	0.0048
ایمنوگلوبین M IgM against SRBC	2.25	3.50	2.50	2.75	2.00	3.00	2.75	0.439	0.3166	0.3639

[۱] PGH: پوست سبز پسته؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

[a,b] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

[1] PGH: pistachio green hull; UPGH: urea-treated pistachio green hull

[2] The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated pistachio green hull

[3] SEM: Standard error of means

[a,b] Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

جدول ۸– مقایسه میانگین طول نسبی روده باریک (سانتی‌متر بر کیلوگرم) و ریخت‌شناسی ژژنوم (میکرومتر) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 8- Comparison the mean of relative lenght of small intestine (cm/kg) and jejenal morphology (µm) in broilers fed diets contained pistachio green hull

صفات Traits	شاهد Control	۱/۵درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز پسته خام 3% PGH	پنج درصد پوست سبز پسته خام 5% PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی-داری P-Value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value[۲] processed
دوازدهه Dedenum	15.32	16.71	16.98	18.70	16.35	17.25	16.73	0.859	0.2305	0.1026
ژژنوم Jejenum	37.72	41.34	40.80	44.87	38.27	38.45	40.19	2.223	0.3080	0.0952
ایلئوم Illeum	27.68	32.93	28.12	31.36	32.21	30.25	30.45	1.726	0.5627	0.3218
ارتفاع پرز Villus height	1055.42^{c}	1266.46^{b}	1397.71^{ab}	1392.92^{ab}	1357.3^{ab}	1401.7^{ab}	1466.7^{a}	30.888	0.0001	0.0370
عرض پرز Villus width	177.08^{a}	115.21^{b}	132.29^{ab}	140.2^{ab}	162.29^{ab}	138.54^{ab}	142.7^{ab}	11.609	0.0275	0.0630
عمق کریپت Crypt depth	156.98	192.50^{ab}	214.79^{a}	199.38^{ab}	206.04^{ab}	197.92^{ab}	213.75^{a}	12.045	0.0450	0.7120
نسبت ارتفاع به عمق Villus height: crypt depth	6.74	6.58	6.61	6.99	6.63	7.32	7.22	0.477	0.8619	0.4053

[۱] PGH: پوست سبز پسته؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[۲] مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

[۳] اشتباه معیار میانگین

[a,b] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

[1] PGH: pistachio green hull; UPGH: urea-treated pistachio green hull

[2] The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated pistachio green hull

[3] SEM: Standard error of means

[a,b] Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های آمره و همکاران (Amerah et al., 2009) مبنی بر اینکه طول روده باریک در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با فیبر از گروه شاهد بیشتر بود، همخوانی ندارد. حسینی واشان و همکاران (Hosseini-Vashan et al., 2020) گزارش کردند با افزودن سطح سه درصد پوست انار فرآوری شده با اوره بیشترین، ارتفاع پرز وکمترین عرض پرز در مقایسه با شاهد را داشته است. در آزمایش دیگری، پژوهشگران بیان کردند که محصولات انگور که غنی از ترکیبات پلی‌فنل هستند باعث بهبود ارتفاع پرز و سطح جذب می‌شوند و میکروفلور روده و تنوع زیستی باکتری‌های روده‌ای را در جوجه‌های گوشتی افزایش می‌دهد (Viveros et al., 2011). گل‌محمدی و نوبخت (Golmohammadi and Nobakht, 2016) با استفاده از تفاله لیموترش در جیره جوجه‌های گوشتی گزارش کردند که طول و عمق پرزهای روده تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت که احتمالاً به‌دلیل تفاوت اجزای تشکیل‌دهنده گیاهان دارویی مورد استفاده و ترکیبات متفاوت پوست سبز پسته کله قوچی باشد. نتایج مشابهی در خصوص تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از فیبر در جیره جوجه‌گوشتی گزارش شده است (Salarinia et al., 2020). در اکثر موارد بین افزایش سطح فرآوری شده در جیره با ارتفاع پرز و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت رابطه خطی افزایشی وجود داشت، درحالی‌که این روند بین سطوح فیبر فرآوری شده در جیره با عمق کریپت کاهش خطی نشان داد.

لیپیدهای خون: داده‌های مرتبط با غلظت لیپیدهای خونی در جدول ۹ ارائه شده است. جیره‌های آزمایشی غلظت کلسترول سرم خون و LDL را تحت تأثیر قراردادند (P<۰/۰۵) و بر سایر شاخص‌های سرم خون تأثیری نداشتند. کمترین غلظت کلسترول خون و LDL در تیمار حاوی پنج درصد پوست سبز پسته کله قوچی خام مشاهده شد. اگرچه سطوح مختلف پوسته پسته کله قوچی و فرآوری آن موجب افزایش عددی HDL نسبت به شاهد شد (P>۰/۰۵). پوست پسته کله قوچی خام و فرآوری شده باعث کاهش عددی غلظت تری‌گلیسرید و vLDL نسبت به شاهد شد. در تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته خام در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته فرآوری شده اختلافی در شاخص‌های لیپیدی خون مشاهده نشد. طی مطالعه‌ای محققین نشان دادند افزودن سطوح مختلف عصاره آبی پوست پسته کله قوچی موجب کاهش کلسترول، کاهش عددی LDL و افزایش HDL شد (Yosefi et al., 2018). تغذیه محصولات فرعی پسته به گوسفندان، تأثیری بر شاخص‌های خونی نداشت (Valizadeh et al., 2010). مختارپور و همکاران (Mokhtarpour et al., 2010) طی آزمایشی گزارش کردند که تغذیه سیلاژ پوست پسته عمل‌آوری شده با اوره و پلی اتیلن گلیکول به گاوهای شیری هلشتاین، هیچ یک از شاخص‌های خون از جمله گلوکز، نیتروژن اوره‌ای، کلسترول و پروتئین پلاسمای خون تحت تأثیر قرار نگرفت.

بهلولی و همکاران (Bohluli et al., 2010) نیز نشان دادند که ضایعات پوست پسته شاخص‌های خونی را در گاوهای شیری تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. ترکیبات فنلی بعد از جذب، وارد سامانه گردش خون می‌گردند و افزایش میزان آن‌ها در خون، سبب محافظت لیپیدهای سرم در برابر اکسایش می‌شود (Manach et al., 2004). ویتامین E کیورسین (به‌عنوان یک ترکیب فنلی) سبب کاهش میزان اکسایش LDL و HDL سرم می‌گردد. نحوه عمل آن‌ها از طریق اتصال این لیپیدها با ترکیب‌های فنلی است (Han et al., 2007). بنابراین، پوست سبز پسته کله قوچی و پوست سبز پسته کله قوچی فرآوری شده با اوره به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات پلی فنلی می‌توانند در جهت تغییر غلظت لیپیدهای خونی مؤثر باشد. مکانیسم‌های فعال در سوخت و ساز لیپیدها در دستگاه گوارش نقش مهمی در غلظت لیپیدهای خونی دارد. لذا کاهش شاخص کلسترول سبب افزایش لیپوپروتئین‌ها با وزن ملکولی بالا و کاهش لیپوپروتئین‌ها با وزن مولکولی کم در سرم می‌شود. کاهش در غلظت کل کلسترول و افزایش در لیپوپروتئین‌ها با وزن مولکولی بالا احتمالاً بخاطر انتقال معکوس افزایش یافته کلسترول در پاسخ به اتلاف روده‌ای چربی جیره‌ای است. همچنین فیبر سویا لیپوپروتئین‌ها با وزن مولکولی کم و کلسترول کل را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد (Wang et al., 1999) این یافته‌ها با نتایج آزمایش ما مطابقت دارد. اثر فیبرهای جیره‌ای به‌شکل کاهش غلظت تری‌گلیسرید توسط تیمار حاوی پنج درصد پوست سبز پسته خام مشخص است که می‌تواند به‌خاطر کاهش جذب تری‌گلیسرید باشد.

گلوکز و پروتئین تام: غلظت پروتئین تام، گلوکز، آلبومین و آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در جدول ۱۰ نشان داده شده است. جیره‌های آزمایشی روی غلظت آلبومین، غلظت سرمی گلوکز خون و پروتئین تام تأثیر معنی‌داری نداشت. بیشترین غلظت سرمی آلبومین مربوط به سطح سه درصد پوست سبز پسته کله قوچی خام است که از لحاظ عددی از شاهد بالاتر بود، اگر چه سطوح مختلف باعث کاهش عددی میزان غلظت سرمی گلوکز نسبت به شاهد شد (P>۰/۰۵). در تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته خام در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با پوست سبز پسته فرآوری شده اختلافی در شاخص‌های بیوشیمیایی خون مشاهده نشد. یوسفی و همکاران (Yosefi et al., 2018) گزارش کردند سطوح مختلف عصاره آبی پوست سبز پسته اثری بر شاخص‌های خونی جوجه گوشتی نداشت. از طرفی، حسینی واشان و همکاران (Hosseini-Vashan et al., 2020) نشان دادند، افزودن سطوح مختلف پوست و عصاره انار تأثیر معنی‌داری بر پروتئین تام و گلوکز نداشت که با نتایج حاضر مطابقت دارد.

جدول ۹: مقایسه میانگین غلظت لیپیدهای خون جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 9. Comparison the mean of blood lipids concentration (mg/dl) in broilers fed diets contained pistachio green hull

صفات Traits	شاهد Control	۱/۵درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH	۳درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	۵درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز 1.5%PGHپسته خام	۳ درصد پوست سبز 3%پسته خام PGH	۵درصد پوست سبز 5%پسته خام PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی‌داری P-Value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value** processed
تری‌گلیسرید Triglyceride	54.67	47.55	63.67	42.60	48.42	56.55	55.40	6.731	0.4060	0.6459
کلسترول Cholesterol	153.3 ^{a}	150.42 ^{ab}	160.57 ^{a}	128.92 ^{c}	149.70 ^{ab}	146.60 ^{ab}	134.22 ^{bc}	5.747	0.0117	0.5116
LDL***	84.74 ^{a}	68.62 ^{ab}	70.97 ^{ab}	50.63 ^{b}	63.24 ^{ab}	69.74 ^{ab}	50.02 ^{b}	7.619	0.0505	0.7031
HDL	57.65	72.30	76.87	69.77	76.77	65.55	73.12	4.662	0.0904	0.7623
VLDL	10.93	9.51	12.73	8.52	9.68	11.26	11.08	1.346	0.4062	0.6952

*PGH: پوست سبز پسته؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

**مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

***LDL لیپوپروتئین کم چگال؛ VLDL لیپوپروتئین خیلی کم چگال؛ HDL لیپوپروتئین پر چگال؛

a-b میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

*PGH: Pistachio green hull; UPGH: urea-treated Pistachio green hull

** The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated Pistachio green hull

*** LDL: Low density Lipoprotein; VLDL: very Low density Lipoprotein; HDL: High density Lipoprotein;

[1]SEM: Standard error of means

a-b Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

جدول ۱۰- مقایسه میانگین غلظت پروتئین و قند خون (گرم بر دسی‌لیتر) و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (واحد در لیتر) جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی پوست سبز پسته

Table 10- Comparison the mean of blood proteins and glucose (g/dl) concentration and enzyme activity of aspartate aminotransferase (U/l) in broilers fed diets contained pistachio green hull

صفات Traits	شاهد Control	۱/۵درصد پوست سبز بسته فرآوری شده با اوره 1.5%UPGH	سه درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره 3%UPGH	پنج درصد پوست سبز پسته‌فرآوری شده با اوره5%UPGH	۱/۵ درصد پوست سبز پسته خام 1.5%PGH	سه درصد پوست سبز پسته خام 3% PGH	پنج درصد پوست سبز 5%پسته خام PGH	اشتباه معیار میانگین SEM	سطح معنی-داری P-value	سطح معنی‌داری فرآوری P-Value [۲] processed
گلوکز Glucose	208.40	226.10	235.9	267.40	240.4	221.6	230.5	94.026	0.4846	0.3153
پروتئین تام Total protein	3.39	3.83	3.74	3.74	3.94	3.66	3.86	0.245	0.5504	0.7151
آلبومین Albumin	1.57	1.66	1.90	1.65	1.65	1.57	1.86	0.187	0.7985	0.8047
آسپارتات آمینوترانسفراز Aspartate aminotransferase	216.96	274.40	259.15	205.62	244.53	223.12	274.40	28.082	0.4577	0.9014

[1]PGH: پوست سبز پسته؛ UPGH: پوست سبز پسته فرآوری شده با اوره

[2]مقایسات اورتوگنال میان پوست سبزپسته و پوست سبز فرآوری شده با اوره

[a-b3] میانگین‌های با حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است.

1PGH: pistachio green hull; UPGH: urea-treated pistachio green hull
[2]The orthogonal comparison of raw pistachio green hull and urea-treated pistachio green hull
[3]SEM: Standard error of means
[4]Means with different letters in a row differ significantly ($P<0.05$)

در ۴۲ روزگی میزان فعالیت AST در میان گروه‌های آزمایشی نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. حسینی واشان و همکاران (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020) گزارش کردند با افزودن عصاره پوست انار اثر معنی‌داری بر آنزیم AST مشاهده نشد. افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های AST و ALT نشان‌دهنده افزایش میزان صدمات کبدی است (Saleh *et al.*, 2015). ترکیبات پلی فنلی پوست پسته احتمالاً سبب افزایش میزان آلبومین سرم در خون می‌شوند. با توجه به اینکه ساخت آلبومین در کبد صورت می‌گیرد افزایش میزان آن نشان‌دهنده بهبود در فعالیت کبدی است. افزایش پروتئین تام و آلبومین سرم از شاخص‌های اصلی درمان کبد و بازیابی سلامت این ارگان مهم بدن است (Hosseini-Vashan *et al.*, 2020). پس احتمالاً پوست پسته در هر دو حالت فرآوری شده و خام عملکرد کبد را بهبود می‌بخشد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد، افزودن پوست پسته تا سطح پنج درصد به جیره جوجه‌های گوشتی باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، پاسخ ایمنی و ریخت شناسی روده می‌گردد، بنابراین استفاده از پوست پسته در سطح پنج درصد در جیره جوجه گوشتی توصیه می‌شود.

References

1. Ahmadi, K., Ebadi, H. R., Hatami, F., HosseinPour, R., & Abdshah, H. (2020). Agricultural Jihad Statistics ministry, *Islamic Repulic of Iran*, *3*, Jihad Keshavarzi Pulication.
2. Amerah, A. M., Ravindran, V., & Lentle, R. G. (2009). Influence of insoluble fibre and whole wheat inclusion on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science*, *50*(3), 366-375.
3. Aminian, A., & Shaker Ardakani. A. (2008). Pistachio waste and application of them. 9. (In Persian).
4. AOAC. 2005. Official methods of Analysis of the Association of official analytical.
5. Bohluli, A., Nasserian, A. A., Valizadeh, R., & Eftekhar shahrodi, F. (2010). The chemical composition, *in vitro* gas production and digestibility of pistachio by-products. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *2*(1), 69-80. (In Persian).
6. Chahed, T., Dhifi, W., Hamrouni, I., Msaada, K., Bellila, A., Kchouk, M. E., & Marzouk, B. (2007). Comparison of pistachio hull essential oils from different Tunisian localities. *The Italian Journal of Biochemistry*, 56(1), 35-39.
7. Cheema, M. A., Qureshi, M. A., & Havenstein, G. B. (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.
8. Ebrahimpour, M., Haghparvar, R., Khazaeifar, S. R., Sasani, M., & Khosravi. F. (2014). The effect of a bacterial inoculant, urea and molasses on chemical composition, in vitro gas production and energy content of ensiled pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds and peel pulp. *Research opinion in Animal Veterinary Sciences*, *4*(1): 85-90. (In Persian).
9. Ghaffari, M. H., Tahmasbi, A. M., Khorvash, M., Naserian, A. A., & Vakili, A. R. (2014). Effects of pistachio by-products in replacement of alfalfa hay on ruminal fermentation, blood metabolites, and milk fatty acid composition in Saanen dairy goats fed a diet containing fish oil. *Journal of Applied Animal Research*, *42*(2), 186-193.
10. Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, *92*(3), 521-525.
11. Golmohammadi, Y., and Nobakht. A. (2016). The effect of lemon pulp and organic acids on performance, intestinal morphology and blood parameters of broilers. *Journal of Animal Production*, *18*(1), 129-140. (In Persian).
12. Goodarzi, M., Landy, N., & Nanekarani, S. (2013). Effect of onion (*Allium cepa* L.) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, immune responses and serum biochemical parameters in broiler chicks. *Health*, *5*(8), 1210.
13. Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, *8*(9), 950-988.
14. Hetland, H., & Svihus, B. (2001). Effect of oat hulls on performance, gut capacity and feed passage time in broiler chickens. *British Poultry Science*, *42*(3), 354-361.
15. Hosseini-Vashan, S. J., Golian, A., Yaghobfar, A., Zarban, A., Afzali, N., & Esmaeilinasab, P. (2012). Antioxidant status, immune system, blood metabolites and carcass characteristic of broiler chickens fed turmeric rhizome powder under heat stress. *African Journal of Biotechnology*, *11*(94), 16118-16125.
16. Hosseini-Vashan, S. J., Sharifian, M., Piray, A. H., & Fathi-Nasri, M. H. (2020). Growth performance, carcass and blood traits, immunity, jejunal morphology and meat quality of heat-stressed broiler chickens fed urea-treated pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *Animal Feed Science and Technology*, *267*, 114553.
17. Hosseini-Vashan, S. J., Yosefi, H., Ghasi, S. E., & Namaee, M. H. (2020). Two types of pistachio hull extract (*pistacia vera*) on performance, blood indices and intestinal microbial population of broilers challenged with Staphylococcus aureus. *Journal of Veterinary Research*, *75*: 418-430. (In Persian).

18. Jiménez-Moreno, E., González-Alvarado, J. M., de Coca-Sinova, A., Lázaro, R. P., Cámara, L., & Mateos, G. G. (2019). Insoluble fiber sources in mash or pellets diets for young broilers. 2. Effects on gastrointestinal tract development and nutrient digestibility. *Poultry Science*, *98*(6), 2531-2547.
19. Landy N., Ghalamkari, G. H., & Toghyani, M. (2012). Evaluation of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass characteristics, some of the immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chicks. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(3), 510-515.
20. Laudadio, V., Passantino, L., Perillo, A., Lopresti, G., Passantino, A., Khan, R. U., & Tufarelli, V. (2012). Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science*, *91*(1), 265-270.
21. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(5), 727-747.
22. Marzo, F., Urdaneta, E., & Santidrian, S. (2002). Liver proteolytic activity in tannic acid-fed birds. *Poultry Science*, *81*(1), 92-94.
23. Mokhtarpour, A., Naserian, A.A., Valizadeh, R., & Tahmasebi, R. (2010). Effect of urea and polyethylenglycol on chemical characteristics of pistachio pell silage. 4th Animal Science Congress, Mashad, Iran.
24. Nobakht, A., (2014). The effects of untreated and urea treated grape pulp consumption on performance, egg quality traits and some blood parameters of laying hens. *Animal Science and Research Journal*, *15*, 27-36. (In Persian).
25. North, O. M. & Bell, D. O. (1990). Commercial Chicken Production Manual. 4th ed., Springer Publication,
26. Pereira, J. A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreira, I. C. F. R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., & Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, *45*(11), 2287-2295.
27. Persia, M. E., Parsons, C. M., Schang, M., & Azcona, J. (2003). Nutritional evaluation of dried tomato seeds. *Poultry Science*, *82*(1), 141-146.
28. Provenza, F. D. (1996). Acquired aversions as the basis for varied diets of ruminants foraging on rangelands. *Journal of Animal Science*, *74*(8), 2010-2020.
29. Purreza, J., Sadeghi, G. A. & Mehri, M. (2005). Scot Chicken Nutrition. (Edited by Leeson and Summers). First printed, Arkan danesh, Esfahan, Iran. 295-297. (In Persian).
30. Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A., & Esfahani, Z. H. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(1), 107-112. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.023. PMID:19781589.
31. Rezvani, M. R., Rahimi, S., & Dadpasand, M. (2016). Effect of adding pomegranate peel powder to fat-containing diets on performance of broilers. *Animal Production*, *18*, 335-346. (In Persian).
32. Sadeghi, K., and Noakht, A. (2016). The effect of lemon grape and apple pulps on performance, carcass traits, digestive tract characteristic, intestinal morphology and immune status of broilers. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *7*(4), 466-477. (In Persian).
33. Salarinia, A., Afzali, N., Hosseini-Vashan, S. J., & Bashtani, M. (2020). Evaluation of production index, protein and energy efficiency indices, biochemical blood traits and humoral immunity in broiler chickens fed different level and particle size of insoluble non-starch polysaccharide of rice and oat hull. *Veterinary Research Biological Products*, *125*, 93-105. (In Persian).
34. Saleh, H., Golian, A., Kermanshahi, H., Mirakzehi, M. T., & Agah, M. J. (2015). Effects of natural antioxidants on the immune response, antioxidant enzymes and hematological broilers chickens. *Iranian Veterinary Journal*, *11*, 67-79. (In Persian).
35. Salehi, M., Mirzaei, F., & Mahdavi, A. (2012). Effects of different levels of feeding of pistachio epicarp silage on wool characteristics of growing Afshari lambs. *Agricultural Sciences*, *3*, 351-354. doi: 10.4236/as.2012.33040. (In Persian).
36. Shakeri, P., & Fazaeli, H. (2007). Evaluation the usage of different levels of pistachio peel in lamb diets. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, *38*(3), 529-534. (In Persian).
37. Tangestani, R., Alizadeh Doghikollaee, E., Ebrahimi, E., & Zare, P. (2011). Effect of garlic essential oil as an immunostimulant on hematological indices of juvenil beluga (huso huso). *Journal of Veterinary Research*, *66*, 209-216. (In Persian).
38. Vahmani, P., Naserian, A. A., Valizadeh, R., & NasiriMoghdam, H. (2006). Pistachio hulls as a feed ingredients for lactating dairy cow at the mean of lactation. *Agricultural Industry and Science Journal*, *5*, 201-210. (In Persian).
39. Valizadeh, R., Norouzian, M. A., Salemi, M., Ghiasi, E., & Yari, M. (2010). Effects of feeding Pistachio by-products on hematology and performance of Balouchi lambs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *9*(7), 1115-1119.
40. Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., & Brenes, A. (2011). Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poultry Science*, *90*(3), 566-578.
41. Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y. C., Booren, A. M., Gray, J. I., & DeWitt, D. L. (1999). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal*

of Natural Products, *62*(2), 294-296.

42. Yosefi, H., Hosseini-Vashan, S. J., Ghiasi, S. E., & Namaei, M. H. (2018). Evaluation of performance, blood biochemical indices and immune response of broilers fed pistachio hull extract (*Pistacia vera*) of fandoghi and kaleghochi. *Research of Anial Production*, *9*(20), 19-26. URL: http://rap.sanru.ac.ir/article-1-784-fa.html. (In Persian).

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 399-412

Effects of Biochar with Vitamin C as Replacement of Dietary Mineral Supplements on Performance and Egg Shell Quality of Laying Hens

Fatemeh Ahmadi [1], Mohsen Afsharmanesh[2*], Mohammad Salarmoini [2]

Received: 27-04-2021 Revised: 03-08-2021 Accepted: 28-11-2021 Available Online: 13-11-2022	**How to cite this article:** Ahmadi, F., Afsharmanesh, M., & Salarmoini, M. (2022) Effects of biochar with vitamin C as replacement of dietary mineral supplements on performance and egg shell quality of laying hens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 399- 412. DOI: 10.22067/ijasr.2021.70097.1021

Introduction: Humate material was used as feed additives in poultry nutrition. The biochar as a useful fertilizer in agriculture industry is a humate material that increases growth of plants. This fertilizer can as an additive be use in the poultry and animals feed, due to has many minerals material and two organic acid (humic and fulvic) in its compound. The reduce cost of diet in poultry industry for egg production, is an important goal. The biochar as a dietary additive is easily derived from burn organic material and agriculture byproduct. In recent years, several studies have been conducted to determine the effect of humic acid as an additive on performance poultry. In a study, dietary supplementation of laying hens with humic acid improves the performance and egg shape index. Investigating the effect of biochar as replacement of dietary mineral supplements on performance and egg shell quality of laying hens is rare. One of the properties of vitamin C (VC) is chelating properties, and with this property, it increases the intestinal absorption of minerals in birds. Therefore, this study was conducted to investigate the effects of biochar (as a humate material) in five levels and vitamin C in two levels as replacement of dietary mineral supplements on performance and egg shell quality of laying hens.

Materials and Methods: The current experiment was conducted to evaluate the effects of biochar with vitamin C as replacement of mineral supplement in diet of laying hen. A total of 400 laying hens of Bovans strain, were randomly assigned to 10 experimental groups in a 5×2 factorial treatment arrangement with five replications and eight laying hens in each replicate during three 30-day periods. Factors tested included biochar levels (0, 25, 50, 75, and 100% replacement with mineral supplements of diet) and vitamin C levels (0 and 100 mg/kg of diet). The feed intake, feed conversion ratio and daily weight gain were determined. Records of the feed intake were taken on by daily basis. Feed conversion ratio was calculated as grams of feed consumed to grams of egg mass. To determine egg shell quality characteristics, the shape index was calculated by using egg height and egg width. The egg specific gravity was evaluated by floating eggs in soluble of water and salt with different density. The egg breaking strength was measured by resistance meter.

Results and Discussion: Replacing biochar levels from 25 to 100% mineral supplement of diet, with and without vitamin C, had no effect on performance characteristics (feed intake, feed conversion ratio and daily weight gain) and egg shell quality traits (egg shape index, egg specific gravity and egg breaking strength) in total of period of the experiment (50 to 61 weeks of age). The levels of 25 and 50% biochar, plus vitamin C in diet decreased feed intake in the first period. Whereas, the level of 75% biochar, plus vitamin C in diet increased feed intake in this period. The egg shape index with the addition of vitamin C in diet decreased in the third period. The reason of no significant effect of biochar on performance and egg shell quality can be due to the different sources and amounts of biochar in poultry diet. The reason of no significant effect of vitamin C on performance and egg shell quality in laying hens can be due to the bird environmental temperature. The use of vitamin C in diet of laying hens under heat stress improves their performance. Whereas, this study was performed in normal environmental

1- M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
*Corresponding Author Email: mafshar@uk.ac.ir

temperature. The second reason is the chelating properties of vitamin C, that can be increased absorption minerals in birds intestinal. But due to advanced digestive tract of laying hens, maybe decrease its properties.

Conclusion: The results of present study showed that biochar across all levels had similar cost with control group, and it had no effect on egg shell quality and performance of laying hens. There was no significant interaction between biochar and vitamin C regrding to performance, egg shell quality traits and cost of diet during 50 to 61 weeks of age, too. Therefore, biochar can be completely replaced with dietary mineral supplements of laying hens due to its low cost, high availability, easy production without adverse effects on performance and egg quality traits.

Keywords: Biochar, Egg shell quality, Humic acid, Laying hen, Vitamin C.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثرات جایگزینی بیوچار به همراه ویتامین C با مکمل معدنی جیره بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار

فاطمه احمدی[۱]، محسن افشارمنش[۲*]، محمد سالارمعینی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

احمدی، ف.، افشارمنش، م.، و سالار معینی، م. (۱۴۰۱). اثرات جایگزینی بیوچار به همراه ویتامین C با مکمل معدنی جیره بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴ (۳)، ۴۱۲-۳۹۹.

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات جایگزینی بیوچار به‌همراه ویتامین C با مکمل معدنی جیره بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار انجام شد. این آزمایش با ۴۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه بوونز در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۵) با ۱۰ تیمار، پنج تکرار و هشت قطعه مرغ تخم‌گذار در هر تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح بیوچار (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ در صد مکمل معدنی جیره) و دو سطح ویتامین C (صفر و ۱۰۰میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره) بودند. در کل دوره آزمایش، شاخص‌های عملکردی نظیر مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و اضافه وزن روزانه مرغ‌ها و فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ ازجمله شاخص شکل، وزن مخصوص و مقاومت پوسته و هزینه جیره برای تولید هر کیلوگرم تخم‌مرغ، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از بیوچار به‌عنوان جایگزینی با قابلیت دسترسی و تولید آسان، برای مکمل معدنی جیره (تا سطح ۱۰۰ درصد) تأثیر منفی بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار نداشت.

واژه‌های کلیدی: اسید هیومیک، بیوچار، کیفیت پوسته تخم‌مرغ، مرغ‌های تخم‌گذار، ویتامین C.

مقدمه

به‌طورکلی، گوشت و تخم طیور، دو منبع غذایی مهم برای انسان‌ها به شمار می‌روند، که تهیه جیره طیور بیشترین هزینه را برای تولید این دو منبع غذایی به خود اختصاص می‌دهد. در برخی از پژوهش‌ها ترکیبات هیومیکی به‌دلیل اثرات مفید در تغذیه طیور به‌صورت افزودنی، برای کاهش هزینه جیره استفاده می‌شوند، زیرا افزودنی‌های خوراکی اثرات سودمندی را در تغذیه طیور از خود به‌جای می‌گذارند (Yoruk *et al*., 2004). این ترکیبات، از تجزیه گیاهان و مواد آلی تحت شرایط کم‌هوازی و یا بی‌هوازی به‌وجود می‌آیند (Beesley and Dickinson, 2011).

بیوچار نیز یکی از ترکیبات هیومیکی است که امروزه در کشاورزی به‌منظور حاصلخیزی و بهبود کیفیت خاک استفاده می‌شود (Lehmann and Joseph, 2009). از آن جایی که با گسترش کشاورزی، ضایعات حاصل از آن نیز افزایش می‌یابد، می‌توان با فرآوری این ضایعات و تبدیل آن به کود مفیدی به‌نام بیوچار، به مدیریت ضایعات کشاورزی پرداخت. بیوچار دارای بسیاری از مواد معدنی کم‌مصرف، پرمصرف و همچنین دو اسید آلی (هیومیک و فولویک) در ترکیب خود است.

اسید هیومیک که یکی از اجزای اصلی ترکیبات هیومیکی است،

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mafshar@uk.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2021.70097.1021

جدول ۱- آنالیز عناصر و مواد مغذی ترکیب بیوچار

Table 1- Ingredients and nutrients analysis of biochar

تجزیه ترکیب شیمیایی Chemical composition	برحسب درصد Percentage
انرژی (کیلوکالری بر کیلوگرم) Energy (kcal/kg)	48.5
فیبر خام Crude fiber	5.18
پروتئین خام Crude protein	1.46
چربی خام Ether extract	0.1<
خاکستر Ash	87.97
کلسیم Calcium	0.60
فسفر Phosphorus	0.04
سلنیوم Selenium	<0.01
مس Copper	0.01
ید Iodin	<0.01
آهن Iron	6.9
منگنز Manganese	0.02
روی Zinc	0.01
اسید هیومیک خالص Humic acid	1.6
اسید فولویک خالص Fulvic acid	0.06
ماده آلی Organic matter	12.03

پس از توزین مرغ‌های هر تیمار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱± در ابتدا و انتهای دوره، اضافه وزن روزانه مرغ‌های هر تیمار از طریق رابطه زیر محاسبه گردید.

معادله (۳)

مرغ روز = تعداد مرغ در هر قفس× تعداد روزهای دوره

معادله (۴)

اضافه وزن روزانه = (وزن هر تیمار در انتهای دوره− وزن هر تیمار در ابتدای دوره+ وزن تلفات هر تیمار)÷ مرغ روز

در سه روز پایانی هر دوره تعداد دو عدد تخم‌مرغ از هر تکرار جمع-آوری و به‌منظور تعیین صفات کیفی پوسته تخم‌مرغ ازجمله شاخص شکل، وزن مخصوص و مقاومت پوسته به آزمایشگاه منتقل شد. برای تعیین شاخص شکل تخم‌مرغ، ابتدا طول و عرض تخم‌مرغ با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد، سپس از تقسیم عرض (میلی‌متر) بر طول تخم‌مرغ (میلی‌متر) و ضرب عدد حاصل شده در ۱۰۰، شاخص شکل تخم‌مرغ محاسبه شد (Olobatoke and Mulugeta, 2011).

در این پژوهش، وزن مخصوص تخم‌مرغ با استفاده از روش شناور نمودن تخم‌مرغ در محلول آب نمک، اندازه‌گیری شد. به این صورت که ابتدا محلول‌های آب نمک با غلظت‌هایی از (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷ و ۲۸ گرم نمک طعام) در مقادیر مشخصی آب، تهیه شد که هر کدام از محلول‌ها به‌ترتیب بیانگر وزن مخصوص (۱/۰۶۵،

در برخی از تحقیقات به‌عنوان افزودنی در جیره طیور نیز استفاده می‌شود. مکمل هیومات در بهبود فلور روده پرنده، لالا و همکاران (Lala et al., 2017) و بالا بردن سطح ایمنی بدن حیوان نقش دارد (Parks et al., 1986). مطالعاتی که در خصوص استفاده از مکمل هیومات در تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار انجام شد، نشان داد که این مکمل سبب بهبود فراسنجه‌های عملکردی می‌شود (Hayirli et al., 2005). همچنین در پژوهشی که روی مرغ تخم‌گذار انجام شد، محققین عنوان کردند که با استفاده از مکمل هیومات تا ۰/۳ درصد جیره، متغیرهای عملکردی و شاخص‌های کیفیت تخم‌مرغ، ازجمله شاخص شکل بهبود یافته، امّا این مقدار از مکمل هیومات، وزن مخصوص و مقاومت پوسته را تحت تأثیر قرار نداد (Macit et al., 2009).

در مورد بیوچار مطالعات کمی در دسترس است و در اکثر آزمایش‌ها اسید هیومیک مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال، گزارش‌هایی مبنی بر اثربخش بودن بیوچار در جیره طیور یافت می‌شود که این ترکیب به‌عنوان مکمل خوراکی، علاوه‌بر بهبود هضم، سبب بهبود کارایی خوراک، تولید گوشت و تخم‌مرغ شده و برخی از بیماری‌ها را نیز کاهش می‌دهد (Gerlach and Schmidt, 2012). ویتامین C نیز به‌عنوان یک کیلاتور، در برخی از پژوهش‌ها استفاده شده است که با این خاصیت قادر است با عناصر معدنی نظیر آهن باند شود (Elalfy et al., 2015). در این پژوهش نیز ویتامین C به‌منظور بهبود قابلیت جذب عناصر معدنی بیوچار در روده پرنده و به دنبال آن بهبود عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ استفاده شد.

بنابراین، بیوچار به‌دلیل دارا بودن بسیاری از مواد معدنی کم‌مصرف، پرمصرف و دو اسید آلی هیومیک و فولویک به‌عنوان دو کیلاتور مثبت در ترکیب خود و با توجه به خاصیت کیلاتوری ویتامین C، شاید بتواند هزینه تهیه جیره را کاهش داده و به‌عنوان جایگزینی برای مکمل معدنی جیره استفاده گردد. علاوه‌براین با توجه به عدم تاریخ انقضاء بیوچار، تولید آسان این ترکیب از مواد آلی مختلف، وجود معادن این ترکیب در کشور و عدم نیاز به واردات، می‌توان این ترکیب را در هر زمان مورد استفاده قرار داد. در حالی که مکمل معدنی، علاوه‌بر دارا بودن تاریخ انقضاء، تنها دارای مواد معدنی کم‌مصرف بوده و اکثر اجزای تشکیل‌دهنده آن وارداتی است، که این مسئله سبب خروج مقادیر زیادی ارز از کشور می‌شود. همچنین استفاده از بیوچار محدود به خوراک دام و طیور نبوده و در زمینه‌های مختلف ازجمله داروسازی، کشاورزی و حفظ محیط زیست کاربرد دارد. زمانی که بتوان از بیوچار به‌عنوان جایگزین مکمل معدنی در جیره استفاده کرد، می‌توان اجزای خالص مکمل معدنی را در سایر زمینه‌ها به‌کار برد، که این امر سبب صرفه‌جویی در وقت و هزینه نیز می‌شود. بنابراین، در این مطالعه اثر جایگزینی پنج سطح بیوچار به‌همراه دو سطح ویتامین C با مکمل معدنی جیره بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات جایگزینی بیوچار به‌همراه ویتامین C با مکمل معدنی جیره بر عملکرد و کیفیت پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تخم‌گذار در ایستگاه تحقیقات علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. در این طرح، از ۴۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه بوونز با سن ۵۰ هفته استفاده شد. آزمایش به‌مدت ۱۲ هفته در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آزمایش فاکتوریل (۵×۲) شامل ۱۰ تیمار، پنج تکرار و هشت قطعه مرغ تخم‌گذار در هر تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح بیوچار (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد مکمل معدنی جیره) و دو سطح ویتامین C (صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در هرکیلوگرم جیره) بودند. پودر بیوچار به‌صورت مستقیم از معدن بیوچار کوهبنان کرمان تهیه و پس از آنالیز توسط شرکت و تائید عدم آلودگی این ترکیب به باکتری‌های ای‌کلای و سالمونلا دریافت شد. آنالیز عناصر و مواد مغذی ترکیب بیوچار در جدول ۱ ارائه شده است.

ویتامین C مورد آزمایش نیز به فرم انولیک با درصد خلوص ۹۹، محلول در آب، با شماره ثبت (CAS 50-81-7، تحت گواهی ORGANIC, ISO,HALA, KOSHER) تهیه شد. در کل دوره آزمایشی، ۱۶ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی اعمال شد. دسترسی به آب و دان به‌طور آزادانه فراهم شده و جیره‌ها از نظر مقدار انرژی و پروتئین خام مشابه بودند. ترکیب شیمیایی جیره پایه نیز بر اساس احتیاجات تغذیه‌ای سویه تجاری بوونز تنظیم شد (جدول ۲). رکوردگیری در سه دوره ۳۰ روزه انجام شد. خوراک مربوط به هر تیمار در ابتدای روز و در ساعت و مقداری مشخص به مرغ‌ها داده شده و در ابتدای روز بعد، خوراک باقی‌مانده از روز قبل جمع‌آوری و با ترازوی با دقت ۰/۰۱± توزین شد، سپس مصرف خوراک هر تیمار به‌صورت روزانه و از طریق رابطه یک محاسبه شد. ضریب تبدیل خوراک نیز پس از محاسبه مصرف خوراک و با توزین تخم‌مرغ‌های هر تیمار با ترازوی با دقت ۰/۰۱± از طریق رابطه دو محاسبه شد.

معادله (۱)

مصرف خوراک (گرم/پرنده/روز) = (وزن دان اولیه هر واحد آزمایشی (گرم)− وزن دان باقی‌مانده هر واحد آزمایشی (گرم))

معادله (۲)

ضریب تبدیل خوراک = (مصرف خوراک هر واحد آزمایشی÷ گرم تخم‌مرغ تولیدی هر واحد آزمایشی)

۱/۰۶۹، ۱/۰۷۳، ۱/۰۷۷، ۱/۰۸۱، ۱/۰۸۵، ۱/۰۸۹، ۱/۰۹۳، ۱/۰۹۷ و ۱/۱۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب) بودند. بدین ترتیب، وزن مخصوص را با شناور نمودن تخم‌مرغ در محلول‌های آماده شده به‌ترتیب از کمترین تا بیشترین غلظت شروع کرده و تا زمان ثابت ماندن تخم‌مرغ روی هر محلول، این کار ادامه داده شد. سرانجام پس از ثابت ماندن تخم‌مرغ در یک محلول، غلظت محلول تعیین شده بیانگر وزن مخصوص تخم-مرغ بود (Nowaczewski *et al*., 2010).

مقاومت پوسته تخم‌مرغ با استفاده از دستگاه مقاومت‌سنج (Zwick/Rocll,Co 91502084, Germany) تعیین شد. مقدار نیروی وارد شده به تخم‌مرغ در این دستگاه به‌شکل نموداری نشان داده شد که در این نمودار دو عدد ابتدا و انتهای نمودار بیانگر حداکثر و حداقل فشار اعمال شده به تخم‌مرغ بودند. فشار تا زمان مشاهده اولین ترک روی پوسته (شروع شکستگی) به تخم‌مرغ وارد شد. بدین ترتیب مقدار نیرو لازم جهت شکسته شدن تخم‌مرغ از تفاضل این دو عدد، بر حسب کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع به‌دست آمد. هزینه خوراک برای تولید هر کیلوگرم تخم‌مرغ نیز از حاصل ضرب قیمت تمام شده یک کیلوگرم جیره در ضریب تبدیل خوراک به‌دست آمد.

جدول ۲- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه مورد استفاده در تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار

Table 2- Ingredients and chemical composition of the basal ration in laying hens

اجزای جیره (درصد) Feed ingredient (%)	(۵۰ تا۶۱ هفته) (50 to 61 weeks)	ترکیبات شیمیایی Chemical composition	(۵۰ تا۶۱ هفته) (50 to 61 weeks)
ذرت Corn	46.69	انرژی قابل متابولیسم AME (kcal/kg)	2850
کنجاله سویا با ۴۴ درصد پروتئین خام Soybean meal (44%CP)	28.3	پروتئین خام Crude protein (%)	17.5
گندم Wheat	10	فیبر خام Crude fiber (%)	2.31
روغن گیاهی سویا Soybean oil	2.83	کلسیم Calcium (%)	4.1
کربنات کلسیم Calcium carbonate	6.7	فسفر قابل دسترس Available phosphorous (%)	0.46
پودر صدف Limestone	3.35	آرژنین Argenin (%)	1.25
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	0.99	لیزین Lysine (%)	1.04
مکمل ویتامینی[۱] Vitamin premix[1]	0.25	متیونین Methionine (%)	0.46
مکمل معدنی[۲] Mineral premix[2]	0.25	متیونین + سیستئین Methionine + Cysteine (%)	0.75
نمک Common salt	0.34	تریپتوفان Threptophan (%)	0.24
دی- ال- متیونین DL-Methionine	0.3	اسید لینولئیک Linoleic acid (%)	1.1

[۱] ویتامین‌های تأمین شده توسط مکمل ویتامینی مقادیر زیر را به‌ازای هر کیلوگرم جیره تأمین می‌نمودند: رتینول، ۸۸۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ آلفاتوکوفرول استات، ۱۶۵ واحد بین‌المللی؛ کوله کلسیفرول، ۴۰۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ منادیون، ۲۲ میلی‌گرم؛ تیامین، ۱۵ میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، ۴۸ میلی‌گرم؛ اسید پانتوتنیک، ۳۵۰ میلی‌گرم؛ نیاسین، ۸۰ میلی‌گرم؛ پیریدوکسین، ۲۵ میلی‌گرم؛ فولاسین، ۲۵ میلی‌گرم؛ سیانوکو بالامین، ۰/۱ میلی‌گرم؛ بیوتین، ۱/۵ میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۴۰۰۰ میلی‌گرم.

[۲] مواد معدنی تأمین شده توسط مکمل معدنی مقادیر زیر را به‌ازای هر کیلوگرم جیره تأمین می‌نمودند: سلنیوم، ۲ میلی‌گرم؛ مس، ۱۰۵ میلی‌گرم؛ ید، ۹ میلی‌گرم؛ آهن،۶۶۰ میلی‌گرم؛ منگنز، ۸۰۰ میلی‌گرم و روی، ۸۰۰ میلی‌گرم.

[1] The vitamin premix supplied the followings per kg of diet: vitamin A: 88,000 IU; vitamin E: 165 IU; vitamin D3: 40,000 IU; vitamin K3: 22 mg; thiamine: 15 mg; riboflavin: 48 mg; pantothenate: 350 mg; niacin: 80 mg; vitamin B6: 25 mg; folic acid: 25 mg; vitamin B_{12}: 0.1 mg; Biotin: 1.5 mg; Colin chloride: 4,000 mg.

[2] The mineral premix supplied the followings per kg of diet: Se: 2 mg; Cu: 105 mg; I: 9 mg; Fe: 660 mg; Mn: 800 mg; Zn: 800 mg.

داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab (2016) با رویه GLM تجزیه واریانس شدند و به‌منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح آماری پنج درصد استفاده شد. مدل آماری این طرح به شرح زیر بود.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$$ معادله (۵)

که در این معادله، Y_{ijk}: مقدار صفت مورد نظر؛ μ: میانگین کل؛ A_i: اثر سطح i بیوچار؛ B_j: اثر سطح j ویتامین C؛ $(AB)_{ij}$: اثر متقابل بیوچار و ویتامین C و e_{ijk}: اثر خطای آزمایش بود.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف بیوچار و ویتامین C و اثرات متقابل آن‌ها بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار در دوره‌های مختلف پرورش در جدول ۳ نشان داده شده است. در تحقیق حاضر، تأثیر تیمارهای آزمایشی بر هیچ‌کدام از شاخص‌های عملکردی در کل دوره معنی‌دار نبود، به‌طوری‌که مصرف خوراک مرغ‌های تخم‌گذار تغذیه شده با بیوچار دارا و فاقد ویتامین C در کل دوره، با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. با این حال، اثرات متقابل در دوره اول نشان داد که تیمارهای حاوی بیوچار در سطوح ۲۵ و ۵۰ درصد مکمل معدنی فاقد ویتامین C، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با همین تیمارها، ولی دارای ویتامین C، به‌ترتیب حدود شش درصد در سطح ۵۰ و ۵ درصد در سطح ۲۵ و نسبت به تیمار دارای ۷۵ درصد مکمل بیوچار فاقد ویتامین C حدود هشت درصد، مصرف خوراک را افزایش داد ($P<۰/۰۵$). به‌طور کلی در این دوره، افزودن ویتامین C به سطوح ۲۵ و ۵۰ درصد مکمل بیوچار، سبب کاهش مصرف خوراک گردید، در حالی که افزودن آن به سطح ۷۵ درصد، سبب بهبود مصرف خوراک شد. این نتایج موافق با نتایج کارااوگلو و همکاران (Karaoglu *et al.*, 2004) است که نشان دادند مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد هیومات، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت، امّا وزن جوجه‌ها را بهبود داد. در آزمایش دیگری نیز نشان داده شد که با مصرف سطوح مختلف هیومات (۰/۱ و ۰/۲ درصد) و سطوح مختلف پروبیوتیک (۰/۱ و ۰/۲ درصد) در جیره مرغ‌های تخم‌گذار، مصرف خوراک تحت تأثیر قرار نگرفت (Yoruk *et al.*, 2004). از آن جایی که بیوچار و مکمل معدنی هر دو دارای عناصر معدنی کم‌مصرف در ترکیب خود هستند، لذا با وجود خاصیت کیلاتوری ویتامین C و اسیدهای آلی هیومیک و فولویک موجود در ترکیب بیوچار، عناصر معدنی کم‌مصرف نیز در غلظت‌های پایین از طریق کیلات شدن با مواد آلی می‌توانند تأثیر مهمی را در بدن بدون تأثیر بر عملکرد داشته باشند (Zhang *et al.*, 2017).

در پژوهش‌های متعددی که تأثیر ویتامین C را بر صفات عملکردی طیور بررسی نموده‌اند، نتایج متفاوتی حاصل شده است. در آزمایشی استفاده از ویتامین C به‌میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره، بر صفات عملکردی طیور از جمله وزن تخم‌مرغ، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه شاهد تأثیر معنی‌داری نداشت (Mohiti *et al.*, 2007). کشاورز (Keshavarz, 1996)، نیز در پژوهشی عنوان کرد که افزودن مقادیر ۱۲۵ و۲۵۰ میلی‌گرم ویتامین C به هر کیلوگرم جیره، بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری نداشت. از آن جایی که دستگاه گوارش مرغ‌های تخم‌گذار به مراتب پیشرفته‌تر از جوجه‌های گوشتی است (National Research Council, NRC, 1994). به همین دلیل احتمال داده می‌شود که مرغ‌های تخم‌گذار در جذب عناصر معدنی بیوچار، قابلیت بیشتری نسبت به جوجه‌های گوشتی داشته باشند. با این فرض، در آزمایش حاضر احتمالاً نقش کیلاتوری ویتامین C نیز در جیره کمتر شده و بهبودی بر عملکرد در مقایسه با گروه شاهد نشان نداده است. امّا در آزمایش‌هایی که در خصوص تغذیه جوجه‌های گوشتی انجام شده، گزارش شد که با استفاده از اسید هیومیک در جیره، مصرف خوراک افزایش می‌یابد (Yasar *et al.*, 2002). در نتایج پژوهش ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2003)، در خصوص ویتامین C نیز نشان داده شد که استفاده از ویتامین C و اسید فولیک در جیره بلدرچین ژاپنی تحت تنش حرارتی، سبب بهبود عملکرد نسبت به گروه شاهد شد، به‌طوری که مصرف خوراک و وزن آن‌ها نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری هم‌زمان با بهبود ضریب تبدیل خوراک افزایش یافت. در طی پژوهشی در خصوص ویتامین C، کسکان و همکاران (Coskun *et al.*, 1998) عنوان کردند که افزودن۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین C در هر کیلوگرم جیره، سبب افزایش مصرف خوراک در گروه ۵۰ میلی‌گرم نسبت به گروه شاهد و ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین C شد. علت اختلاف در تأثیر ویتامین C می‌تواند مربوط به شرایط پرورشی طیور باشد، به‌طوری که در شرایط تنش گرمایی افزودن ویتامین C به جیره طیور، طبق گزارش ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2003) اثرات مطلوبی بر عملکرد طیور نشان می‌دهد.

با توجه به عدم تأثیر بیوچار و ویتامین C بر مصرف خوراک مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره و رابطه مستقیم مصرف خوراک با وزن مرغ‌ها، اضافه وزن روزانه مرغ‌ها نیز در کل دوره، تحت تأثیر تیمارهای

آزمایشی قرار نگرفت. در توافق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر، احمدی و کریمی‌ترشیزی (Ahmadi and Karimi Torshizi, 2015) نیز گزارش کردند که با استفاده از ۰/۶ درصد ورمی هوموس (به‌عنوان منبعی از اسید هیومیک)، ضمن کاهش مصرف خوراک، بهترین ضریب تبدیل خوراک در بلدرچین‌های ژاپنی حاصل شد، امّا افزایش وزن روزانه بدن تحت تأثیر قرار نگرفت. در آزمایش مذکور، بهبود ضریب تبدیل خوراک با مصرف اسید هیومیک به افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک و نقش مفید این باکتری‌ها بر عملکرد پرنده نسبت داده شد (Karimi Torshizi, 2008). مطالعه محمدصادقی (Mohammad Sadeghi, 2018)، نیز نشان داد که با حذف کامل مکمل معدنی جیره و استفاده از کمپلکس مواد هیومیکی به‌عنوان جایگزین مکمل معدنی جیره جوجه‌های گوشتی، وزن بدن تحت تأثیر قرار نگرفت.

در گزارش دیگری سیاه‌پور و همکاران (Siahpour *et al*., 2010)، نشان دادند که با وجود حذف مکمل‌های ویتامینی و معدنی از جیره جوجه‌های گوشتی از سنین ۷، ۱۴ و۲۱ روزگی، با کاهش مصرف خوراک و اضافه وزن روزانه مواجه شده و به دنبال آن ضریب تبدیل خوراک افزایش یافت، ولی با حذف مکمل‌ها از سن ۲۸ و ۳۵ روزگی تأثیری بر عملکرد جوجه‌ها مشاهده نشد.

در مورد ویتامین C نیز گزارش‌ها نشان داد که در شرایط طبیعی پرورش، استفاده از این ویتامین بر افزایش وزن مرغ‌ها و مصرف خوراک تأثیری نداشت آجوون و همکاران (Ajuwon *et al*., 2002)، امّا مخالف با نتایج این پژوهش و نتایج مذکور، محققین در نتایج آزمایشی در خصوص افزایش وزن طیور نشان دادند که استفاده از اسید هیومیک در جیره بلدرچین‌های تخم‌گذار، سبب بهبود وزن و افزایش جذب کلسیم شد و بهره‌وری برخی عناصر دیگر را نیز بهبود بخشید (Avci *et al*., 2007). در تحقیقی میزان اسید هیومیک تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن نشان داد، به‌طوری‌که استفاده از اسید هیومیک در مقادیر صفر، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و ۳ گرم در هر کیلوگرم جیره، در تغذیه جوجه‌های گوشتی نشان داد که بیشترین افزایش وزن روزانه، مربوط به جوجه‌های تغذیه شده با ۲/۲۵ گرم اسید هیومیک بود (Arif *et al*., 2016). ویتامین C یکی از عوامل تغذیه‌ای است که قادر است بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر مثبتی بگذارد. علت بهبود شاخص‌های عملکردی طیور با مصرف ویتامین C در نتایج برخی تحقیقات را می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ویتامین مرتبط دانست (Mc Dowell, 1989).

با وجود اثر معنی‌دار جیره آزمایشی بر مصرف خوراک دوره اول، در این دوره و در هیچ‌کدام از بازه‌های زمانی دیگر، اثرات اصلی بیوچار و ویتامین C و اثر متقابل آن‌ها بر ضریب تبدیل خوراک معنی‌دار نشد. در تحقیقات کایا و تانسر (Kaya and Tuncer, 2009)، روی جوجه‌های گوشتی نیز نشان داده شد که استفاده از ۲/۵ کیلوگرم اسید هیومیک در هر تن خوراک، با توجه به عدم تأثیر بر مصرف خوراک، تأثیر معنی‌داری بر ضریب تبدیل خوراک و افزایش وزن روزانه نیز نداشت. محققین در پژوهشی در مورد ویتامین C نیز نشان دادند که این ویتامین در شرایط طبیعی بر مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک در مرغ‌های تخم‌گذار مؤثر واقع نشد (Newman and Leeson, 1999). تحقیقات جعفر و بلاها (Jaffar and Blaha, 1996)، نیز در همین خصوص روی جوجه‌های گوشتی انجام شد و نشان داد که این ویتامین در شرایط طبیعی، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک را تحت تأثیر قرار نداد.

مخالف با نتایج فوق در آزمایشی گزارش شد که تغذیه جوجه‌های گوشتی با ۰/۵ درصد مکمل هیومات، ضریب تبدیل خوراک را بهبود و وزن بدن جوجه‌ها را در ۴۲ روزگی، نسبت به گروه شاهد افزایش داد (Bailey *et al*., 1996). استفاده از اسید هیومیک در مقادیر صفر، ۰/۷۵، ۱/۵، ۲/۲۵ و ۳ گرم در هر کیلوگرم جیره در تغذیه جوجه‌های گوشتی نشان داد که میزان ۲/۲۵ گرم اسید هیومیک در جیره، به‌طور معنی‌داری سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک نسبت به گروه شاهد شد (Arif *et al*., 2016). علت تفاوت عملکردی در نتایج استفاده از اسید هیومیک در جیره طیور را می‌توان به میزان استفاده از اسید هیومیک مرتبط دانست.

نتایج مربوط به فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ در مرغ‌های تغذیه شده با تیمارهای آزمایشی در دوره‌های مختلف پرورش مرغ‌های تخم‌گذار در جدول ۴ آورده شده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هیچ‌کدام از شاخص‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی در کل دوره قرار نگرفتند. به‌طورکلی، با بررسی اثرات اصلی بیوچار و ویتامین C و اثرات متقابل آن‌ها در کل دوره، شاخص شکل تخم‌مرغ تحت تأثیر هیچ‌یک از تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، امّا اثرات اصلی ویتامین C در دوره سوم نشان داد، جیره حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین C به‌طور معنی‌داری نسبت به جیره فاقد ویتامین، شاخص شکل تخم‌مرغ را حدود دو درصد کاهش داد ($P<0.05$). از آن جایی که این آزمایش در شرایط طبیعی و فاقد هر گونه تنش انجام شده است، در چنین شرایطی ویتامین C به‌مقدار کافی

در بدن پرنده ساخته می‌شود، لذا استفاده از ویتامین C در این شرایط، مازاد بر نیاز محسوب می‌شود. طبق گزارش گروس (Gross, 1988)، استفاده بیش از حد ویتامین C در جیره، اثرات نامطلوبی بر عملکرد مرغ‌ها داشت، بنابراین در تحقیق حاضر، استفاده مازاد این ویتامین در جیره پرنده، احتمالاً سبب تأثیر منفی بر پوسته و شکل تخم‌مرغ نیز شده است. با این حال این نتیجه نیاز به تحقیق و بررسی بیشتری دارد.

در پژوهشی مشخص شد که استفاده از ۱/۵ گرم مواد هیومیکی در هر کیلوگرم جیره، بر شاخص شکل تخم‌مرغ تولیدی نسبت به گروه شاهد تأثیر معنی‌داری نداشت (Yalçın *et al*., 2006). همچنین در آزمایشی دیگر گزارش شد که استفاده از سطوح ۰/۱ و ۰/۲ درصد هیومات در جیره مرغ تخم‌گذار بر شاخص شکل تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری نداشت (Yoruk *et al*., 2004).

موافق با نتایج حاصل از این آزمایش در خصوص ویتامین C، رحمتی و همکاران (Rahmati *et al*., 2011) بیان نمودند که استفاده از مقادیر ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین C در هر کیلوگرم جیره در سن ۳۸ هفتگی، بر شاخص شکل و وزن مخصوص تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری نداشت. پژوهش‌های ماسیت و همکاران (Macit *et al*., 2009) گویای تأثیر مکمل هیومات تا ۰/۳ درصد، بر بهبود شاخص شکل تخم‌مرغ بود، امّا این مقدار از مکمل هیومات بر وزن مخصوص و مقاومت پوسته تخم‌مرغ تأثیری نداشت. در تحقیقی استفاده از ویتامین C در سن ۳۵ هفتگی، بر شاخص شکل تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری داشت، به‌گونه‌ای که استفاده از ۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین C نسبت به گروه شاهد، شاخص شکل تخم‌مرغ را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Saki *et al*., 2010).

سطوح مختلف مکمل بیوچار با و بدون ویتامین C، وزن مخصوص تخم‌مرغ را در هیچ‌یک از بازه‌های زمانی، تحت تأثیر قرار نداد. در گزارشی موافق با این پژوهش نشان داده شد که استفاده از سطوح ۰/۱ و ۰/۲ درصد هیومات در جیره تأثیر معنی‌داری بر وزن مخصوص تخم‌مرغ نداشت (Yoruk *et al*., 2004). وزن مخصوص تخم‌مرغ یک فراسنجه پیچیده است که از آن برای اندازه‌گیری کیفیت پوسته تخم‌مرغ استفاده می‌شود (Harms *et al*., 1994). در گزارشی، استفاده از ویتامین C به‌مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جیره بر وزن مخصوص تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری نداشت (Ciftci *et al*., 2005). امّا بر اساس نتایج ساهین و ساهین (Sahin and Sahin, 2001)، استفاده از مکمل ویتامین C در جیره، وزن مخصوص تخم‌مرغ را نسبت به گروه شاهد افزایش داد.

مقاومت پوسته تخم‌مرغ، در هیچ‌یک از بازه‌های زمانی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، به‌طوری که جایگزینی بیوچار به‌جای مکمل معدنی جیره و همچنین استفاده همزمان آن با ویتامین C، مقاومتی مشابه با مقاومت پوسته شاهد نشان داد. موافق با نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان به پژوهشی که در خصوص استفاده از مواد هیومیکی در جیره مطرح شد اشاره نمود که استفاده از این ماده به‌مقدار ۱/۵ گرم در هر کیلوگرم جیره، بر مقاومت پوسته تخم‌مرغ تأثیر معنی‌داری نداشت (Yalçın *et al*., 2006). نتایجی مبنی بر تأثیر ویتامین C بر مقاومت پوسته تخم‌مرغ یافت نشد. پوسته نرم و شکننده تخم‌مرغ، به‌عنوان یکی از معضلات در پرورش مرغ‌های تخم‌گذار، به‌ویژه در دوره دوم تولید شناخته می‌شود، زیرا با افزایش سن مرغ‌های تخم‌گذار، از کیفیت پوسته تخم‌مرغ کاسته می‌شود. عناصر کم‌مصرف، کیفیت پوسته تخم‌مرغ را بهبود می‌بخشند سوویات کیویسز و همکاران (Swiatkiewicz *et al*., 2015)، لذا حضور این عناصر در ترکیب بیوچار حائز اهمیت است. با این حال، با وجود جایگزینی بیوچار با مکمل معدنی، کیفیت پوسته تغییر نکرده و کیفیتی مشابه گروه شاهد مشاهده شد، که این نتیجه نیز بیانگر کافی بودن عناصر معدنی موجود در بیوچار است.

یکی دیگر از عواملی که بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ تأثیر می‌گذارد، اثر ضدیت بین عناصر معدنی از جمله دو عنصر آهن و روی در جیره است، لذا این اثر ضدیت در ترکیب بیوچار وجود نداشته و از این طریق بر کیفیت پوسته نیز تأثیر منفی نشان نداد. مخالف با این آزمایش، در تحقیقی با افزایش سطح آهن و کاهش سطح روی در عناصر معدنی جیره، مقاومت پوسته تخم‌مرغ افزایش یافت، در صورتی که با افزایش همزمان سطح هر دو عنصر در جیره، مقاومت پوسته با اثر ضدیت این دو عنصر و تداخل در جذب آن‌ها کاهش پیدا کرد (Dayyani *et al*., 2013).

جدول ۳- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار در دوره‌های مختلف پرورش

Table 3- The effect of deitary treatments on laying hens performance in different periods

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	مصرف خوراک (گرم/مرغ/روز) Feed intake (g/hen/day)				ضریب تبدیل خوراک (گرم خوراک مصرفی/گرم تخم‌مرغ تولیدی) Feed conversion ratio (g feed/g egg)				افزایش وزن روزانه (گرم/مرغ/روز) Daily weight gain (g/hen/day)		
	50-53w[۲]	54-57w	58-61w	50-61w	50-53w	54-57w	58-61w	50-61w	50-53w	58-61w	50-61w
بیوچار Biochar (%RMS)[1]											
0	98.79 [a]	113.7	114.8	109.1	1.666	1.854	1.847	1.791	12470	13170	0.969
25	99.19 [a]	115.3	119	111.2	1.656	1.848	1.852	1.788	12720	13460	1.019
50	98.51 [ab]	114.3	114.6	109.1	1.650	1.860	1.816	1.777	12550	13180	0.886
75	96.29 [b]	112.9	113.3	107.5	1.617	1.826	1.782	1.743	12780	13250	0.652
100	98.96 [a]	115.7	117.5	110.7	1.682	1.876	1.852	1.806	12790	13340	0.772
SEM	0.617	1.077	2.443	1.215	0.017	0.025	0.043	0.026	0.135	0.127	0.142
P-value	0.013	0.346	0.468	0.232	0.120	0.720	0.727	0.526	0.346	0.471	0.371
ویتامین C Vitamin C (mg/kg)											
0	98.85	115	116.3	110.1	1.670	1.875	1.848	1.799	12630	13310	0.945
100	97.84	113.8	115.3	109.0	1.639	1.832	1.811	1.762	12690	13250	0.774
SEM	0.390	0.681	1.545	0.768	0.011	0.016	0.027	0.016	0.086	0.080	0.090
P-value	0.073	0.229	0.631	0.325	0.055	0.064	0.339	0.119	0.624	0.579	0.186
ویتامین C × بیوچار Biochar□vitamin C											
0×0	97.72 [abcd]	114.9	115.6	109.4	1.683	1.912	1.890	1.830	12390	13200	1.132
0×100	99.86 [ab]	112.6	113.9	108.8	1.650	1.797	1.805	1.752	12550	13130	0.807
25×0	101.41 [a]	115.4	119.1	112.0	1.699	1.865	1.872	1.814	12940	13690	1.047
25×100	96.98 [bcd]	115.2	118.8	110.4	1.614	1.832	1.832	1.762	12510	13220	0.990
50×0	101.57 [a]	114.2	113.2	109.7	1.703	1.855	1.797	1.786	12450	12980	0.739
50×100	95.45 [cd]	114.3	116	108.6	1.598	1.865	1.834	1.768	12640	13390	1.033
75×0	94.22 [d]	112.2	112.7	106.4	1.597	1.834	1.793	1.744	12510	13160	0.911
75×100	98.36 [abc]	113.5	113.8	108.6	1.636	1.819	1.771	1.743	13060	13340	0.393
100×0	99.36 [abc]	118	121.1	112.8	1.666	1.906	1.890	1.823	12880	13520	0.897
100×100	98.55 [abc]	113.4	113.8	108.6	1.697	1.846	1.814	1.788	12700	13160	0.647
SEM	0.873	1.523	3.455	1.718	0.025	0.036	0.061	0.037	0.191	0.179	0.201
P-value	0.0001	0.338	0.649	0.481	0.014	0.465	0.863	0.850	0.120	0.100	0.337

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

[۱] جایگزین مکمل معدنی.

w: هفته‌ها

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

[1] Replacement Mineral Supplementation

w: weeks

جدول ٤- تأثیر جیره‌های آزمایشی بر کیفیت پوسته تخم‌مرغ در دوره‌های مختلف پرورش

Table 4- The effect of deitary treatments on egg shell quality in different periods

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	شاخص شکل تخم‌مرغ (٪) shape index (%)				وزن مخصوص تخم‌مرغ (گرم بر سانتی‌متر مکعب) egg specific gravity (g/cm^3)				مقاومت پوسته تخم‌مرغ (کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع) egg breaking strength (kg/cm^2)			
	50-53w	54-57w	58-61w	50-61w	50-53w	54-57w	58-61w	50-61w	50-53w	54-57w	58-61w	50-61w
بیوچار Biochar (%RMS)[1]												
0	80.99	78.35	77.95	79.10	1.085	1.086	1.076	1.083	36.19	32.96	31.15	33.44
25	79.05	78.71	79.01	78.93	1.087	1.093	1.079	1.086	37.15	35.42	33.05	35.15
50	79.30	78.08	79.21	78.87	1.087	1.087	1.079	1.085	38.06	33.15	30.87	34.03
75	78.25	79.40	78.02	78.56	1.083	1.085	1.080	1.082	35.32	30.98	30.18	32.47
100	77.69	78.17	78.36	78.07	1.089	1.088	1.081	1.086	33.99	31.00	29.93	31.94
SEM	0.865	0.687	0.737	0.498	0.002	0.003	0.002	0.001	1.456	1.354	1.598	1.086
P-value	0.097	0.659	0.659	0.626	0.335	0.241	0.329	0.189	0.344	0.139	0.671	0.261
ویتامین C Vitamin C (mg/kg)												
0	78.93	78.12	79.23[a]	78.76	1.087	1.089	1.080	1.085	36.74	33.13	31.19	33.51
100	79.18	78.96	77.79[b]	78.65	1.085	1.087	1.078	1.083	35.55	32.27	30.88	33.30
SEM	0.547	0.434	0.466	0.315	0.001	0.002	0.001	0.001	0.921	0.857	1.011	0.687
P-value	0.750	0.179	0.034	0.791	0.247	0.521	0.107	0.102	0.369	0.484	0.833	0.826
ویتامین C × بیوچار Biochar *Vitamin C												
0×0	82.50	78.98	78.37	79.95	1.084	1.086	1.079	1.083	40.09	34.61	32.33	35.69
0×100	79.49	77.73	77.54	78.25	1.086	1.087	1.073	1.082	32.29	31.31	29.96	31.19
25×0	77.87	77.70	79.17	78.25	1.086	1.091	0.080	1.086	36.12	33.95	34.39	34.71
25×100	80.23	79.72	78.86	79.61	1.089	1.095	1.077	1.087	38.17	36.88	31.71	35.59
50×0	78.53	77.66	79.40	78.53	1.087	1.092	1.080	1.086	38.14	32.68	30.55	33.79
50×100	80.07	78.51	79.02	79.20	1.086	1.083	1.079	1.083	37.99	33.61	31.19	34.26
75×0	77.81	78.58	79.60	78.66	1.087	1.088	1.081	1.085	34.27	32.36	28.94	31.47
75×100	78.69	80.22	76.44	78.45	1.080	1.083	1.079	1.080	36.37	29.60	31.42	33.47
100×0	77.96	77.71	79.64	78.44	1.092	1.088	1.081	1.087	35.05	32.05	29.73	31.90
100×100	77.43	78.64	77.08	77.71	1.085	1.088	1.082	1.085	32.94	29.96	30.14	31.98
SEM	1.223	0.972	1.043	0.704	0.003	0.004	0.002	0.002	2.058	1.909	2.260	1.533
P-value	0.224	0.503	0.530	0.242	0.288	0.393	0.665	0.576	0.109	0.437	0.760	0.324

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

[۱] جایگزین مکمل معدنی.

W: هفته‌ها.

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

Replacement Mineral Supplementation

w: weeks

نتایج مربوط به هزینه خوراک مصرفی برای تولید هر کیلوگرم تخم‌مرغ در کل دوره پرورش مرغ‌های تخم‌گذار در جدول ۵ نشان داده شده است. هزینه هر کیلوگرم تخم‌مرغ با جایگزینی بیوچار و ویتامین C با مکمل معدنی جیره، تغییر نکرد. مطابق با نتایج این آزمایش، در گزارشی مبنی بر حذف مکمل‌های ویتامینی و معدنی از جیره جوجه‌های گوشتی، عدم تغییر بر عملکرد رشد و هزینه خوراک نسبت به گروه شاهد در دو هفته پایانی دوره پرورش مشاهده شد، امّا در هفته پایانی دوره پرورش، هزینه‌های جیره بدون تأثیر نامطلوب بر عملکرد، کاهش یافت (Siahpour *et al*., 2010).

جدول ۵- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر هزینه خوراک مصرفی برای هر کیلوگرم تخم‌مرغ در کل دوره پرورش مرغ‌های تخم‌گذار

Table 5- The effect of deitary treatments on cost of feed consumed per kg egg in over the whole period laying hens

تیمارهای آزمایشی Experimental treatments	قیمت تولید هر کیلوگرم تخم‌مرغ (ریال)
بیوچار Biochar (% RMS)[1]	
0	42000
25	41886
50	41508
75	40642
100	41993
SEM	608.4
P-value	0.477
ویتامین C Vitamin C (mg/kg)	
0	41903
100	41309
SEM	384.8
P-value	0.282
ویتامین C × بیوچار Biochar×Vitamin C	
0×0	42804
0×100	41195
25×0	42337
25×100	41435
50×0	41585
50×100	41431
75×0	40511
75×100	40773
100×0	42276
100×100	41710
SEM	860.4
P-value	0.845

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

[۱] جایگزین مکمل معدنی.

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

[1] Replacement Mineral Supplementation

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی، با توجه به نتایج آزمایش حاضر می‌توان بیان کرد، استفاده از بیوچار در جیره مرغ‌های تخم‌گذار به‌عنوان جایگزین مکمل معدنی جیره در تمامی سطوح علاوه‌بر عدم تأثیر این ترکیب بر عملکرد و فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ، هزینه‌ای مشابه گروه شاهد نیز داشت. افزودن ویتامین C نیز به بیوچار در هنگام جایگزینی با مکمل معدنی جیره، بهبودی بر عملکرد و فراسنجه‌های کیفی پوسته تخم‌مرغ حاصل نکرد، امّا از نظر اقتصادی مشابه گروه شاهد شد.

بنابراین، به‌دلیل در دسترس بودن و هزینه پایین تولید بیوچار نسبت به مکمل معدنی جیره می‌توان بیوچار را بدون ویتامین C و به‌عنوان جایگزینی برای مکمل معدنی در جیره مرغ‌های تخم‌گذار در تمامی سطوح و بدون هیچ‌گونه تأثیر زیان‌بخش استفاده کرد.

References

1. Ahmadi, M., & Karimi Torshizi, M. A. (2015). Evaluation of vermicompost supplementation in Japanese quail diet. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *7*(1), 66-76. (In Persian).
2. Ajuwon, K. M., Matanmi, O., & Daniyan, O. C. (2002). Effect of water sources and ascorbic supplementation on egg quality and production parameters of laying hens. *Livestock Research for Rural Development*, *14*, 6.
3. Arif, M., Rehman, A., & Saeed, M. (2016). Impacts of dietary humic acid supplementation on growth performance, some blood metabolites and carcass traits of broiler chicks. *Indian Journal of Animal Sciences*, *86*(9), 1073–1078.
4. Avci, M., Denek, N., & Kaplan, O. (2007). Effects of humic acid at different levels on growth performance, carcass yields and some biochemical parameters of quails. *Journal of Animal Veterinary Advances*, *6*, 1-4.
5. Bailey, C. A., White, K. E., & Donke, S. L. (1996). Evaluation of menefeehumate TM on the performance of broilers. *Poultry Science*, *75*, 84.
6. Beesley, L., & Dickinson, N. (2011). Carbon and trace element fluxes in the pore water of an urban soil following greenwaste compost, woody and biochar amendments, inoculated with the earthworm lumbricus terrestris. *Soil Biology and Biochemistry*, *43*(1), 188-196. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.035.
7. Ciftci, M., Ertas, O. N., & Guler, T. (2005). Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to achronic heat stress. *Revue Medicina Veterinarni*, *156*(2), 107-111.
8. Coskun, B., Inal, F., Erganis, O., Kuyucuoglu, Y., Ok, Ü., Çelik, I., Tiftik, A. M., & Kurtoglu, F. (1998). The effects of various level of ascorbic acid on the immunity and egg yield of laying hens. *Turkish Journal Veterinarni Animal Science*, *22*, 29-35.
9. Dayyani, N., BeykiBandarAbadi, M., & Amirabadi Farhani, A. (2013). Cheated minerals in animal nutrition. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, *1*(11), 1387-1391.
10. Elalfy, M., Adly, A. A., Ismail, E., & Elalfy, O. (2015). June. Efficacy and safety of vitamin C as an adjuvant to iron chelation therapy in young patients with B-thalassemia major: A randomized prospective trial. In Haematologica (Vol. 100, pp. 131-131). Via giuseppe belli 4, 27100 pavia, italy: ferrata stortifoundation. https://doi.org/10.1111/ejh.12594.
11. Gerlach, H., & Schmidt, H. P. (2012). Biochar in poultry farming. *Ithaka Journal*, *1*, 262–264.
12. Gross, W. (1988). Effect of ascorbic acid on antibody response of stressed and unstressed chickens. *Avian Diseases*, *32*, 483-485.
13. Harms, R. H., Abdallah, A. G., & Slona, D. R. (1994). Error in measuring Hens. *Annals of Animal Science*, *15*(3), 711-723.
14. Hayirli, A., Esenbuga, N., Macit, M., Lacin, E., Karaoglu, M., Karaca, H., & Yildiz, L. (2005). Nutrition practice to alleviate the adverse effects of stress on laying performance, metabolic profile and egg quality in peak producing hens. *Journal of Animal Science*, *18*, 1310-1319.
15. Jaffar, G. H., & Blaha, J. (1996). Effect of ascorbic acid supplementation in drinking water on growth rate, feed consumption and feed efficiency of broiler chickens maintained under acute heat stress conditions. *Zivocisna Vyroba*, *41*, 485-490.
16. Karaoglu, M., Macit, M., Esenbuga, N., Durdag, H., Turgut, L., & Bilgin, O. (2004). Effect of supplemental humate nat different levels on the growth performance, slaughter and carcasstraits of broilers. *International Journal of Poultry Science*, *3*, 406-410.
17. Karimi Torshizi, M. A., Rahimi, S., Mojgani, N., Esmaeilkhanian, S., & Grimes, J. (2008). Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. Asian-*Australian Journal of Animal Science*, *21*, 1495-1500. (In Persian).
18. Kaya, C. A., & Tuncer, S. D. (2009). The effects of humates on fattening performance, carcass quality and some blood parameters of broilers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*, 281-284.
19. Keshavarz, K. (1996). The effect of different levels of vitamin C and cholecalsiferol with adequate or marginal levels of dietary calcium on performance and egg shell quality of laying hens. *Poultry Science*, *75*, 1227-1235. https://doi.org/10.3382/ps.0751227.

20. Lala, A. O., Kwelum, N. O., So, A. O. O., Ajao, A. O., & Degbenjo, A. A. A., (2017). Response of broiler chickens to varying dosage of humic acid in drinking water. *National Animal Production Research Institute*, *29*(1), 288-294.
21. Lehmann, J., & Joseph, S. (Eds). (2009). Biochar for Environmental Management: *Science and Technology*. 416 p. Earthscan London and Sterling, VA.
22. Macit, M., Elebi, S. C., Senbuga, N. E., & Araca, H. K. (2009). Effects of dietary humate supplementation on performance, egg quality and egg yolk fatty acid composition in layers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*, 315-319. https://doi.org/10.1002/jsfa.3447.
23. Mc Dowell, L. R. (1989). Vitamins in animal nutrition comparative aspects to human nutrition Vitamin C. pages 365-387. Academic Press, London.
24. Mohammad Sadeghi, F. (2019). Study of substitutintg the mineral premixe diet with complex of humic material and its combination with probiotics on performance, intestinal morphology, immune response and meat quality of broilers. M.Sc. thesis. Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, 228, 1-4.
25. Mohiti Asli, M., Hosseini, S. A., Lotfollahian, H., & Shariatmadari, F. (2007). Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature. *International Journal of Poultry Science*, *6*(12), 895-900.
26. National Research Council, NRC. (1994). Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press. Washington, DC.
27. Newman, S., & Leeson, S. (1999). The effect of dietary supplementation with 1, 25 dihydroxycholecalsifrol or vitamin C on the characteristics of the tibia of older laying hens. *Poultry Science*, *78*, 85-90. https://doi.org/10.1093/ps/78.1.85.
28. Nowaczewski, S., Kontetecka, H., Rosinski, A., Koberling, S., & Koronowski, P. (2010). Egg quality of Japanese quail depending on layer age and storage time. *Folia Biologica*, *58*, 201-207. https://doi.org/10.3409/fb58_3-4.201-207.
29. Olobatoke, R. Y., & Mulugeta, S. D. (2011). Effect of dietary garlic powder on layer performance, fecal bacterial load, and egg quality. *Poultry Science*, *90*(3), 665-670. https://doi.org/10.3382/ps.2010-00736.
30. Parks, C., Ferket, P. R., Thomas, L. N., & Grimes, J. L. (1986). Growth performance and immunity of turkeys fed high and low crude protein diets supplemented with Menefee humate. *Poultry Science*, *75*, 138-143.
31. Rahmati, M. M. H., Saki, A. A., Zamani, P., Eskandarlo, A., & TahmasbPour, B. (2011). Effect of vitamin C on performance, egg characteristics and some blood biochemical parameters in laying hens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *3*(3), 236-242.
32. Sahin, N., & Sahin, K. (2001). Optimal dietary concentrations of vitamin C and chromiumpicolinate for alleviating the effect of low ambient temperature (6.2°C) on egg production, some egg characteristics and nutrient digestibility in laying hens. *Veterinarni Medicina*, *46*, 229- 236. https://doi.org/10.1002/jtra.10014.
33. Sahin, K., Sahin, N., Onderci, M., Gursu, M. F., & Issi, M. (2003). Vitamin C and E can alleviate negative effects of heat stress in Japanese quails. *Food Agriculture and Environment*, *2*, 244-249.
34. Saki, A. A., Rahmati, M. M. H., Zamani, P., Zaboli, Kh., & Matin, H. R. H. (2010). Can vitamin C elevate laying hen performance, egg and plasma characteristics under normal environmental temperature? *Italian Journal of Animal Science*, *9*, 3.
35. Siahpour, S., Karimi Torshizi, M. A., Shariatmadari, F., & Nick Nafs, F. (2010). Investigating the effect of mineral and vitamin supplementation time on growth and economic performance of broiler chickens. *Journal of Veterinary Research*, *65*(1), 13-18. (In Persian).
36. Swiatkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., Krawczyk, J., Puchała, M., & Jozefiak, D. (2015). Dietary factors improving eggshell quality: An updated review with special emphasis on microelements and feed additives. *World's Poultry Science Journal*, *71*, 83-94. https://doi.org/10.1017/S0043933915000082.
37. Yalçın, S., Ergün, A., Özsoy, B., Yalçın, S., Erol, H., & Onbaşılar, İ. (2006). The effects of dietary supplementation of L-carnitine and humic substances on performance, egg traits and blood parameters in laying hens. Asian-Aust. *Journal Animal Science*, *19*(10), 1478-1483. https://doi.org/10.5713/ajas.2006.1478.
38. Yasar, S., Gokcimen, A., Altunas, I., Yonden, Z., & Petekkaya, E. (2002). Performance and ileal histomorphology of rats treated with humic acid preparations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 86, 257-264. https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2002.00383.x
39. Yoruk, M., Gul, M., Hayirli, A., & Macit, M. (2004). The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. *Poultry Science Journal*, *83*, 84-88. https://doi.org/10.1093/ps/83.1.84.
40. Zhang, Y., Wang, N. J., Zhang, H. J., Wu, S. G., & Qi, H. G. (2017). Effect of dietary supplementation of organic or inorganic manganese on eggshell quality, ultrastructure, and components in laying hens. *Poultry Science*, *96*, 2184-2193.

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 413-425

Effects of Yarrow (*Achillea millefolium*) Essential Oil Compared with Growth Promoter Antibiotic and Probiotic on Growth Performance, Meat Quality, and Immune Response of Broiler Chickens

Hasan Soltaninejad[1], Mohammad Salarmoini[2], Mohsen Afsharmanesh[2], Maziar Jajarmi[3], Moslem Asadikorom[4*]

Received: 24-04-2021 Revised: 01-12-2021 Accepted: 21-12-2021 Available Online: 13-11-2022	**How to cite this article:** Soltaninejad, H., Salarmoini, M., Afsharmanesh, M., Jajarmi, M., & Asadikorom, M. (2022). Effects of Yarrow (*Achillea millefolium*) Essential Oil Compared with Growth Promoter Antibiotic and Probiotic on Growth Performance, Meat Quality, and Immune Response of Broiler Chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 413-425. DOI: 10.22067/ijasr.2021.70009.1019

Introduction: Application of growth-promoting antibiotics in poultry nutrition improves growth, feed intake, feed conversion ratio and reduces mortality. But, due to their persistent effects and increased drug resistance to pathogenic bacteria and the transmission of bacteria to humans through the food chain, the European Union banned their use. One of the natural alternatives is medicinal plants. Because plant products for reasons such as availability, ease of use, reduction of side effects, antibacterial and antioxidant properties, were used to treat some diseases in humans and animals. Among these medicinal plants we can mention yarrow with the scientific name of Achillea millefolium. This plant in addition to high antimicrobial and antioxidant properties; has antifungal properties, stimulates appetite, improves digestion and feed intake, improves the condition of the gastrointestinal tract, etc. This plant also accelerates digestion and shortens the passage of food through the gastrointestinal tract by increasing bile production and enzymatic activity. On the other hand, probiotics are living microorganisms of a nonpathogenic and nontoxic in nature that improve gastrointestinal health and improve performance in birds by improving intestinal microbial balance. According to these cases, this study was performed to evaluate the effect of yarrow essential oil in comparison with a growth-promoting antibiotic and probiotic on performance of broiler chickens.

Materials and Methods: A total of 200 day-old male broiler chicks (Ross 308) were studied in a completely randomized design with five treatments, and four replicates. Experimental diets were: 1) basal diet (control), 2 and 3) basal diets supplemented with 100 and 200 mg/kg of yarrow essential oil, respectively, 4) basal diet supplemented with 200 mg/kg probiotic, and 5) basal diet supplemented with 500 mg/kg antibiotic (flavophospholipol). Body weight and feed intake were measured at the end of each growing period and were used to calculate Performance parameters such as body weight gain, and feed conversion ratio. At the end of the experiment, one bird per each replicate was slaughtered for meat quality tests, including measurements of TBARS, pH, water holding capacity, dripping loss and antibody titer. For TBARS, the amount of fat oxidation of the sample was measured by measuring the amount of malondialdehyde and the microtiter hemagglutination method was used

1- Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Kerman, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
4- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman. Teacher, College of Agriculture, Education, Kerman, Iran.
*Corresponding Author Email: moslemasadi3@gmail.com

to determine the antibody titer produced against sheep erythrocytes.

Results and Discussion: During the whole experimental period, birds received yarrow essential oil at 100 mg/kg diet, showed significantly higher body weight and lower FCR compared to the control group(P <0.05). The lowest feed intake was observed in birds that were fed from the level of 200 mg/kg of yarrow essential oil. However, this effect was significant only in comparison with antibiotic treatment, which showed the highest feed intake (P <0.05). Different results have been reported in this regard which can be related to the type of plant, the amount of active ingredients, the level of the medicinal plant used and the interactions with other components of the diet. The TBARS index, indicating lipid oxidation of meat, in chickens fed with different levels of yarrow essential oil and probiotic were lower compared to the control group and antibiotics. In vitro, researchers have shown that plant essential oils, such as yarrow alkaloids, can reduce free radicals and can be a good alternative to synthetic antioxidants. Also in the study of using a mixture of plant extracts increased the concentration of phenols and decreased the amount of TBARS in the meat of broilers. pH, water holding capacity, dripping loss and cooking loss were not affected by the dietary treatments. The antibody titer against sheep red blood cell (SRBC) was lower in the control group in compare to those fed different levels of yarrow essential oil. In some studies, yarrow has increased humoral immunity with its antimicrobial and antioxidant properties; but, the amount used and the concentration of plant material were also effective.

Conclusion: Based on the results, the use of 100 mg/kg yarrow essential oil increased body weight, improved feed conversion ratio and also increased antibody titer at 42 days of age. On the other hand, the TBARS index in chickens fed with different levels of yarrow essential oil was lower in compare to control group. Finally, according to the results, it can be concluded that the use of yarrow essential oil at the level of 100 mg/kg can be a good substitute to antibiotics in poultry nutrition.

Keywords: Broilers, Meat quality, Probiotic, Yarrow.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تأثیر اسانس بومادران در مقایسه با پادزیست محرک رشد و زیست‌یار باکتریایی بر عملکرد رشد، کیفیت گوشت و پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی

حسن سلطانی‌نژاد[1]، محمد سالار معینی[2]، محسن افشارمنش[2]، مازیار جاجرمی[3]، مسلم اسدی کرم[4]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

سلطانی‌نژاد، ح.، سالار معینی، م.، افشارمنش، م.، جاجرمی، م.، و اسدی کرم، م. (۱۴۰۱). تأثیر اسانس بومادران در مقایسه با پادزیست محرک رشد و زیست‌یار باکتریایی بر عملکرد رشد، کیفیت گوشت و پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴ (۳)، ۴۲۵-۴۱۳.

چکیده

این مطالعه، به‌منظور بررسی تأثیر اسانس گیاه بومادران در مقایسه با پادزیست محرک رشد و زیست‌یار باکتریایی بر عملکرد رشد،کیفیت گوشت و پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی انجام شد. تعداد ۲۰۰ قطعه جوجه خروس گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارهای خوراکی شامل: ۱) جیره پایه، ۲) جیره پایه حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی‌بیوتیک فلاوفسفولیپول، ۳ و۴) جیره‌های پایه حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران و ۵) جیره پایه حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم زیست‌یار باکتریایی تجاری بودند. در این بررسی، صفات عملکردی، کیفیت گوشت و پاسخ ایمنی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران سبب افزایش وزن بدن و بهبود ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با شاهد گردید. همچنین، شاخص تیوباربیتوریک اسید در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف اسانس بومادران و زیست‌یار باکتریایی کمتر از گروه شاهد و فلاوفسفولیپول بود. مقدار pH، ظرفیت نگهداری آب گوشت، افت خونابه و افت در نتیجه پخت و پز گوشت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفندی در شاهد کمتر از مقدار آن در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف اسانس بومادران بود. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت استفاده از اسانس بومادران در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌تواند جایگزین مناسبی برای پادزیست‌ها در تغذیه جوجه گوشتی باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس بومادران، جوجه های گوشتی، زیست‌یار باکتریایی، کیفیت گوشت.

مقدمه

استفاده از پادزیست‌های محرک رشد در تغذیه طیور سبب بهبود رشد، مصرف خوراک، ضریب تبدیل و کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری‌ها می‌شود. ولی به‌دلیل باقی‌ماندن تأثیرات آن‌ها و افزایش مقاومت دارویی به باکتری‌های بیماری‌زا و سرایت باکتری‌ها به انسان از طریق زنجیره غذایی، اتحادیه اروپا استفاده از آن‌ها را منع کرده است (Candan *et al.*, 2003). امروزه پرورش‌دهندگان طیور به دنبال جایگزین‌های مناسبی هستند تا مشکلات حاصل از مصرف پادزیست‌ها را کاهش دهند. یکی از این جایگزین‌های طبیعی، گیاهان دارویی هستند، زیرا فراورده‌های گیاهی از دیرباز بنا به دلایلی مانند در دسترس بودن، راحتی کاربرد، کاهش آثار سوء جانبی، خواص ضدباکتریایی و پاداکسندگی، برای درمان بعضی بیماری‌ها در انسان و حیوانات استفاده

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۴- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان. هنرآموز، هنرستان کشاورزی، آموزش و پرورش، کرمان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: moslemasadi3@gmail.com

DOI: 10.22067/ijasr.2021.70009.1019

می‌شوند (Hernandez *et al.*, 2004) .

از جمله این گیاهان دارویی می‌توان به بومادران اشاره کرد. بومادران گیاهی با نام علمی *Achillea millefolium* از تیره کاسنی‌ها می‌باشد. بومادران معمولی یا هزار برگ گیاهی علفی و یکساله می‌باشد. این گیاه دارویی به مشک چوپان مشهور است. بومادران علف هرز مزارع است و به‌صورت خودرو در دشت‌ها و کنار جاده‌ها و نواحی کوهستانی و مناطق شمال ایران و در کوه‌های کرمان به‌خصوص کوه هزار و کوه بیدخوان بردسیر می‌روید. در طب سنتی، این گیاه دارویی دارای خاصیت ضد تشنج، نیرودهنده، ضد سرفه و ضد قاعدگی و تسکین‌دهنده تنگی نفس می‌باشد(Newall *et al.*, 1996). این گیاه علاوه‌بر خاصیت ضد میکروبی و پاداکسندگی بالا دارای خاصیت ضد قارچی، تحریک‌کننده اشتها، بهبود گوارش‌پذیری و خوراک مصرفی، بهبوددهنده وضعیت محیط دستگاه گوارش و غیره نیز می‌باشد. همچنین این گیاه به‌واسطه افزایش تولید صفرا و فعالیت آنزیمی، سبب بهبود سرعت هضم در دستگاه گوارش می‌گردد(Suresh and Srinivasan, 2007) . استفاده از گیاه بومادران در سطح یک درصد سبب افزایش مصرف خوراک و افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Makinia *et al.*, 2014; Poornia and Eftekhari, 2012) و همچنین در سطح ۱/۵ درصد ضریب تبدیل خوراک را بهبود می‌بخشد (Makinia *et al.*, 2014)، بومادران با فعالیت ضد میکروبی می‌تواند به بهبود سلامت روده کمک کند و جایگزین مناسبی برای پادزیست‌ها باشد (Yakhkeshi *et al.*, 2010). این گیاه با افزایش هتروفیل‌ها موجب افزایش عیار پادتن و بالا بردن پاسخ ایمنی بدن (Nobakht and Aghdam-Shahriar, 2010; Sharifi *et al.*, 2013). و با افزایش غلظت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و سبب بهبود کیفیت گوشت می‌شود (Norouzi *et al.*, 2015).

ترکیبات زیست‌یار باکتریایی می‌توانند به‌عنوان ابزاری در جهت بهبود جمعیت میکروفلور دستگاه گوارش به‌کار روند (Jawad *et al.*, 2016; Golzarand *et al.*, 2004). به‌طور کلی، مکانیسم عمل ترکیبات زیست‌یار باکتریایی در رقابت با عوامل بیماری‌زا برای رشد در روده، تولید مواد ضد میکروبی از قبیل لاکتوفرین، لیزوزیم، باکتریوسین و پادزیست‌های طبیعی، بهبود پاسخ‌های ایمنی دستگاه گوارش و کاهش pH روده می‌باشد (Zhou *et al.*, 2010). مصرف زیست-یارهای باکتریایی می‌تواند شرایطی در دستگاه گوارش ایجاد کند که سبب کاهش اثرات مضر عوامل بیماری‌زا و افزایش اثر ریزجانداران مفید گردد که نهایتاً تقویت سلامت دستگاه گوارش را سبب می‌شود (Dorman and Deans 2000; Zhou *et al.*, 2010). با توجه به نکاتی که در مورد این سه افزودنی جیره طیور به آن اشاره شد، این سوال‌ها مطرح گردید که آیا اسانس بومادران می‌تواند جایگزین مناسبی برای پادزیست باشد یا خیر؟ و همچنین مقایسه بین اسانس بومادران و ترکیبات زیست‌یار باکتریایی و اینکه کدام یک اثرات بهتری بر عملکرد رشد، کیفیت گوشت و پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی دارند و بر این اساس آزمایش پیش‌رو طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۲۰۰ قطعه جوجه خروس گوشتی (راس ۳۰۸) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار (۱۰ پرنده در هر تکرار)، به‌مدت ۴۲ روز مورد استفاده قرار گرفتند. تیمارهای خوراکی شامل: ۱) جیره پایه، ۲) جیره پایه حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آنتی بیوتیک فلاوفسفولیپول، ۳ و۴) جیره‌های پایه حاوی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم اسانس بومادران و ۵) جیره پایه حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم زیست‌یار باکتریایی تجاری بودند. برای انجام این آزمایش اسانس خالص گیاه بومادران از شرکت گلاب زهرا لاله زار کرمان تهیه گردید و سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی- طیف سنج جرمی (GC/MS)[1] مورد آنالیز قرار گرفت. دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به آشکارساز جرمی مدل Varian Saturn 2000، با سیستم تله یونی و با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت با ستون HP-5MS که ستونی به‌طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت داخلی ۰/۲۵ میکرومتر است. فشار گاز سر ستون ۳۵ پوند بر اینچ مربع، درجه حرارت ۴۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش سه درجه سانتی-گراد در دقیقه و درجه حرارت محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفر لاین ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. یک میکرولیتر از اسانس به دستگاه کروماتوگراف گازی تزریق شد و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری (time retention) هر ترکیب، از هر نمونه یک میکرولیتر اسانس به دستگاه GC/MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید (Adams, 2007). برای یکنواخت مخلوط شدن اسانس با خوراک، ابتدا اسانس را در مقدار کمی خوراک مخلوط کرده و سپس خوراک مخلوط شده با اسانس را در میزان خوراک محاسبه شده مخلوط می‌کنیم.

زیست‌یار باکتریایی پارسی‌لاکت از شرکت فرآورده‌های زیستی پردیس رشد مهرگان (فارس- مرکز رشد بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز) با نام تجاری بیواکسیر® حاوی سویه‌های باکتری *باسیلوس کوآگولانس* (10^{11} CFU/g) استفاده شد. پادزیست مورد استفاده در جیره‌ها، فلاوفسفولیپول ۰/۶ درصد از شرکت تولید داروهای دامی تهیه شد که هر کیلوگرم حاوی ۶ گرم فلاوفسفولیپول می‌باشد. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت و کنجاله سویا در سه دوره آغازین (۱-۱۰)، رشد (۱۱-۲۴) و پایانی (۲۵-۴۲) بر اساس احتیاجات غذایی جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ (سال ۲۰۱۴) تنظیم شدند (جدول ۱).

1- Gas Chromatograph-Mass Spectrometer Machine

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره‌های پایه مورد استفاده در پرورش جوجه‌های گوشتی

Table 1- Ingredients and nutrient composition of the basal diets

اجزای خوراک Feed ingredients (%)	۱ تا ۱۰ روزگی 1-10 days of age	۱۱ تا ۲۴ روزگی 11-24 days of age	۲۵ تا ۴۲ روزگی 25-41 days of age
ذرت Corn	48.42	52.30	58.22
کنجاله سویا (پروتئین خام ۴۴٪) Soybean meal (44% CP)	42.00	37.84	32.20
روغن گیاهی Vegetable oil	5.00	5.70	5.70
پودر صدف Oyster shell powder	1.15	1.05	1.00
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	1.75	1.60	1.40
نمک طعام Common salt	0.43	0.43	0.43
دی - ال - متیونین D,L-methionine	0.40	0.32	0.30
ال –لیزین هیدروکلراید L-Lysine HCl	0.25	0.18	0.19
ال– ترئونین L-threonine	0.10	0.08	0.06
مکمل ویتامین و مواد معدنی Vitamin and mineral premix[1]	0.50	0.50	0.50
ترکیب شیمیایی محاسبه شده Calculated chemical composition			
انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (kcal/kg)	3000	3100	3200
پروتئین خام Crude protein (%)	23	21.5	19.5
متیونین Methionine (%)	0.740	0.643	0.599
متیونین + سیستین Methionine + cysteine (%)	1.08	0.99	0.91
لیزین Lysine (%)	1.44	1.29	1.16
ترئونین Threonine (%)	0.8	0.69	0.6
کلسیم Calcium (%)	0.96	0.87	0.79
فسفر قابل دسترس Available phosphorous (%)	0.480	0.435	0.395
سدیم Sodium (%)	0.17	0.16	0.16

[۱] ویتامین‌های تأمین شده توسط مکمل ویتامین (میلیگرم در هر کیلوگرم جیره): رتینول (۳/۷۸)، آلفا توکوفرول استات (۳۰)،کوله کلسیفرول (۰/۰۵۵)، منادیون (۲)، ویتامین B_{12} (۰/۰۱۵)، پیریدوکسین (۰/۳)، تیامین (۱/۸)، ریبوفلاوین (۶/۶)، اسید پانتوتنیک (۱۰)، نیاسین (۳۰)، بیوتین (۰/۱)، کولین (۲۵۰) و فولاسین (۱).
مواد معدنی تأمین شده توسط مکمل معدنی (میلی‌گرم در کیلوگرم جیره): سلنیوم (۰/۲)، مس (۱۰)، ید (۱) آهن (۵۰)، منگنز (۱۰۰) و روی (۸۵).

[1] Vitamins supplied by vitamin supplements (mg per kg of diet): retinol (3.78) alpha tocopherol acetate (30), cholecalciferol (0.055), Menadione (2), Vitamin B12 (0.015), Pyridoxine (0.3), Thiamine (1.8), Riboflavin (6.6), Pantothenic acid (10), Niacin (30), Biotin (0.1), Choline (250) and folacin (1).
Minerals supplied by mineral supplements (mg/kg diet): selenium (0.2), copper (10), iodine (1), iron (50), manganese (100) and zinc (85).

وزن بدن و مصرف خوراک در پایان هر دوره اندازه‌گیری و برای محاسبه صفات عملکردی از جمله وزن نهایی و ضریب تبدیل غذایی

استفاده شدند. در پایان دوره آزمایش، یک پرنده از هر تکرار که میانگینی از پرندگان آن تکرار را از لحاظ وزن، جثه و سلامتی داشت برای انجام آزمایشات کیفیت گوشت ناحیه سینه شامل اندازه‌گیری میزان اسید تیوباربیتوریک[1]، pH، ظرفیت نگهداری آب،[2] میزان خونابه[3] و افت در نتیجه پخت[4]، کشتار گردید.

اندازه‌گیری شاخص (عدد) اسید تیوباربیتوریک

بر اساس روش Tarladgis (Tarladgis *et al.*, 1960) ۰/۵ گرم از نمونه سینه با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول استاک (شامل ۰/۳۷۵ درصد تیوباربیتوریک اسید[1]، ۱۵ درصد تری کلرو استیک[3] و ۰/۲۵ نرمال محلول کلریدریک اسید[4]) به‌وسیله هموژنایزر مخلوط شد. محلول آماده شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفت تا پس از ۱۰ دقیقه رنگ صورتی حاصل از واکنش مالون دی آلدئید با اسید تیوباربیتوریک ایجاد شود. نمونه‌ها از حمام آب جوش خارج و زیر شیر آب سرد شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شد (سرعت ۵۵۰۰ دور در دقیقه، زمان ۲۵ دقیقه). در مرحله بعد، مقدار اکسیداسیون چربی نمونه از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf آلمان، مدل RS 232) در طول موج ۵۳۲ نانومتر ضمن در نظر گرفتن ضریب خاموشی (ε) = ۱۰

معادله (۱)

$$\text{TBA number} = \text{Sample } A_{532} \times 2.77$$

(میلی‌گرم مالون‌دی-آلدئید در کیلوگرم گوشت)

اندازه‌گیری pH

پنج گرم از نمونه گوشت در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر با دستگاه هموژنایزر (ULTRA-TURRAX® آلمان، مدل IKA® T25) هم زده تا یکنواخت گردید، سپس با استفاده از گاز استریل صاف و به‌کمک دستگاه pHمتر(SELECTA اسپانیا، مدل RS 232)، در دمای اتاق، pH نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید (pH متر با بافرهای چهار و هفت کالیبره شد) (Jang *et al.*, 2008).

اندازه‌گیری درصد ظرفیت نگهداری آب (Water Holding Capacity)

یک گرم از نمونه سینه را در کاغذ صافی پیچیده و در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به‌مدت چهار دقیقه در سانتریفیوژ (Hettich آلمان، مدل UNIVERSAL 320R) قرار داده و سرعت سانتریفیوژ روی۱۵۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد. نمونه پس از سانتریفیوژ به‌آرامی با پارچه کتان خشک و وزن شد، سپس نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در آون (شرکت فاطر الکترونیک) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و دوباره وزن گردید. در نهایت، اعداد در معادله ۲ قرار داده و درصد WHC محاسبه شد (Nakamura and Katoh, 1985)

معادله (۲)

$$\text{ظرفیت نگهداری آب} = \frac{\text{وزن پس از خشک شدن (گرم)} - \text{وزن پس از سانتریفیوژ (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری درصد افت خونابه (Dripping Loss)

یک قطعه گوشت سینه بدون چربی و بافت همبند با ضخامت ۲/۵ سانتی‌مترمربع برداشته و وزن گردید (وزن اولیه) و در پوشش پنبه‌ای قرار داده شد، سپس نمونه مورد نظر در پاکت پلاستیکی گذاشته شد. نمونه مورد نظر به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت رطوبت گوشت به‌آرامی به‌وسیله پارچه کتانی گرفته شد و دوباره وزن شد و سپس با معادله ۳ اندازه گیری شد (Christensen, 2003).

معادله(۳)

$$\text{افت خونابه Dripping loss} = \frac{\text{وزن نهایی (گرم)} - \text{وزن اولیه (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری درصد افت در نتیجه پخت (Cooking Loss)

یک سانتی‌متر مکعب از گوشت سینه بریده و وزن گردید. قطعه جدا شده گوشت به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، پس از آن به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، به‌طوری‌که دمای عمق گوشت به ۷۰ درجه سانتی‌گراد برسد. در مرحله آخر نمونه به‌آرامی با پارچه کتان خشک و دوباره وزن شد و در معادله ۴ قرار داده شد (Bertram *et al.*, 2003).

معادله(۴)

$$\text{افت در اثر پختن Cooking loss} = \frac{\text{وزن نهایی(گرم)} - \text{وزن اولیه (گرم)}}{\text{وزن اولیه (گرم)}} \times ۱۰۰$$

برای تعیین عیار پادتن تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفند از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شد (Wegmann and Smithies, 1966). داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار Mini Tab مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای آماری پنج درصد مقایسه شدند.

1- Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)
2- Thiobarbituric (TBA) (sigma,T5)005
3- Trichloroacetic acid (Merck, k46451107)
4- Hydrochloric acid (Merck, k36816017)

نتایج و بحث

تجزیه ترکیبات شیمیایی اسانس بومادران

ترکیب مواد مؤثره اسانس گیاه بومادران در جدول ۲ آورده شده است. گزارش‌های محققین نشان می‌دهد که کمیت و کیفیت ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های بومادران خیلی متفاوت است و ترکیبات شیمیایی و خواص درمانی آن‌ها وابسته به شرایط متنوع اکولوژیکی و اقلیمی در مناطق مختلف جهان متفاوت می‌باشد، به‌طوری‌که با افزایش رشد و توسعه گیاه، میزان برخی ترکیبات کاهش و یا افزایش می‌یابد. ترکیبات عمده آنالیز اسانس حاضر با بسیاری از آنالیزها مشابهت داشت

شاخص‌های عملکرد رشد

تأثیر تیمارهای خوراکی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ آمده است.

در قسمت عملکردی این آزمایش، جوجه‌هایی که از سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران تغذیه کرده بودند، در پایان دوره پرورشی وزن نهایی بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ($P < ۰/۰۵$) و وزن نهایی در سایر تیمارها تغییر قابل توجهی را نسبت به گروه شاهد و همچنین بین خودشان ایجاد نکرد. کمترین میزان مصرف خوراک در کل دوره پرورش مربوط به پرندگانی بود که از سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران تغذیه کرده بودند. البته این اثر فقط در مقایسه با تیمار پادزیست که بیشترین مصرف خوراک را نشان داد، معنی‌دار گردید ($P < ۰/۰۵$). بین سایر تیمارها و از جمله سطح پایین اسانس در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در کل دوره پرورشی، جوجه‌های تغذیه شده با جیره دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران، بهترین ضریب تبدیل را در مقایسه با تیمارشاهد و پادزیست نشان دادند ($P < ۰/۰۵$).

نتایج وزن نهایی این آزمایش با نتایج آزمایش‌های مکی‌نیا (Makinia *et al.*, 2014) و ایمان‌شهیدی و حسین‌زاده (Imanshahidi and Hosseinzadeh, 2008) مطابقت دارد که دلیل آن را ماده‌ای به‌نام پالماتین در گیاه بومادران می‌دانند که این ماده به همراه آلکالوئید موجود در این گیاه موجب واکنش با رادیکال‌های آزاد شده و باعث بهبود افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی می‌شود. در مقابل، تحقیقاتی وجود دارد که به عدم بهبود وزن در جوجه‌های تغذیه شده با گیاه بومادران می‌پردازد (Tarladgis *et al.*, 1960). میزان مصرف خوراک در گروهی که از۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران استفاده کرده بود تغییر خاصی نداشت، ولی بهترین ضریب تبدیل را داشت. مطالعات مختلف در این زمینه نتایج متناقضی را ارائه می دهند. در پژوهشی که به بررسی تأثیر اسانس و روغن‌های ضروری گیاهان آویشن، پونه، رزماری و بومادران بر رشد، عملکرد و هضم مواد مغذی در جوجه‌های گوشتی مربوط بود، مشاهده گردید استفاده از اسانس بومادران منجر به افزایش خوراک مصرفی و بهبود راندمان رشد می‌شود (Cross *et al.*, 2007).

در آزمایشی دیگر نیز نشان داده شد که استفاده از جیره حاوی سطوح مختلف گیاه بومادران تا یک درصد، اثرات مثبتی بر افزایش مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی داشته است (Poornia and Eftekhari, 2012) که نتایج مصرف خوراک در مطالعه حاضر با این گزارش‌ها در توافق نبوده است، ولی در مورد بهبود راندمان رشد مشابهت داشته‌است و در مقابل، در مطالعه دیگری که انجام گرفت، هیچ گزارشی مبنی بر بهبود میزان خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک در اثر افزودن گیاه بومادران به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی مشاهده نشد (Ross *et al.*, 2009). و از سوی دیگر، زمانی که میزان اسانس بومادرا ن به سطح ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرده بود، مصرف خوراک نسبت به گروه پادزیست کاهش یافت. یکی از دلایل محتمل کاهش مصرف خوراک در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس، می‌تواند وجود رایحه و بوی تند اسانس باشد و دلیل تفاوت در نتایج مطالعات مختلف می‌تواند تا حد زیادی مربوط به نوع گیاه دارویی و میزان مواد موثره آن و سطح مورد استفاده گیاه دارویی در جیره و اثرات متقابل آن با سایر اجزای جیره باشد (Lee *et al.*, 2003).

پژوهشگرانی که عقیده دارند این گیاه دارویی به علت مواد مؤثره می‌تواند تأثیرات مثبتی بر عملکرد جوجه‌ها داشته باشد، دلایل متعددی را برای این بهبود عملکرد ذکر می‌کنند، از جمله اینکه احتمال بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های تیمار شده با گیاهان دارویی به‌خاطر اثرات ضد میکروبی و تأثیر این مواد بر افزایش ترشح آنزیم‌های هضمی با توجه به کامل نبودن ظرفیت فعالیت آنزیم‌های هضمی در جوجه‌های گوشتی به‌خصوص در دوره‌های آغازین و همچنین خاصیت پاداکسندگی گیاه بومادران می‌باشد (Kanner, 1994). همچنین عنوان شده است که بومادران موجب افزایش طول پرزهای روده و متعاقباً بهبود عملکرد در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (Yakhkeshi *et al.*, 2010). در آزمایشی دیگر، گزارش شد مهم‌ترین مواد موجود در بومادران پالماتین و متوکسی هیدروکاریاتین می‌باشند (Hossain *et al.*, 2015). این پژوهشگران همچنین عقیده داشتند آلکالوئیدهای موجود در بومادران می‌تواند در واکنش با رادیکال‌های آزاد موجود در بدن از آسیب به سلول‌های زنده جلوگیری نماید. قبلا مشخص شده است که از بین بردن رادیکال‌های آزاد می‌تواند استرس جوجه‌های گوشتی را کاهش داده و متعاقباً ضریب تبدیل خوراک و وزن بدن را بهبود بخشد. آن‌چه از این بحث به‌صورت خلاصه برمی‌آید این است که مکمل‌های گیاهی یا فیتوبیوتیک‌ها به‌منظور افزایش و بهبود راندمان تولید به جیره طیور اضافه می‌گردند و این مواد اثرات خود را بیشتر به‌واسطه فعالیت ضد میکروبی و تأثیر بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و همچنین خواص پاداکسندگی اعمال می‌کنند و موجب بهبود ضریب

تبدیل غذایی و افزایش مواد مغذی و خاصیت محرک رشد در جوجه‌های گوشتی می‌شوند (Golzarand *et al*., 2004).

جدول ۲- آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس بومادران مورد استفاده با دستگاه GC/MS

Table 2- Analysis of chemical compounds of yarrow essential oil used by GC/MS

محدوده Area	زمان ماندگاری Retention time	درصد از کل % of total	اجزا Component	Row ردیف
4.140e+7	3.13	8.62	کامفور Camphor	1
4.019e+7	8.479	8.39	۱،۸_سینئول 1,8-Cineole	2
3.929e+7	3.45	8.211	کامپن Camphene	3
2.008e+7	8.86	4.197	کلسیتریول Calcitriol	4
1.850e+7	7.39	3.879	لینالول Linalool	5
1.506e+7	3.95	3.152	تری‌سایکلن Tricyclene	6
1.2508e+7	5.38	2.613	ایزوبوتیرات ۲-متیل بوتیل 2-Methylbutylisobutyrate	7
1.151e+7	7.94	2.406	کریزانتنون Chrysanthenone	8
1.145e+7	9.3	2.394	بورنئول Borneol	9
7.188e+6	18.7	1.502	بنزوفوران Benzofuran	10
6.038e+6	18.36	1.262	نرولیدول <E-> Nerolidol<E->	11
4.159e+6	20.09	0.869	بتولین Betulin	12
3.058e+6	2.28	0.639	مینتفورانون Mintfuranone	13
2.483e+6	14.61	0.519	تیمول Thymol	14
2.375e+6	5	0.496	ایندنول Indenol	15
2.216e+6	9.66	0.463	نفتالین Naphthalene	16
2.179e+6	5.8	0.455	بنزندیول Benzenediol	17
1.833e+6	13.95	0.393	پیپریتونون Piperitenone	18
1.762e+6	12.64	0.368	کارواکرول Carvacrol	19
4.652e+6	9.74	0.345	α-تریپنول α-Terpineol	20
1.190e+6	14.72	0.249	بنزن Benzene	21

جدول ۳- تأثیر تیمارهای خوراکی بر عملکرد رشد در جوجه‌های گوشتی (۴۲روزگی)

Table 3- The effect of dietary treatments on growth performance of broilers (d 42)

تیمارهای خوراکی Treatments	وزن بدن Body Weight (g/b)	مصرف خوراک Feed Intake (g/b/d)	ضریب تبدیل خوراک FCR[1] (g/g)
جیره پایه Basal diet	2469[b]	95.57[ab]	1.66[a]
جیره پایه + ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 100 mg yarrow essential oil	2675[a]	92.15[ab]	1.48[b]
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 200 mg yarrow essential oil	2533[ab]	91.84[b]	1.56[ab]
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم زیست‌یار باکتریایی Basal diet + 200 mg probiotic	2550[ab]	94.85[ab]	1.61[ab]
جیره پایه + ۵۰۰ میلی‌گرم پادزیست‌ها Basal diet + 500 mg antibiotics	2600[ab]	96.93[a]	1.59[a]
SEM[2]	42.06	1.15	0.028
P- value	0.037	0.028	0.006

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

[۱] ضریب تبدیل خوراک

[۲] خطای استاندارد از میانگین

[a,b] Means within each column with uncommon superscripts differ significantly (p<0.05).

[1] Feed Conversion Ratio

[2] Standard error of the means

کیفیت گوشت

مقدار pH، ظرفیت نگهداری آب، درصد افت خونابه طی پخت و پز گوشت تحت تأثیر تیمارهای خوراکی قرار نگرفت، در حالی‌که شاخص تیوباربیتوریک اسید، که نشان‌دهنده میزان اکسایش چربی گوشت است، در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف اسانس بومادران کمتر از گروه شاهد و پادزیست‌ها بود (جدول ۴). در شرایط آزمایشگاهی، محققان اثبات کرده‌اند که اسانس‌های گیاهی از جمله آلکالوئیدهای بومادران قادر به کاهش رادیکال‌های آزاد بوده و می‌توانند جایگزین مناسبی برای پاداکسندگی‌های مصنوعی باشند (Dehghani *et al.*, 2018) در مطالعه‌ای استفاده از مخلوطی از عصاره‌های گیاهی سبب افزایش غلظت فنول‌ها و کاهش میزان تیوباربیتوریک اسید در گوشت جوجه‌های گوشتی گردید (Jang *et al.*, 2008). استفاده از اجزای فعال گیاهان و ادویه‌ها به‌دلیل دارا بودن ترکیبات آروماتیک فعال سبب افزایش کیفیت لاشه می‌شوند، همچنین از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کنند (Dorman and Deans, 2000). زیست‌یارهای باکتریایی نیز به‌دلیل کنترل واکنش‌های اکسایش در گوشت سبب حفظ فضای ذخیره‌ی آب بین میوفیبریل‌ها و افزایش ظرفیت نگهداری آب می‌شوند، زیرا اکسایش چربی‌ها و پروتئین‌ها و تمام عواملی که وضعیت پروتئین‌های میوفیبریلی را تغییر می‌دهد، در میزان از دست رفتن رطوبت گوشت مؤثر است (Wood and Enser, 1997). افزودن مکمل زیست‌یار باکتریایی به غذای طیور احتمالاً به‌دلیل کاهش مقدار چربی و غلظت اسیدهای چرب غیراشباع گوشت و کنترل روند اکسایش به‌دلیل تولید بیشتر پرواکسیدان‌هایی مانند میوگلوبین و دیگر پروتئین‌های حاوی آهن، سبب بهبود کیفیت نگهداری می‌گردند (Nasehi *et al.*, 2014).

یکی از مهم‌ترین دلایل افت کیفیت گوشت و فراورده‌های گوشتی، اکسایش چربی است که نتیجه آن فاسد شدن، بی‌رنگی و غیر قابل فروش بودن محصول است. رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که به‌خاطر وجود الکترون آزاد بسیار واکنش‌پذیر بوده و آسیب‌های جبران‌ناپذیری را به ماکرو مولکول‌های بدن مانند DNA، پروتئین، لیپید و کربوهیدرات وارد می‌سازند (Mirzaei-Aghsaghali *et al.*, 2012). از طرف دیگر، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که از بین تمامی این مواد، ترکیبات لیپیدی نسبت به رادیکال‌های آزاد دارای بیشترین حساسیت هستند. پراکسیداسیون لیپیدها منجر به مرگ سلول، کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین تولید متابولیت‌های سمی مانند مالون‌دی‌آلدئید می‌شود (Mirzaei-Aghsaghali *et al.*, 2012) در میان بسیاری از روش‌های پیشنهاد شده برای ارزیابی مالون‌دی‌آلدئید، تیوباربیتوریک اسید روش سنجش دقیقی برای اکسید شدن لیپیدها در بافت‌ها به‌ویژه برای گوشت ذخیره شده یا پخته شده حیوانی است. در واقع، مشخص گردیده است پراکسیداسیون چربی‌ها منجر به تخریب غشای سلولی می‌شود (Cheeseman, 1993). محصولات حاصل از اکسایش لیپیدها با از بین بردن ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری گوشت و ایجاد ترکیبات سمی می‌توانند سبب

اثرات نامطلوب از قبیل بیماری‌های التهابی، سرطان و نقص ایمنی در بدن انسان شوند (Kanner, 1994) .

جدول ٤- تأثیر تیمارهای خوراکی بر کیفیت گوشت سینه در جوجه‌های گوشتی

Table 4- The effect of dietary treatments on breast meat quality in broilers

تیمارهای خوراکی Treatments	pH	TBARS [1] (mg/kg)	ظرفیت نگهداری آب WHC [2] (%)	افت پخت ویز Cooking loss (%)	افت خونابه Drippingloss (%)
جیره پایه Basal diet	5.89	0.61[a]	60.75	26.12	7.18
جیره پایه + ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 100 mg yarrow essential oil	6.02	0.33[b]	59.25	32.08	7.43
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 200 mg yarrow essential oil	6.02	0.33[b]	57.25	29.39	7.79
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم زیست‌یار باکتریایی Basal diet + 200 mg probiotic	5.94	0.32[b]	61.25	33.33	6.34
جیره پایه + ۵۰۰ میلی گرم پادزیستها Basal diet + 500 mg antibiotics	6/00	54[a].0	43.7	42.27	6.90
SEM[3]	0.077	0.037	2.198	2.016	0.372
P- value	0.702	0.001	0.714	0.086	0.124

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

[۱] تیوباربیتوریک اسید- ماده فعال(دی‌هید مالون میلی‌گرم/ کیلوگرم)

[۲] ظرفیت نگهداری آب

[۳] خطای استاندارد از میانگین

[a,b] Means within each column with uncommon superscripts differ significantly ($p<0.05$).

[1] Thiobarbituric acid-reactive substance (mg malondialdehyde/kg)

[2] Water holding capacity

[3] Standard error of the means.

در مقابل مواد اکسیدکننده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این بررسی‌ها نشان داد که می‌توان از گیاهان مزبور به‌عنوان مواد آنتی‌اکسیدان طبیعی در پیشگیری و یا درمان بسیاری از بیماری-هایی که عامل بیماری‌زای آن‌ها، پراکسیداسیون لیپید باشد استفاده نمود (Askari *et al.*, 2003). در مطالعه دیگری که انجام گرفت، ماتیوانان و کالیاراسی(Mathivanan and Kalaiarasi, 2007). نشان دادند گیاهان دارویی نسبت به پادزیستها ویرجینامایسین واکنش بدن را نسبت به عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند (SRBC)[1] افزایش می-دهند. برخی از پژوهشگران اعتقاد دارند افزودنی‌های گیاهی از طریق افزایش فعالیت ویتامین C می‌توانند باعث افزایش سطح ایمنی شوند (Cook and Samman, 1996).

پاسخ ایمنی

تأثیر تیمارهای خوراکی بر پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ آمده است. نتایج بررسی‌ها در این زمینه نشان داد که میزان پاسخ ایمنی هومورال در سن ۲۸ روزگی تحت تأثیر تیمارهای خوراکی قرار نگرفت، در حالی‌که این شاخص با افزایش سن در ۴۲ روزگی تحت تأثیر عصاره بومادران قرار گرفت و مقدار آن در شاهد کمتر از تیمارهای دارای سطوح مختلف اسانس بومادران بود.

در آزمایشی، استفاده دو درصدی از پودر بومادران باعث تقویت سیستم ایمنی شد (Nobakht and Aghdam-Shahriar, 2010). برخی از مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد گیاه بومادران با دارا بودن خواص ضد میکروبی و پاداکسندگی، سطح ایمنی هومورال را افزایش داده است، البته مقدار استفاده شده و غلظت ماده گیاهی نیز در اثرگذاری آن موثر بوده است (Stojanovic *et al.*, 1985). همچنین در یک مطالعه دیگر، تأثیر گیاهان بابونه، بومادران و زالزالک بر افزایش مقاومت گلبول‌های قرمز وحفاظت گروههای تیول (SH-)

1- Sheep red blood cell

جدول ۵- تأثیر تیمارهای خوراکی بر عیار پادتن ($\log^2$) بر علیه گلبول قرمز گوسفند

Table 5- The effect of dietary treatments on the antibody titer ($\log^2$) against sheep red blood cell

تیمارهای خوراکی Treatments	۲۸ روزگی 28 days of age	۴۲ روزگی 42 days of age
جیره پایه Basal diet	4.66	5.75^{b}
جیره پایه + ۱۰۰میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 100 mg yarrow essential oil	3.50	9.30^{a}
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس بومادران Basal diet + 200 mg yarrow essential oil	3.00	9.20^{a}
جیره پایه + ۲۰۰ میلی‌گرم زیست‌یار باکتریایی Basal diet + 200 mg probiotic	4.70	7.50^{ab}
جیره پایه + ۵۰۰ میلی‌گرم انتی بیوتیک Basal diet + 500 mg antibiotics	4.2	7.50^{ab}
SEM[1]	0.736	0.060
P- value	0.395	0.011

[a,b] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دارمی باشند (P<0.05).

[۱] خطای استاندارد از میانگین

[a,b] Means within each column with uncommon superscripts differ significantly (p<0.05)

[1] standard error of the means.

این موضوع نیز امروزه مورد پذیرش قرار گرفته است که مصرف مکمل‌های گیاهی می‌تواند منجر به بهبود ایمنی عمومی به شکل افزایش تعداد لکوسیت‌ها، ماکروفاژها و تشدید فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری گردد؛ همچنین خاصیت پاداکسندگی بسیاری از این ترکیبات گیاهی احتمالاً منجر به تقویت سیستم ایمنی و بروز اثرات ضد سرطان می‌شود. در آزمایشی دیگر، مشخص شد گیاه بومادران حاوی سزکوئی ترپن‌ها، آچیلین، آچیلیفلین و ترکیباتی از این دست است که می‌توانند با افزایش تولید و ترشح سیتوکین‌ها، موجب افزایش تیتر پادتن‌ها در بدن و بهبود عملکرد سیستم ایمنی شوند. همچنین، تحقیقات نشان داده است که این خاصیت بومادران می‌تواند با ترکیبات تلخ موجود در آن نیز ارتباط داشته باشد (Makinia, 2014). امّا در سمت مقابل، طغیانی و همکاران (Toghyani *et al.*, 2011) موفق به مشاهده هیچ گونه اثر مهمی از گیاه دارویی بومادران در تولید آنتی‌بادی در برابر ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزا در مرغ‌ها نشدند. این محققین اضافه کردند پارامترهای خونی نیز از لحاظ آماری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت و هیچ تأثیر معنی‌داری بر روی پاسخ ایمنی هومورال مشاهده نشد، امّا نسبت هتروفیل به لنفوسیت به‌طور قابل‌توجهی در جوجه‌های تغذیه شده با زیست‌یار باکتریایی کاهش یافت (Toghyani *et al.*, 2011). مواد گیاهی مورد استفاده در آزمایش‌های مختلف، نوع و ماهیت ماده افزودنی (پودر، عصاره و...)، میزان ماده مؤثره و سطوح مختلف مورد استفاده آن در جیره و اثرات متقابل آن با سایر اجزای جیره و همچنین وضعیت سلامتی گله و دیگر شرایط آزمایش از دلایل ناهمگونی در نتایج گزارشات پژوهشگران مختلف شمرده می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصله، استفاده از سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس بومادران باعث افزایش وزن بدن، بهبود ضریب تبدیل خوراک و همچنین افزایش عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند در سن ۴۲ روزگی گردید. از طرفی، مقدار شاخص تیوباربیتوریک اسید در جوجه-های تغذیه شده با سطوح مختلف اسانس بومادران کمتر از گروه شاهد بود. در نهایت، با توجه به نتایج حاصله می‌توان چنین جمع‌بندی نمود که استفاده از اسانس بومادران در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌تواند جایگزین مناسبی برای پادزیست‌ها باشد و همانند ترکیبات زیست‌یار باکتریایی قادر است تأثیرات سودمندی را در تغذیه جوجه‌های گوشتی داشته باشد.

References

1. Adams, R. P. (2007). Identification of Essential oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. *Allured Publishing Corporation*, USA, 804 p.
2. Askari, S., Naderi, G., Ghannadi, A., Gharipour, M., & Golbon, S. (2003). Protective effect of *Achillea millefolium*, *Crataegus curvisepala* and *Matricaria chamomilla* on oxidative hemolysis of human erythrocytes and -SH capacity. *Journal of Medicinal Plants*, *2*(6), 41-48. (In Persian).
3. Bertram, H.C., H.J., Andersen, A. H., Karlsson, P., Horn, J., Hedegaard, L., Norgaard., & Engelsen, S. B. (2003). Prediction of technological quality (cooking loss and Napole Yield) of pork based on fresh meat characteristics.

Meat Science, 65(2), 707-711. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00272-3

4. Candan, F. M., Unlu, B., Tepe, D., Daferera, M., Polissiou, A., Sokrnen, & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* of on *Asteraceae*. *Journal of Ethnopharmacology*, *87*, 21S-220. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00149-1
5. Casewell, M. C., Friis, E., Marco, P., McMullin, & Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*, 159-161. https://doi.org/10.1093/jac/dkg313
6. Cheeseman, K.H. (1993). Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects of Medicine*, *14*(3), 191-197. https:// doi.org/10.1016/0098-2997(93)90005-X
7. Christensen, L. B. (2003). Drip loss sampling in porcine m. longissimus dorsi. *Meat Science*, *63*(4), 469-477. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00106-7
8. Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *7*, 66-76. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9
9. Cross, D. E., Mcdevith, R. M., Hillman, K., & Agamovic, T. (2007). The effect of herbs and their associated essential oils on performance, digestibilities gut microflora in chickens to 28^{d} of age. *British Poultry Science*, *4*, 496-506. https://doi.org/10.1080/00071660802613286
10. Dehghani, N., Afsharmanesh, M., Salarmoini, M., & Ebrahimnejad, H. (2018). Characterization of pennyroyal (*Mentha pulegium*) essential oil as an herbal, antibacterial, and antioxidant substance. *Comparative Clinical Pathology*, *27*, 1575–1581. https://doi.org/10.1007/s00580-018-2776-4
11. Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, *88*(2), 308-316. https://doi.org/10.1046/j.13652672.2000.00969.x
12. Farahi, A., Kasiri, M., Sudagar, M., Soleimani, I. M., & Zorriehzahra, S. M. J. (2012). Effect of dietary supplementation of *Melissa officinalis* and *aloe vera* on hematological traits, lipid oxidation of carcass and performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Online Journal of Animal and Feed Research*, *2*(1), 1-5.
13. Garcia, V., Catala-Gregori, P., Hernandaz, F., Megias, M.D., & Madrid, J. (2007). Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *Applied Poultry Research*, 16,555-562. https://doi.org/10.3382/japr.2006-00116
14. Golzarand, M., Ebrahimi-Mamaghani, M., Arefhosseini, S. R., & Aliasgarzadeh, A. (2004). Effect of lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFAs processed *Berberis vulgaris* in apple vinegar on in broilers. *South African Journal of Animal Science*, *34*, 119-123.
15. Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., & Megías, M. D. (2004). Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, *83*, 169-174. https://doi.org/10.1093/ps/83.2.169
16. Hossain, M. M., Begum, M., & Kim, I. H. (2015). Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. *Veterinarni Medicina* (Praha), *60*(2), 77-86. doi: 10.17221/7981-VETMED
17. Imanshahidi, M., & Hosseinzadeh, H. (2008). Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytotherapy Research*, *22*, 999-1012. https://doi.org/10.1002/ptr.2399
18. Jaimand, K., & Rezaee, M. B. (2004). Investigation on chemical constituents of essential oils from *Achillea millefolium* L. subsp. millefolium by distillation methods. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *20*(2), 181-190. (In Persian).
19. Jang, A., Liu, X. D., Shin, M. H., Lee, S. K., Lee, B. D., & Lee, J. H. (2008). Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. *Poultry Science*, *87*, 2382-2389. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00506
20. Jawad, H. S., Lokman, I. H., Naji, S.A Zuki, A. B. Z., & Kassim, A. B. (2016). Effect of soluble probiotic on production performance of Akar Putra Chicken. *International Journal of Poultry Science*, *15*(4), 134-138.
21. Kanner, J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, *36*(1), 169-189. https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90040-X
22. Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Yeom, K .H., & Beynen, A. C. (2003). Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, *12*(4), 394-399. https://doi.org/10.1093/japr/12.4.394
23. Makinia, M. (2014). The study of the effects of adding Yarrow to Broiler chickens' ration as the growth stimulant. Bull. Bulletin of Environment. *Pharmacology and Life Sciences*, *3*(12), 64-67.
24. Mathivanan, R., & Kalaiarasi, K. (2007). *Panchagavya* and *Andrographis paniculata* as alternative to anti biotic growth promoters on haematological, serum biochemical parameters and immune status of broilers. *Poultry Science Journal*, *44*, 198-204.
25. Mirzaei-Aghsaghali, A., Syadati, S. A., & Fathi, H. (2012). Some of thyme (*Thymus vulgaris*) properties in ruminant's nutrition. *Annals of Biology Researches*, *3*(2), 1191-1195.

26. Modiri, A., Nobakht, V., & Mehmannavaaz, Y. (2010). Investigation of the effects of different components of nettle, mahogany and cactus on the performance and carcass characteristics of broiler chickens. In: *Proceedings of the 4th Iranian Congress of Animal Science*, pp. 254-252. (In Persian).
27. Nakamura, M., & Katoh, K. (1985). Influence of thawing method on several properties of rabbit meat. *Bulletin of Ishikawa Prefecture College of Agriculture*, *11*, 45–49.
28. Najafi, P., Torki, M., & Modaresi, M. (2008). The effect of adding essential oils of thyme, cinnamon and clove to the diet of broilers. In: *Proceedings of the First Conference on New Technology in Agriculture and Natural Resources*, pp. 1587-1581. (In Persian).
29. Nasehi, B., Chaji, M., Ghodsi, M., & Puranian, M. (2014). Effect of diet containing probiotic on the properties of Japanese quail meat during the storage time. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, *9*(4), 77-86.
30. Newall, C. A., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (1996). Herbal medicines. A guide for health-care professionals. *The pharmaceutical Press, London*, pp. 208-210.
31. Nobakht, A., & Aghdam-Shahriar, H. (2010). The effects of different mixtures of *Malva silvestris*, *AMlhaji maurorum* and *Mentha spicata* medical plants on performance, carcass quality and blood biochemical and immunity. *Journal of Animal Science*, *3*(3), 51- 63. (In Persian).
32. Norouzi, B., Alaw-Qotbi, A. A., Seidavi, A., Schiavone, A., & Martínez, M. A. L. (2015). Effect of different dietary levels of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and Yarrow (*Achillea millefolium*) on the growth performance, carcass traits and ileal micro-biota of broilers, *Italian Journal of Animal Science*, *14*(3), 448-453. https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3930
33. Poornia, K., & Eftekhari, M. (2012). Influence of yarrow on population, size and yield of cellular function as well as protein synthesis rate in broiler chickens (21 days old). Third National Conference of Iranian Agricultural Biotechnology (Plant, Animal and Industrial), Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian).
34. Ross, S. P., Lewis, M. R., Mackenzie, A. M., & Reece, L. P. (2009). Feeding yarrow to assist digestion in broiler chickens. Harper Adams University College, Project Report. www.harper-adams.ac.uk, pp. 86-87.
35. Sharifi, S. D., Khorsandi, S. H., Khadem, A. A., Salehi, A, & Moslehi, H. (2013). The effect of four medicinal plants on the performance, blood biochemical traits and ileal microflora of broiler chicks. *Veterinarski Arhiv*, *83*(1), 69-80.
36. Suresh, D., & Srinivasan, K. (2007). Studies on the *in vitro* absorption of spice principles–curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food and chemical toxicology*, *45*(8), 1437-1442. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.02.002
37. Stojanovic, G., Radulovic, N., Hashimoto, T, & Palic, R. (2005). *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four achillea species: The composition of *Achillea clavennae* L. (*Asteraceae*) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, *101*, 185-190. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.026
38. Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younatan, M. T., & Dudan, L. J. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 37, 44-48. https://doi.org/10.1007/BF02630824
39. Toghyani, M., Tohidi, M., Toghyani, M., Gheisari, A., & Tabeidian, S. A. (2011). Evaluation of yarrow (*Achillea millefolium*) as a natural growth promoter in comparison with a probiotic supplement on performance, humoral immunity and blood metabolites of broiler chicks. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13), 2748-2754.
40. Wegmann, T. G., & Smithies, O. (1966). A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion, 6(1), 67-73. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1966.tb04696.x
41. Wood, J.D., & Enser, M. (1997). Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *British journal of Nutrition*, *78*(01), S49-S60. DOI: https://doi.org/10.1079/BJN19970134
42. Yakhkeshi, S., Rahimi, S., Niknam, A., & Hoseinian, H. (2010). Effects of yarrow (*Achillea millefolium*) levels on carcass characteristics, serum lipids and immune response of broilers. In: *XIIIth European Poultry Conference*, *10*, 23-27.
43. Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., & Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry Science*, *89*(3), 588-593. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00319

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 427-437

Expression of Serine Biosynthesis Pathway Genes in Breast Muscles of Iranian Native Turkeys with Divergent Feed Efficiency

Zahra Pezeshkian[1], Seyed Ziaeddin Mirhoseini[2*], Shahrokh Ghovvati[3], Esmaeil Ebrahimie[4]

Received: 16-01-2022 Revised: 06-02-2022 Accepted: 12-02-2022 Available Online: 13-11-2022	**How to cite this article:** Pezeshkian, Z., Mirhoseini, S. Z., Ghovvati, S. H., & Ebrahimie, E. (2022). Expression of serine biosynthesis pathway genes in breast muscles of Iranian native turkeys with divergent feed efficiency. *Iranian Journal of Animal Science Research, 14*(3), 427-437. DOI: 10.22067/ijasr.2022.74768.1061

Introduction: Feed is the main cost part of poultry production. High feed efficiency poultry produce less feed and less excrement per unit weight gain. Therefore, a comprehensive understanding of the biological mechanisms that control feed efficiency is crucial for the development of optimal breeding and selection strategies. The serine biosynthesis pathway is one of the most important pathways in animals with high feed efficiency. The aim of this study was to investigate the expression of PHGDH, PSAT1 and PSPH genes by real-time PCR in Iranian native turkeys with high and low feed efficiencies.

Materials and Methods: Iranian native male turkeys (n=500) were reared up to 20 weeks of age under standard production guidelines. Then 75 turkeys were randomly selected and placed in separate cages with free access to water and feed from 20 to 24 weeks. Turkeys were ranked based on feed conversion ratio (FCR) and three turkeys with the highest and three turkeys with lowest feed efficiency were selected as high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE) birds, respectively. After slaughter of turkeys, RNA was extracted from breast tissue. Quantity and purity of the extracted RNAs were determined using a nanodrop device and its quality was evaluated using 1% agarose gel electrophoresis. Sequences of PSPH, PHGDH, PSAT1 and RPS7 genes were collected from the NCBI database. The primer was designed using Primer Premier version 5 software. All primers were synthesized by Sinaclon (Iran). In this study, RPS7 gene was used as a reference gene. Then, cDNA synthesis was performed. The best amplification temperature for simultaneous amplification of target and reference genes was determined. Samples were amplified for each gene with 3 replications using real-time PCR reaction. Significance level between treatments for each gene was determined separately using t-test in SAS software version 9.2 ($P<0.05$).

Results and Discussion: Results of ultraviolet light absorption measurements at 260 and 280 nm by the nanodrop device showed that the quantity and quality of RNA extracted from the breast muscle samples were of high purity and not contaminated. The range of RNA concentration of the extracted samples was between 480 to 962 ng/µl and the ratio of absorption at 260 and 280 wavelength was about 2.1, which indicates the good quality of the extracted RNAs. The most suitable temperature was selected for specific binding of primers and simultaneous amplification of target genes and temperature control of 58 °C. To investigate and confirm the specificity of replication, melting curves were created to ensure the specificity of the amplified products, the absence of non-specific bands and secondary structures such as hairpin and primer-dimer structures. The results showed that there was only one narrow peak for each gene. The results of studying the expression of serine biosynthesis pathway genes (PSPH, PHGDH and PSAT1) showed that the expression level of these genes in HFE male turkeys was significantly higher than LFE male. Higher expression of PSPH, PHGDH and PSAT1 genes in HFE animals than in LFE animals indicates activation of the serine amino acid biosynthesis pathway, which itself can provide precursors for the Krebs cycle and purine biosynthesis. Glucose is the main source of metabolic energy in the body. When glucose enters the cell, glycolysis begins in the cytoplasm. The pathway of glycolysis and Glutamine catabolism produces an intermediate metabolite called 3-phosphoglycerate, which is gradually

1- Ph.D. Student, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
2- Professor, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
4- Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Shiraz University, Shiraz, Fars, Iran.
(*-Corresponding Author Email: mirhosin@guilan.ac.ir)

catalyzed to serine by PHGDH, PSAT1, and PSPH. Eventually serine is converted to glycine. Activation of this pathway indicates the higher ability of HFE animals to make better use of energy sources such as glucose, which increases protein production in breast muscle tissue and enhances volume and weight of muscle tissue in HFE turkeys.

Conclusion: The results of this study showed that the expression of serine biosynthesis pathway genes (PSPH, PHGDH and PSAT1) was significantly higher in high feed efficiency turkeys than in low feed efficiency turkeys. In fact, these results at the level of molecular biology show that turkeys with higher feed efficiency cultivate better use of energy received from feed. Activation of this pathway increases the biosynthesis of various amino acids and thus increases protein and muscle mass in birds. The results of this study can be a promising window to introduce genes that affect feed efficiency in order to further investigate the population and larger flocks of birds.

Keywords: Feed efficiency, Gene expression, Real-time PCR, Serine biosynthesis, Turkey.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در ماهیچه سینه بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت

زهرا پزشکیان[۱]، سید ضیا الدین میرحسینی[۲*]، شاهرخ قوتی[۳]، اسماعیل ابراهیمی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

پزشکیان، ز.، میرحسینی، س.ض.، قوتی، ش.، و ابراهیمی، ا. (۱۴۰۱). بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در ماهیچه سینه بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۴۳۷-۴۲۷.

چکیده

خوراک اصلی‌ترین بخش هزینه‌ای در تولید طیور محسوب می‌شود. طیور با بازده غذایی بالا، برای هر واحد افزایش وزن، خوراک کمتری مصرف و مدفوع کمتری نیز تولید می‌کنند. مسیر بیوسنتز سرین یکی از مسیرهای مهم در حیوانات با بازده غذایی بالا است. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های PHGDH، PSAT1 و PSPH توسط روش Real-time PCR در بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی بالا و پایین است. تعداد ۷۵ بوقلمون نر بومی از بین ۵۰۰ بوقلمون نر به‌صورت تصادفی انتخاب و از هفته ۲۰ الی ۲۴ در قفس‌های جداگانه با دسترسی آزاد به آب و خوراک قرار گرفتند. بوقلمون‌ها بر اساس ضریب تبدیل خوراک (FCR) رتبه‌بندی شدند و سه بوقلمون با پایین ترین و سه بوقلمون با بالاترین ضریب تبدیل خوراک به‌ترتیب به‌عنوان پرندگان بازده غذایی بالا (HFE) و بازده غذایی پایین (LFE) انتخاب شدند. بعد از کشتار و استخراج RNA از بافت سینه، سنتز cDNA و آزمون Real-time PCR انجام شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در بوقلمون‌های نر با بازده غذایی بالا به‌طور معنی‌داری بیشتر از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین بود. فعال شدن این مسیر نشان‌دهنده توانایی بالاتر حیوانات با بازده غذایی بالا در استفاده بهتر از منابع انرژی مانند گلوکز است که موجب افزایش پروتئین‌سازی در بافت عضله سینه می‌شود و انرژی به‌دست آمده صرف افزایش وزن بافت عضله در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بوقلمون، بیان ژن، بیوسنتز سرین، بازده غذایی، Real-time PCR.

مقدمه

هزینه خوراک یکی از اجزای مهم پرورش طیور است که ۷۰ درصد از کل هزینه‌های تولید را تشکیل می‌دهد (Case *et al.*, 2012). بنابراین، بازده غذایی (FE[5]) یکی از مهم‌ترین مسائل در برنامه‌های پرورش طیور می‌باشد. بهبود بازده غذایی مصرف خوراک، هزینه تولید، فضولات و آلودگی‌های محیطی را کاهش دهد (Aggrey *et al.*, 2010; Willems, 2014). از طرفی دیگر، در نتیجه پیشرفت ژنتیکی، پرندگان بزرگ‌تر به غذای بیشتری نیاز دارند. با بهبود بازده خوراک

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.

۴- دانشیار، گروه زراعت واصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

(*- نویسنده مسئول: (Email: mirhosin@guilan.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2022.74768.1061

5- Feed efficiency

پرندگانی وجود خواهند داشت که مانند سایر پرندگان غذا می‌خورند، امّا وزن یا افزایش وزن بیشتری دارند (Case *et al*., 2012). درک مبنای اساسی برای داشتن توانایی مطلوب پرنده برای تبدیل خوراک به پروتئین گوشت با کیفیت بالا برای تغذیه جمعیت و حفظ سلامت و پایداری حیوان در آینده مهم است (Kong *et al*., 2011).

بسیاری از تفاوت‌های بیوشیمیایی و عملکردی در یک لاین طیور وجود دارد که به بیان بازده غذایی مربوط می‌شود (Bottje and Carstens, 2009). برای توسعه استراتژی‌های انتخاب کارآمدتر و پایدارتر، بینش‌هایی در مورد اساس بیولوژیکی تفاوت‌ها در بازده غذایی طیور لازم است. گوشت بوقلمون یک منبع پروتئینی ارزشمند در رژیم غذایی افراد است و می‌تواند جایگزین خوبی برای گوشت مرغ باشد. گوشت بوقلمون کلسترول و چربی کمی دارد. این پرنده در برابر بسیاری از بیماری‌ها مقاوم است که باعث کم شدن استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌شود (Salahi, 2014). توده‌های بومی در هر کشور بعنوان یک سرمایه ملی و محصول کلیدی مطرح می‌باشند که حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات بعد از هزاران سال انتخاب طبیعی و با غلبه بر شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند. طیور بومی علاوه‌بر اهمیتی که در بهبود اقتصاد خانوارهای روستایی دارند، یک ذخیره مهم ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی طیور هستند و شناخت دقیق‌تر و کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن‌ها جهت حفظ این ذخایر ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد (Pirani *et al*., 2010). جمعیت بومی هر گونه به‌علت تنوع بالا، دارای پتانسیل زیادی برای اصلاح نژاد است. همچنین جمعیت‌های بومی در برابر شرایط مختلف محیطی مقاوم هستند و تنوع فنوتیپی بالایی دارند (Ebrahimzadeh-Allahabad *et al*., 2015).

مقدار خوراک مصرفی و کارآیی تبدیل آن به انرژی قابل استفاده عوامل مهمی در سرعت رشد و ترکیب بدن حیوانات در طول زندگی است. کنترل ژنتیکی مصرف خوراک با بیان ژن‌های کدکننده گروه متنوعی از مولکول‌ها که شامل هورمون‌ها، گیرنده‌ها، آنزیم‌ها، نوروپپتیدها، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های انتقال‌دهنده است، اعمال می‌شود. در طیور، مصرف خوراک به‌طور مرکزی توسط شبکه‌های عصبی در ساقه مغز و هیپوتالاموس کنترل می‌شود که ورودی‌ها را از اجزای کوتاه‌مدت و بلندمدت مجموعه تنظیم انرژی دریافت می‌کنند. سیستم کوتاه‌مدت که به آن سیستم سیری محیطی نیز می‌گویند، میزان مصرف غذا در هر وعده غذایی را تنظیم می‌کند (Richards, 2003).

مطالعه‌ای برای شناسایی تفاوت‌های متابولیکی در گاو با راندمان غذایی واگرا در چندین بافت انجام شد (Artegoitia *et al*., 2019). متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین یکی از مسیرهای متابولیکی بود که در دوازدهه و بافت چربی معنی‌دار بود. وانگ و کادارمیدین (۲۰۱۹) تجزیه و تحلیل متابولیک را در گاوهای شیری هلشتاین و جرسی با راندمان خوراک بالا و پایین بررسی کردند (Wang and Kadarmideen, 2019). متابولیسم گلایسین، سرین و ترئونین یکی از مسیرهای متابولیکی مهم در این مطالعه گزارش شد. یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2017) گزارش داد که مسیر متابولیسم گلیسین، سرین و ترئونین در خوک‌های HFE[1] فراوانی بیشتری دارد. گلوکز منبع اصلی انرژی متابولیک در بدن است. وقتی گلوکز وارد سلول شد، گلیکولیز در سیتوپلاسم شروع می‌شود. مسیر گلیکولیز یک متابولیت میانی، ۳-فسفوگلیسرات را فراهم می‌کند که توسط PHGDH[2]، PSAT1[3] و PSPH[4] به سرین کاتالیز می‌شود (Pan *et al*., 2021). هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان ژن‌های PHGDH، PSAT1 و PSPH در بوقلمون‌های بومی ایران با بازده غذایی متفاوت با استفاده از تکنیک Real-time PCR است.

مواد و روش‌ها

انتخاب حیوانات و نمونه‌برداری

تعداد۵۰۰ بوقلمون نر تا سن ۲۰ هفتگی تحت دستورالعمل استاندارد در ایستگاه تحقیقات بوقلمون کشور (تاتار) واقع در آذربایجان شرقی، پرورش داده شدند. سپس ۷۵ بوقلمون به‌صورت تصادفی انتخاب و به مزرعه تحقیقاتی دانشگاه گیلان منتقل شدند. بوقلمون‌ها از هفته ۲۰ تا ۲۴ در قفس‌های جداگانه با دسترسی آزادانه به آب و خوراک قرار گرفتند. پرندگان با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی پرورش یافتند. وزن بدن در ابتدا (۲۰ هفتگی) و پایان آزمایش (۲۴ هفتگی) ارزیابی شد. مصرف خوراک با اندازه‌گیری وزن غذای اضافه شده به هر فیدر به‌صورت روزانه و وزن باقیمانده خوراک به‌صورت هفتگی تا پایان دوره آزمایش ثبت شد. ضریب تبدیل خوراک (FCR[5]) به‌صورت زیر محاسبه شد:

معادله (۱)

$$\mathrm{FCR}=\frac{\mathrm{FI(g)}}{\mathrm{WG(g)}}$$

که در آن، FI[6]: کل مصرف خوراک در طول آزمایش و WG[7]:

1- High feed efficiency
2- Phosphoglycerate dehydrogenase
3- Phosphoserine Aminotransferase 1
4- Phosphoserine Phosphatase

5- Feed conversion ratio
6- Feed Intake
7- Weight gain

افزایش وزن بدن طی این مدت است.

در پایان ۲۴ هفتگی بوقلمون‌ها بر اساس FCR رتبه‌بندی شدند و سه بوقلمون با کم‌ترین و سه بوقلمون با بالاترین رتبه FCR به‌ترتیب به‌عنوان پرندگان بازده غذایی بالا (HFE) و بازده غذایی پایین (LFE[1]) انتخاب شدند. پس از کشتار، از بافت ماهیچه سینه هر پرنده نمونه گیری و در تانک ازت ذخیره شد. نمونه بافت‌ها تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰ – نگهداری شدند.

استخراج RNA

استخراج RNA کل از بافت سینه بوقلمون‌ها با استفاده از کیت RNeasy Midi شرکت کیاژن آلمان (Cat# 75144) انجام شد. براساس دستورالعمل استاندارد مقدار ۲۵۰ میلی گرم از بافت مورد نظر وزن شد و درون تیوب‌های مربوط به دستگاه تیشولایزر قرار گرفت. نمونه‌ها به‌مدت حدود یک دقیقه با دستگاه تیشولایزر شرکت کیاژن هموژن و همگن شد. استخراج RNA براساس دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد.

سنجش کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده

کمیت و تعیین خلوص RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ Epoch2 شرکت BioTek ایالات متحده آمریکا سنجیده شد. مقدار ۱/۲ میکرولیتر از آب RNase-free به‌عنوان شاهد و مقدار مشابه از نمونه‌های مورد مطالعه به‌عنوان تیمار در چاهک‌های دستگاه قرارداده شد. غلظت RNA و نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ برای تعیین خلوص و یا آلودگی نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفت. بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام شد.

طراحی آغازگر برای ژن‌های مورد نظر

توالی مربوط به ژن‌های PSPH، PHGDH، PSAT1 و RPS7 از پایگاه داده NCBI دانلود شد. طراحی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسخه پنج انجام شد (جدول ۱). پس از بررسی ویژگی‌های ساختاری و یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها در NCBI، کلیه آغازگرها توسط شرکت سیناکلون (ایران) سنتز شدند. در این پژوهش از ژن RPS7[2] به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد.

آماده‌سازی آغازگرها و سنتز cDNA

آماده‌سازی آغازگرها براساس دستورالعمل استاندارد شرکت سازنده صورت گرفت. سنتز و ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo scientific, #K1621) براساس دستورالعمل شرکت سازنده تحت شرایط دمایی ۲۵˚C به‌مدت پنج دقیقه، ۴۵˚C به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۷۰˚C به‌مدت پنج دقیقه انجام شد.

آزمون Real-time PCR

بهترین دمای تکثیر برای تکثیر همزمان ژن‌های هدف و کنترل داخلی با استفاده از گرادیان دمایی دستگاه Real-time PCR شرکت Roche تعیین شد. تکثیر نمونه‌ها برای هرکدام از ژن‌های PSPH، PSAT1، PHGDH و RPS7 با سه تکرار با استفاده از واکنش Real-time PCR و مقادیر ۶/۲۵ میکرولیتر مسترمیکس SinaSYBERBlue 1X(شرکت سیناکلون، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، ۴/۴۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و یک میکرولیتر نمونه cDNA در حجم کل ۱۲/۷ میکرولیتر با استفاده از برنامه دمایی جدول ۲ انجام شد.

ارزیابی اختصاصیت آغازگرها و محصولات Real-time PCR با استفاده از بررسی منحنی ذوب و الکتروفورز یک درصد انجام شد.

آنالیز نتایج Real-time PCR

آنالیز داده‌های خام برای همه ژن‌های PSPH، PSAT1، PHGDH و RPS7 با استفاده از روش Pfaffle (Pfaffl, 2001) انجام شد. تغییر بیان ژن‌ها در تیمارها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ سنجیده شد. به نحوی که:

معادله (۲)

$$\Delta Ct = Ct(\text{ژن هدف}) - Ct(\text{ژن کنترل داخلی})$$

و

معادله (۳)

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{(PSPH,\ PSAT1\ and\ PHGDH)} - Ct_{(RPS7)})_{HFE} - (Ct_{(PSPH,\ PSAT1\ and\ PHGDH)} - Ct_{(RPS7)})_{LFE}$$

سطح معنی‌داری بین تیمارها برای هر یک از ژن‌ها به تفکیک با استفاده از آزمون t استیودنت در نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 تعیین شد ($P<0.05$).

نتایج و بحث

کمیت و کیفیت RNA

ارزیابی اندازه‌گیری جذب نور فرابنفش در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، توسط دستگاه نانودراپ مشخص نمود که کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از نمونه‌های عضله سینه، خلوص

1- Low feed efficiency

2- Ribosomal protein S7

بـــالا و مطلوب داشته و عاری از آلـودگی بود. دامنه غلظت RNA استخراج شده نمونه‌ها بین ۴۸۰ تا ۹۶۲ نانوگرم در میکرولیتر و نسبت جذب طول موج ۲۶۰/۲۸۰ حدود ۲٫۱ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در Real Time-PCR

Table 1- Primer sequences used for Real-Time PCR

نام ژن Gene name	توالی آغازگرها Primer sequences		اندازه محصول تکثیر شده Amplified product size	کد دسترسی در NCBI Accession code in NCBI
PHGDH	5' CAAAGCATCTGAGACAAACACG 3'	رفت Forward	129	XM_010715700.2
	5' GTTGAGAGCCCGGCTATGC 3'	برگشت Reverse		
PSAT1	5' TATATAACACTCCTCCATGCTACA 3'	رفت Forward	184	XM_019610527.2
	5' CTGCTTCGGTTCTTCTTCTCC 3'	برگشت Reverse		
PSPH	5' GGTTTCAGAGCATCGTGGAG 3'	رفت Forward	226	XM_010721744.3
	5' GCTTCCATGTCTGTAGCTCCATC 3'	برگشت Reverse		
RPS7	5' TGAAGTAGGTGGTGGCAGGAA 3'	رفت Forward	165	NM_001285787.1
	5' CTCGTTGGCTTGGGCAGAA 3'	برگشت Reverse		

جدول ۲- سیکل‌های حرارتی واکنش Real-time PCR

Table 2- Thermal cycles of Real-time PCR reaction

مرحله Step	سیکل‌ها Cycles	درجه حرارت (سانتیگراد) Temperature (˚C)	فرآیند Process	زمان نگهداری (ثانیه) Time (Second)
قبل از تکثیر Pre-amplification	1	94	واسرشت سازی ابتدایی Initial denaturation	180
تکثیر Amplification	40	94	واسرشت سازی Denaturation	30
		59	اتصال Annealing	30
		72	بسط Extension	30
منحنی ذوب Melting curve	1	95	واسرشت سازی Denaturation	10
		65	اتصال Annealing	60
		97	بسط Extension	1

بهینه‌سازی واکنش Real-time PCR

یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن‌های هدف و کنترل واکنش PCR با استفاده از شیب دمایی انجام شد. مناسب‌ترین دما برای اتصال اختصاصی آغازگرها و تکثیر همزمان ژن‌های هدف و کنترل دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید.

بررسی منحنی ذوب و اختصاصیت آغازگرها

برای بررسی و تأیید اختصاصیت تکثیر، منحنی ذوب ایجاد شد تا از اختصاصی بودن محصولات تکثیر شده، عدم وجود باند غیر اختصاصی و ساختارهای ثانویه مانند ساختار سنجاق سری و پرایمر–دایمر اطمینان حاصل شود. نتایج نشان داد که تنها یک پیک بلند و باریک برای هر ژن وجود دارد و نتایج فاقد پیک کوچک‌تر و پهن‌تر از پیک مورد انتظار می‌باشد. بنابراین، نتایج نشان داد که آغازگرها با هم تقابل ندارند و پرایمر دایمر وجود ندارد (شکل ۱).

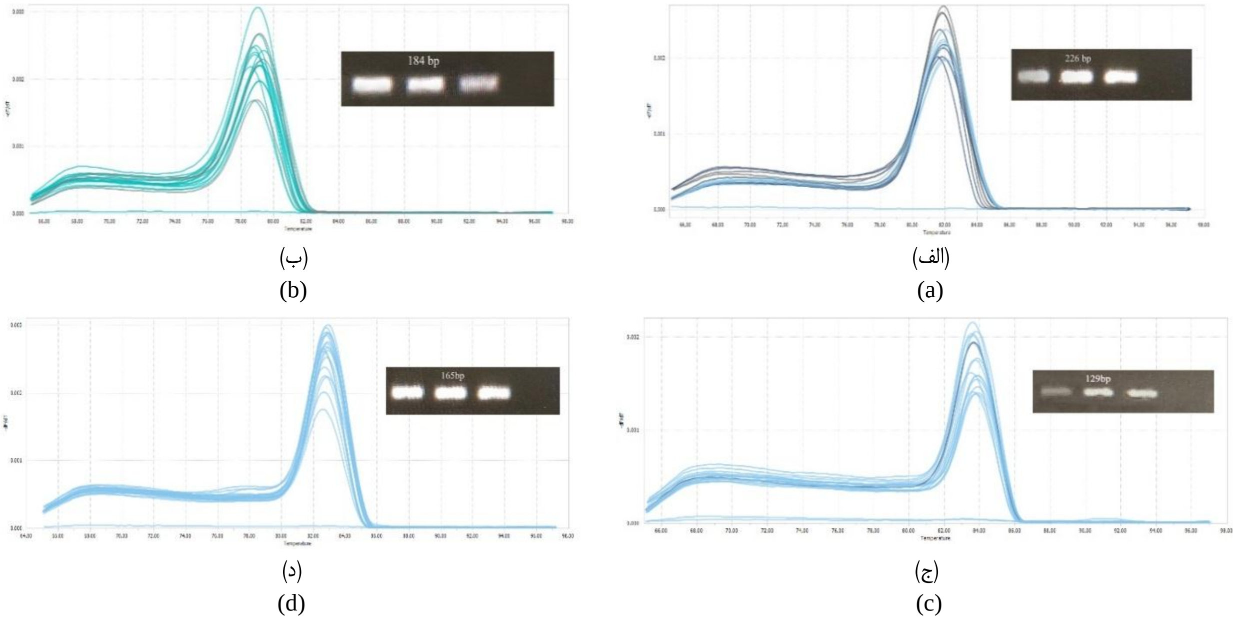
جدول ۳– غلظت و نسبت جذب طول موج 260/280 RNAهای استخراج شده در نمونه‌های عضله سینه

Table 3– RNA concentration and absorption of 260/280 ratio wavelength of in breast muscle samples

نمونه‌ها Samples	غلظت (نانوگرم بر میکرولیتر) Concentration (ng/µl)	نسبت 260/280 260/280 ratio
H[1].1	722.65	2.137
H.2	629.598	2.132
H.3	962.353	2.15
L[2].1	480.531	2.14
L.2	518.764	2.144
L.3	631.453	2.122

[1] H: بوقلمون‌ها با بازده غذایی بالا؛ [2] L: بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین

[1] H: High feed efficiency turkeys
[2] L: Low feed efficiency turkeys



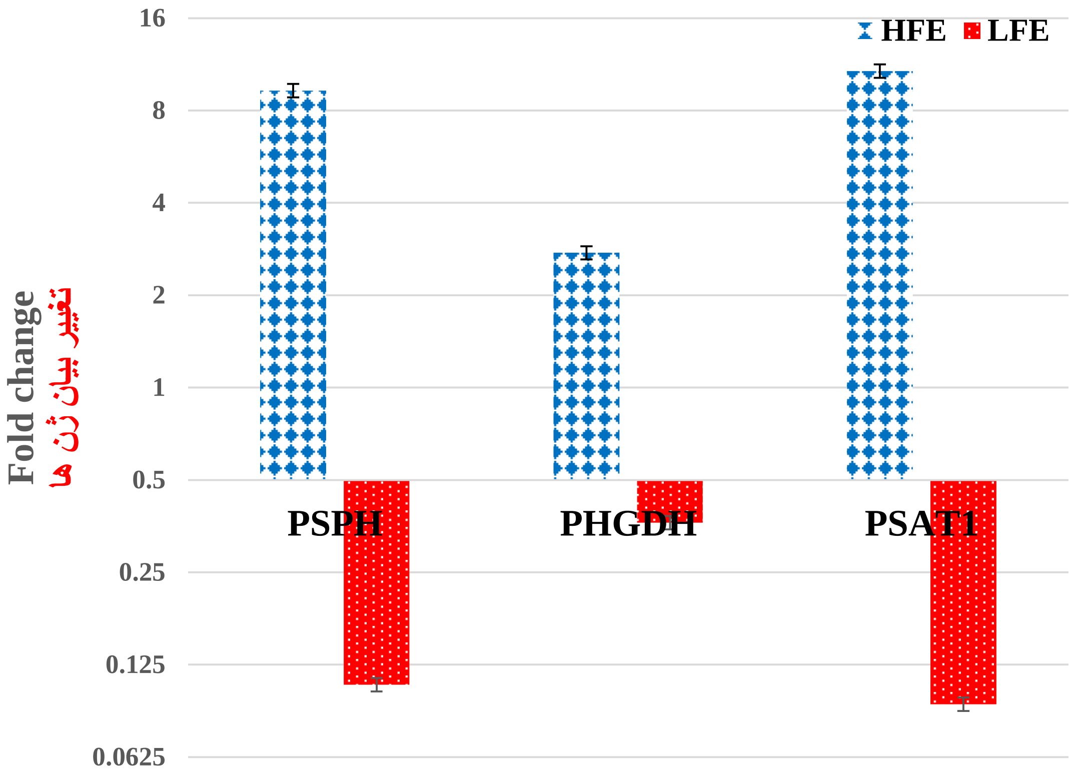
(ب) (b) (الف) (a) (د) (d) (ج) (c)

شکل ۱– منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن‌ها و تصویر این محصولات بر روی ژل آگارز. الف) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PSPH، (ب) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PSAT1 و (ج) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن PHGDH، (د) منحنی ذوب محصولات Real-time PCR ژن RPS7

Figure 1- Melting curve of Real-time PCR products of genes and image of these products on agarose gel. a) Melting curve of Real-time PCR products of PSPH gene, (b) Melting curve of Real-time PCR products of PSAT1 gene and (c) Melting curve of Real-time PCR products of PHGDH gene, (d) Melting curve of Real-time PCR products of RPS7 gene

بررسی بیان ژن‌ها:

بیان ژن‌های PSPH، PSAT1 و PHGDH در حیوانات با بازده غذایی بالا و بازده غذایی پایین براساس تعداد کپی mRNA (Ct) هر ژن نسبت به ژن رفرنس با استفاده از Real-time PCR ارزیابی شد. نتایج ارزیابی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین که شامل ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 می‌باشد، نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در بوقلمون‌های نر با بازده غذایی بالا (HFE) به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین (LFE) بیشتر می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲– بیان ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 در بوقلمون‌های بومی نر با بازده غذایی بالا (HFE) و پایین (LFE)

Figure 2 - Expression of PSPH, PHGDH and PSAT1 genes in male native turkeys with high feed efficiency (HFE) and low feed efficiency (LFE)

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR نشان داد که بیان ژن PSPH در حیوانات با بازده غذایی بالا (HFE) ۹/۲۹ افزایش و در حیوانات با بازده غذایی پایین (LFE) کاهش بیان داشت (P<0.05). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR برای ژن PHGDH نشان داد که بیان این ژن در حیوانات HFE ۲/۷ افزایش و در حیوانات LFE کاهش بیان داشت (P<0.05). نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR نشان داد که بیان ژن PSAT1 در حیوانات HFE ۱۰/۷۶ افزایش و در حیوانات LFE کاهش بیان داشت (P<0.05).

نتایج این پژوهش ثابت نمودند که بیان ژن PSPH در حیوانات HFE به‌طور معنی‌داری بالاتر از حیوانات LFE است (p<0.05). بیان ژن PHGDH هم در حیوانات HFE به‌طور معنی‌داری بالاتر از حیوانات LFE بود (p<0.05). همچنین نتایج نشان‌دهنده معنی‌دار بودن بیان بالاتر ژن PSAT1 در حیوانات HFE نسبت به LFE می‌باشد (p<0.05). نتایج حاصل از بررسی ژن های مسیر بیوسنتز سرین حاکی از بالاتر بودن معنی‌دار بیان ژن‌های این مسیر در حیوانات با بازده غذایی بالا نسبت به بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین است (p<0.05). بیان ژن PSPH در حیوانات با بازده غذایی بالا چندین برابر حیوانات با بازده غذایی پایین بود که نشان‌دهنده بیان بیشتر این ژن در حیوانات HFE نسبت به LFE می‌باشد. بیان ژن PHGDH در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از بوقلمون‌های با بازده غذایی پایین بود (p<0.05). ژن PSAT1 بیشترین بیان را در بین سه ژن مسیر بیوسنتز سرین داشت. بیان این ژن هم در بوقلمون‌های با بازده غذایی بالا چندین برابر بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین بود (p<0.05).

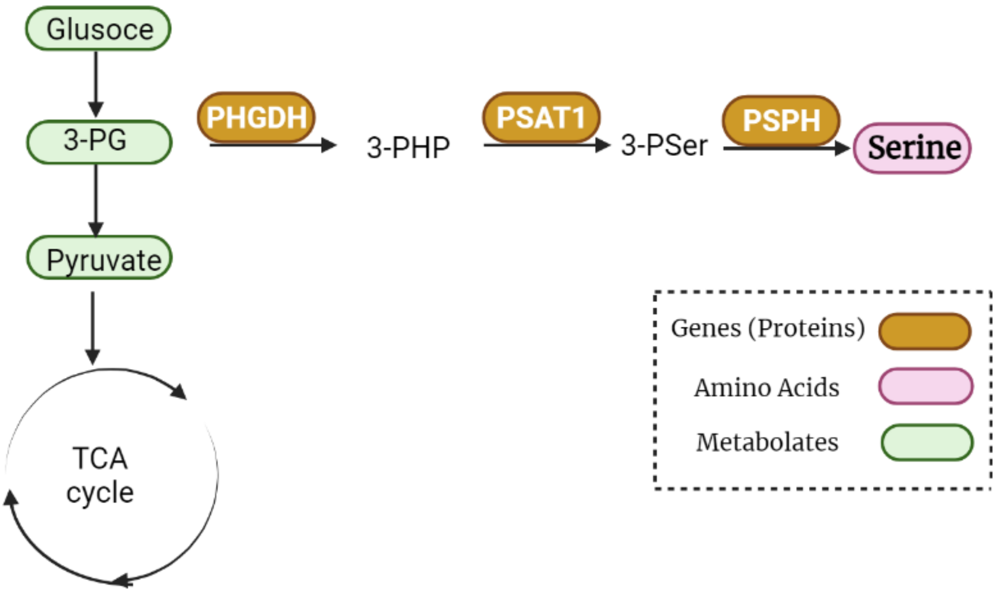
فسفوهیدروکسی ترئونین آمینوترانسفراز (PSAT1) آنزیمی است که مسئول تبدیل ۳- فسفوهیدروکسی پیروات به فسفوسرین است. PSAT1 در بیوسنتز سرین و در نتیجه، در بیوسنتز اسیدهای آمینه دیگر دخیل است. گونگ (Gong, 2010) با استفاده از آنالیز میکروآرایه، مسیرهای سیگنال‌رسانی رشد در ماهیچه اسکلتی گوسفندان را بررسی نمود. نتایج مطالعه وی نشان داد که مسیرهای مرتبط با فعالیت ژن

PSAT1 فعال شده‌اند. فعال شدن این ژن به معنی افزایش سنتز پروتئین و افزایش حجم و وزن عضله است. افزایش بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین در هایپرتروفی ماهیچه اسکلتی گوسفند نیز گزارش شده است (Parr *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای بر روی گاوهای گوشتی، فونسکا و همکاران (Fonseca *et al.*, 2019) به بررسی پروتئومیکس کبد حیوانات با بازده غذایی بالا و پایین پرداختند. نتایج حاکی از فعال شدن مسیر بیوسنتز اسیدآمینه‌ها و افزایش بیان ژن PSAT1 بود.

فسفوگلیسرات دهیدروژناز (PHGDH) اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز اسیدآمینه سرین است. این آنزیم مسئول تبدیل ۳- فسفوگلیسرات به ۳- هیدروکسی پیروات است. ژو (۲۰۱۵) از تکنیک RNA-Seq برای بررسی اساس بیولوژیکی تنوع بازده غذایی در جوجه‌های گوشتی استفاده کرد. نتایج این مطالعه افزایش بیان ژن‌های PSAT1 و PHGDH و فعال شدن مسیر بیوسنتز سرین را گزارش کرد (Zhou *et al.*, 2015).

فسفوسرین فسفاتاز (PSPH) موجب تبدیل ۳- فسفوسرین به اسیدآمینه سرین می‌شود. این آنزیم نیز نقش مهمی در بیوسنتز اسیدهای آمینه دارد. گزارش شده است که خوک‌های HFE توده عضلانی بیشتری در مقایسه با خوک‌های LFE در ماهیچه سینه خود جمع کرده‌اند (Xu *et al.*, 2020). این افزایش در توده عضلانی نشان‌دهنده فعال شدن مسیرهای منتهی به ساخت پروتئین و اسیدآمینه است که موجب افزایش حجم و وزن عضله اسکلتی می‌شوند.

بیان بالاتر ژن‌های PSPH، PHGDH و PSAT1 در حیوانات HFE نسبت به حیوانات LFE نشان‌دهنده فعال شدن مسیر بیوسنتز اسیدآمینه سرین است که خود این اسیدآمینه می‌تواند پیش سازهایی را برای چرخه کربس و بیوسنتز پورین فراهم کند (شکل ۳). گلوکز منبع اصلی انرژی متابولیک در بدن است. وقتی گلوکز وارد سلول می‌شود، گلیکولیز در سیتوپلاسم شروع می‌شود. مسیر گلیکولیز و کاتابولیسم گلوتامین یک متابولیت میانی به‌نام ۳- فسفوگلیسرات ایجاد می‌کند که به‌تدریج توسط PHGDH، PSAT1 و PSPH به سرین کاتالیز می‌شود. در نهایت، سرین به گلیسین تبدیل می‌شود (Pan *et al.*, 2021).



شکل ۳- مسیر بیوسنتز سرین

Figure 3 - Serine biosynthesis pathway

3-PG: ۳-فسفوگلیسرات، 3-PHP: ۳-فسفوهیدروکسی پیروات، 3-Pser: ۳-فسفوسرین، TCA: اسید تری کربوکسیلیک

3-PG: 3-Phosphoglycerate, 3-PHP: 3-Phosphohydroxy pyruvate, 3-Pser: 3-Phosphoserin, TCA: Tricarboxylic acid

در حیوانات با بازده غذایی بالاتر، مسیر بیوسنتز سرین فعال‌تر است و در نتیجه، حیوانات HFE توانایی بالاتری در استفاده بهتر از منابع انرژی مانند گلوکز نسبت به حیوانات LFE دارند. مسیر بیوسنتز سرین موجب افزایش تولید آمینواسیدها و افزایش پروتئین‌سازی در بافت عضله سینه می‌شود. بنابراین، انرژی به‌دست آمده به‌جای اینکه به‌صورت چربی ذخیره شود، به‌صورت پروتئین ذخیره می‌شود و موجب افزایش حجم و وزن بافت عضله در بوقلمون‌های HFE می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

شناخت اساس و بنیان مولکولی صفت بازده غذایی به شناسایی بیومارکرهای مهم و استفاده از آن‌ها در استراتژی‌های اصلاح نژادی

بسیار کمک می‌کند. انتخاب حیوانات با بازده غذایی بهتر موجب کاهش هزینه‌های پرورش و آلودگی‌های زیست محیطی می‌شود. مسیر بیوسنتز سرین یکی از مسیرهای مهم در بازده غذایی است. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سرین (PHGDH ،PSPH و PSAT1) در بوقلمون‌های بازده غذایی بالا به‌طور معنی‌داری بالاتر از بوقلمون‌ها با بازده غذایی پایین بود. در واقع، این نتایج در سطح بیولوژی مولکولی نشان می‌دهند که بوقلمون‌ها با بازده غذایی بالاتر استفاده بهتری از انرژی دریافتی از خوراک در طول دوره پرورش می‌نمایند. فعال شدن این مسیر موجب افزایش بیوسنتز اسیدهای آمینه مختلف و در نتیجه، افزایش پروتئین و توده عضله در پرندگان می‌شود. نتایج این پژوهش می‌تواند پنجره‌ای امیدبخش جهت معرفی ژن‌های اثرگذار بر صفت بازده غذایی به‌منظور بررسی بیشتر در سطح جمعیت و گله‌های بزرگ‌تر پرندگان باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۵۸۳۶۶۱۱ و کمک مالی شماره ۹۸۰۳۰۴ ستاد توسعه زیست فناوری انجام شده است.

References

1. Aggrey, S. E., Karnuah, A. B., Sebastian, B., & Anthony, N. B. (2010). Genetic properties of feed efficiency parameters in meat-type chickens. *Genetic Selection Evolution*, *42*, 25. https://doi.org/10.1186/1297-9686-42-25
2. Artegoitia, V. M., Foote, A. P., Lewis, R. M., & Freetly, H. C. (2019). Metabolomics profile and targeted lipidomics in multiple tissues associated with feed efficiency in beef steers. *ACS Omega*, *4*(2), 3973-3982. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02494
3. Bottje, W., & Carstens, G. (2009). Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of Animal Science*, *87*(suppl_14), E48-E63. https://doi.org/10.2527/jas.2008-1379
4. Case, L. A., Wood, B. J., & Miller, S. P. (2012). The genetic parameters of feed efficiency and its component traits in the turkey (Meleagris gallopavo). *Genetic Selection Evolution*, *44*, 2. https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-2
5. Ebrahimzadeh-Allahabad, A., Mahmodian, Z., Pezeshkian, Z., & Mollaei, A. (2015). Estimation of genetic and phenotypic parameters of some important economic traits in Khazak native hen in Iran. *Animal Genetic Resources/Resources Génétiques Animales/Recursos Genéticos Animales*, *57*: 99-103. https://doi.org/10.1017/S2078633615000272
6. Fonseca, L. D., Eler, J. P., Pereira, M. A., Rosa, A. F., Alexandre, P. A., Moncau, C. T., Salvato, F., Fernandes, L. R., Palmisano, G., Ferraz, J. B. S., & Fukumasu, H. (2019). Liver proteomics unravel the metabolic pathways related to feed efficiency in beef cattle. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41813-x
7. Gong, S. (2010). Identification of nover growth signalling pathway in sheep skeletal muscle by comparative microarray analysis. Doctoral dissertation. University of Nottingham. The UK.
8. Kong, B. W., Song, J., Lee, J., Hargis, B., Wing, T., Lassiter, K., & Bottje, W. (2011). Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes. *Poultry Science*, *90*(11), 2535-2547. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01435
9. Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X., & Wang, H. (2021). Serine, glycine and one‑carbon metabolism in cancer. *International Journal of Oncology*, *58*(2), 158-170. https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5158
10. Parr, T., Al-Doski, S., Hemmings, K., Daniel, Z., Brown, D., Lu, C., Hodgman, C., May, S., & Brameld, J. (2015). Increased expression of serine biosynthetic pathway genes is associated with skeletal muscle hypertrophy in sheep. *Proceedings of the Nutrition Society*, *74*(OCE2). https://doi.org/10.1017/S0029665115002013
11. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9): e45-e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45
12. Pirani, N., Elyasi Zarringhabaei, G. H., & Taghizadeh, A. (2010). Genetic relationship of 6 Iranian native chicken populations using RAPD markers. *Animal Science Researches*, *19*(1), 69-79 .
13. Richards, M. (2003). Genetic regulation of feed intake and energy balance in poultry. *Poultry science*, *82*(6), 907-916. https://doi.org/10.1093/ps/82.6.907
14. Salahi, A. (2014). A review of the turkey meat production industry in Iran. *Zootec International*, *36*, 24-29.
15. Wang, X., & Kadarmideen, H. N. (2019). Metabolomics analyses in high-low feed efficient dairy cows reveal novel biochemical mechanisms and predictive biomarkers. *Metabolites*, *9*(7): 151. https://doi.org/10.3390/metabo9070151
16. Willems, O. W. (2014). Evaluation methods and technologies for improving feed efficiency in the turkey (Meleagris gallopavo). Doctoral dissertation. University of Guelph. Guelph. Canada.
17. Willems, O. W., Miller, S. P., & Wood, B. J. (2013). Assessment of residual body weight gain and residual intake and body weight gain as feed efficiency traits in the turkey (Meleagris gallopavo). *Genetics Selection Evolution*, *45*(1), 26. https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-26

18. Xu, C., Wang, X., Zhuang, Z., Wu, J., Zhou, Sh., Quan, J., Ding, R., Ye, Y., Peng, L., Wu, Z., Zheng, E., & Yang, J. (2020). A transcriptome analysis reveals that hepatic glycolysis and lipid synthesis are negatively associated with feed efficiency in DLY pigs. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66988-6
19. Yang, H., Huang, X., Fang, S., He, M., Zhao, Y., Wu, Z., Yang, M., Zhang, Zh., Chen, C., &Huang, L. (2017). Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1555. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01555
20. Zhou, N., Lee, W. R., & Abasht, B. (2015). Messenger RNA sequencing and pathway analysis provide novel insights into the biological basis of chickens' feed efficiency. *BMC Genomics*, *16*(1), 1-20. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1364-0

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 439-446

Evaluation of BMP2 Gene Exon 1 Polymorphism and its Effect on Weight of Tail in Fat-tailed Lori Bakhtiari Sheep

Ali Forouharmehr[1]*, Majid Khaldari[1]

Received: 07-10-2021
Revised: 27-10-2021
Accepted: 14-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Forouharmehr, A., & Khaldari, M. (2022). Evaluation of BMP2 gene exon 1 polymorphism and its effect on weight of tail in fat-tailed Lori Bakhtiari Sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research, 14*(3), 439-446
DOI: 10.22067/ijasr.2021.72931.1043

Introduction: Having a fat tail is a characteristic of some Iranian native sheep breeds, whose main role is usually to store energy for using in limited food conditions. However, the amount of energy required to store fat in this tissue directly affects the efficiency of meat production and carcass quality. In Iran, the average weight of each carcass is about 15.3 kg, of which 15% is the fat tail. It requires 1.7 kg more feed per kilogram of fat tail than meat (protein), and customers pay a lower price per unit of weight for sheep with heavier fat tail. Today, researchers in the field of animal breeding have a special focus on reducing the weight of the fat tail and increasing the marketability of sheep carcasses. Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) belongs to the β-metamorphic growth factor of the β family and plays an important role in bone and cartilage development and, therefore, seems to be the best candidate for the fat-tailed phenotype. Comparison of the results of genotype obtained from Ovine SNP50K Bead Chip in tow fat-tailed breeds with the results obtained in 13 thin tail breeds showed a missense mutation in BMP2 gene, with the frequency of different alleles in these two different groups.

Materials and Methods: In this study, in order to detect the polymorphism in BMP2 gene exon 1 and investigation of its relationship with tail fat trait, blood samples from 150 same age ewes of Lori Bakhtiari breed were randomly taken which are maintained in Gahar Dorud sheep breeding center (Dorud, Lorestan). DNA extraction was performed using a special DNA extraction kit (Pars Toos, Iran) according to the manufacturer's instructions. Determination of quality and quantity of extracted DNA was performed using agarose gel electrophoresis and nanodrop spectrophotometer, respectively. BMP2 gene exon 1 was amplified successfully by a pair of specific primer. The accuracy of this process was confirmed by 1.5% agarose gel. Then, using PCR-SSCP technique, 12% polyacrylamide gel and silver nitrate staining, probable polymorphisms were tracked in this position and finally calculation of Chi-square test ($\chi 2$) for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) has been assessed by Popgen (Ver. 1.32) software. The relationship between genotypes and average fat tail weight (Corrected by body weight (BW)) has been analyzed with the PROC GLM procedures in Statistical Analysis System (SAS) v. 9.1 version.

Results and Discussion: Based on the results, amplification of BMP2 gene exon 1 was successfully done and three different patterns of polymorphism have been detected through SSCP analysis. Exon 1 of BMP2 gene in Lori Bakhtiari ewes containing A and B alleles with distributions of 197 and 103 and frequency of 65.7% and 34.33%, respectively, that have generated AA, AB and BB genotypes with distribution of 75, 47 and 28 and frequencies of 50%, 31.33% and 18.67%, respectively. Mean comparison of fat tail weight in each genotype using Duncan procedure showed that the effect of genotype on fat tail weight in Lori Bakhtiari breed was significant ($P < 0.05$). AA genotype with average fat tail weight of 5.16 showed higher performance than AB genotype with average fat tail weight of 4.29 and BB genotype with average fat tail weight of 3.76. The results of statistical analysis also showed that the presence of allele A causes heavier fat tail weight and the presence of B allele causes lower fat tail weight ($P < 0.05$). Heterozygosity and Homozygosity observed in this study are 0.3154 and 0.6846, respectively. The significance of the calculated chi-square genotypic frequency in each population at the level of 0.05 in comparison with the chi-square table shows that the studied populations are not

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
* Corresponding Author Email: forouharmehr.a@lu.ac.ir

in Hardy-Weinberg equilibrium. Which can be attributed to the pressure of selecting on reference population for genetic breeding for fat tail weight at Gahar Dorud sheep breeding center. Today, advances in genomic technologies have multiplied, and if information on loci associated with meat quality traits can be obtained and the genes that control these traits are located on chromosomal sites, they can be incorporated into breeding programs. Breeds should be used with MAS and cause genetic growth and development of these traits.

Conclusion: Using molecular detection methods and identifying sheep carrying B alleles and selecting them as the parents of the next generation, we can move towards producing herds with lower fat tail weight and more marketability.

Keyword: BMP2, Fat tail, Lori Bakhtiari sheep, PCR-SSCP, Polymorphism.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

بررسی چند شکلی اگزون یک ژن BMP2 و تأثیر آن بر وزن دنبه در گوسفندان دنبه‌دار نژاد لری بختیاری

علی فروهرمهر[1]*، مجید خالداری[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۳

فروهرمهر، ع. و خالداری، م. (۱۴۰۱). بررسی چند شکلی اگزون یک ژن BMP2 و تـأثیر آن بـر وزن دنبـه در گوسـفندان دنبـه‌دار نـژاد لـری بختیاری. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴ (۳)، ۴۴۶-۴۳۹.

چکیده

وزن دنبه از جمله عوامل تأثیرگذار بر کیفیت لاشه در گوسفندان است. امروزه پژوهشگران در حوزه اصلاح نژاد دام تمرکز ویژه‌ای بر کم کردن وزن دنبه و افزایش بازارپسندی لاشه گوسفند دارند. در این مطالعه، با هدف بررسی وقوع چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 و ارتباط آن با صفت چربی دنبه، ابتدا از ۱۵۰ رأس میش نژاد لری بختیاری خون‌گیری شد و پس انجام فرایند استخراج DNA، اگزون یک ژن BMP2 توسط یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر شد. سپس با استفاده از تکنیک PCR-SSCP چند شکلی در این جایگاه ردیابی و در نهایت، داده‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزارهای Popgene و SAS ارزیابی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، اگزون یک ژن BMP2 حاوی دو آلل A و B به‌ترتیب با توزیع ۱۹۷ و ۱۰۳ و فراوانی ۶۵/۷ درصد و ۳۴/۳۳ درصد بود که سه ژنوتیپ AA، AB و BB به‌ترتیب با توزیع ۷۵، ۴۷ و ۲۸ درون جمعیت به‌ترتیب فراوانی‌های ۵۰ درصد، ۳۱/۳۳ درصد و ۱۸/۶۷ درصد را به‌وجود آوردند. مقایسه میانگین وزن دنبه در هر یک از ژنوتیپ‌ها با استفاده از رویه دانکن نشان داد که اثر ژنوتیپ بر وزن دنبه در نژاد لری بختیاری در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است. ژنوتیپ AA میانگین وزن دنبه ۵/۱۶، ژنوتیپ AB میانگین وزن دنبه ۴/۲۹ و ژنوتیپ BB میانگین وزن دنبه ۳/۷۶ را نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که می‌توان با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی و شناسایی گوسفندان حامل آلل‌های B و انتخاب آن‌ها به‌عنوان والدین نسل بعد می‌توان گله‌هایی با وزن دنبه کمتر و بازارپسندی بیشتر ایجاد نمود.

واژه‌های کلیدی: چربی دنبه، چند شکلی، گوسفند لری بختیاری، BMP2، PCR-SSCP.

مقدمه

امروزه در میان تولیدات عمده‌ای که در بخش کشاورزی وجود دارد، محصولات مرتبط با گوسفند اعم از گوشت، پشم و شیر اهمیت به‌سزایی دارند. از طرفی، در بازار کشورهای آسیای میانه و شرق و غرب آفریقا تقاضای زیادی برای گوسفند زنده به‌عنوان گوشت تازه وجود دارد. مصرف‌کنندگان نیز معمولاً لاشه با چربی کمتر را می‌پسندند. بنابراین، مجموع این عوامل پرورش‌دهندگان را به‌سمت پرورش گله‌هایی با میزان گوشت بیشتر و چربی کمتر سوق می‌دهند (Khaldari and Kalfari, 2014; Wood *et al.*, 2008). تاکنون آزمایش‌های مختلفی با هدف کاهش چربی دنبه در گوسفند انجام شده است که از آن جمله می‌توان به انواع آمیزش‌ها با نژادهای دم‌دار خارجی، قطع دنبه پس از تولد دام‌ها، کاهش طول دوره پرورش و استفاده از آنتی‌بیوتیک اشاره نمود. برآیند تحقیقات مذکور ثابت کرده است که در عمل هیچ یک از این روش‌ها مفید نبوده‌اند (Khaldari *et al.*, 2007).

در حال حاضر، جمعیت گوسفند و بره کشور حدود ۵۳ میلیون رأس است که سالانه حدود ۱۱ میلیون رأس آن کشتار می‌شود. میانگین وزن لاشه هر رأس حدود ۱۵/۳ کیلوگرم است که ۱۵ درصد

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: forouharmehr.a@lu.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.2021.72931.1043

این مقدار را دنبه تشکیل می‌دهد، به عبارت دیگر، سالانه ۲۵۲۴۵ تن دنبه تولید می‌شود (Khaldari and Kalfari, 2014). دنبه از یک طرف بر سلامت مصرف‌کننده اثر دارد که سبب ایجاد بیماری‌های قلبی- عروقی می‌شود و از طرف دیگر، با منافع ملی و اقتصاد تولیدکننده در تضاد است، زیرا هر کیلوگرم دنبه نسبت به گوشت (پروتئین) به ۱/۷ کیلوگرم خوراک دام بیشتری نیاز دارد و نهایتاً برای گوسفندان با دنبه بیشتر قیمت کمتری به‌ازای هر واحد وزن پرداخت می‌شود. در حال حاضر، بیشتر تلاش‌ها روی راندمان تبدیل غذایی برای کاهش چربی متمرکز است که در این راستا باید پایین آوردن قیمت تمام شده، بالا رفتن راندمان تولید، دفع ضایعات نیتروژنی کمتر به محیط زیست و کاهش فشار چرا بر مراتع نیز مدنظر قرار گیرد(Cockett, et al., 2005) با توجه به نتایج گزارش شده توسط مرادی و همکاران (۱۳۹۰) در گوسفندان نژاد لری بختیاری و زل در مجموع سه منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۷، ۵ و X مرتبط با ذخیره چربی شناسایی شده است که دو منطقه ژنومی در کروموزوم-های ۵ و X بیانگر انتخاب در جهت افزایش فراوانی جهش‌های مؤثر بر اندازه دنبه طی هزاران سال پس از اهلی شدن این حیوانات است. آن‌ها در تحقیق خود مشخص کردند، احتمال اینکه ژن‌های مؤثر بر وزن دنبه و چربی بدن در نژادهای دنبه‌دار در مناطق ذکر شده باشند، بسیار زیاد است(Moradi *et al.*, 2012)شناسایی مناطق ژنومی که هدف انتخاب صفات فنوتیپی بوده‌اند، یکی از چالش برانگیزترین کاربردهای استفاده از صفحات حاوی نشانگر متراکم مانند chip array در ژنتیک حیوانی است. در مطالعه Moioli و همکارانش در سال ۲۰۱۵، اسکن ژنومی گسترده‌ای[1] با استفاده از حدود ۵۰۰۰۰ SNP[2] به‌منظور شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با رسوب چربی در گوسفندان انجام شد. نتایج ژنوتایپینگ به‌دست آمده با Ovine SNP50K BeadChip در دو نژاد دنبه‌دار با نتایج به‌دست آمده در ۱۳ نژاد بدون دنبه مقایسه شد. توالی‌یابی مستقیم ژن‌های موجود BeadChip، فراوانی آللی متضادی را در گوسفندان بدون دنبه در مقایسه با گوسفند دنبه‌دار نشان داد و SNPهای مهم بیشتری را ارائه داد، برای تأیید بیشتر نتایج اسکن ژنومی گسترده،SNPهای درون این ژن‌ها در دو گروه گوسفند ژنوتایپ شدند و جهش missense در ژن BMP2، با فراوانی آلل متفاوت در دو گروه، تشخیص داده شد. در نهایت، نتایج نشان داد که BMP2 و VNRT به‌عنوان محتمل‌ترین ژن‌های درگیر در فنوتیپ گوسفندان دنبه‌دار است (Moioli, et al., 2015) هدف از این مطالعه، بررسی احتمال وقوع چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 در گوسفندان لری بختیاری با استفاده از روش PCR-SSCP و بررسی اثر آن روی وزن دنبه این گوسفندان با استفاده از آنالیزهای مقایسه میانگین است.

1- Genomewide scan
2- Single Nucleotide Polymorphism

مواد و روش‌ها

خون‌گیری و جمع‌آوری داده‌ها

برای اجرای این پژوهش از ۱۵۰ رأس میش هم سن از نژاد لری بختیاری واقع در مرکز اصلاح نژاد گوسفند و بز گهر دورود (شهرستان دورود، استان لرستان) استفاده شد. خون‌گیری به‌صورت تصادفی از ورید گردنی و در لوله‌های حاوی EDTA (۱ تا ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انجام شد و سریعاً به فریزر ۲۰- برای ذخیره‌سازی منتقل شدند. سپس استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت اختصاصی استخراج DNA (پارس توس، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. همچنین بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به‌ترتیب با استفاده از روش‌های الکتروفورز روی ژل آگارز و طیف‌سنجی انجام گرفت. رکوردهای مربوط به وزن دنبه و وزن بدن گوسفندان نمونه‌برداری شده نیز از مرکز اصلاح نژاد گوسفند و بز گهر دورود تهیه شد.

شرایط واکنش زنجیره پلی‌مراز

در این مطالعه، تکثیر اگزون یک ژن BMP2 به‌طول ۴۳۲ جفت باز با استفاده از واکنش زنجیره پلی‌مراز انجام شد. آغازگرهای استفاده شده در این واکنش شامل آغازگر اختصاصی رفت با توالی، 5'-ACTAATGTCGGCCCTGTCC -3' و آغازگر برگشت با توالی 5'-CTTTGCCGTACGACTCCC -3' بود. طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier 6.2 و توالی ژن BMP2 با شماره دسترسی XM_004014353 که از پایگاه داده‌های NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج شده بود، صورت گرفت. هر واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA (۵۰-۱۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTPs(۲/۵ میلی مولار)، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت X ۱۰ انجام شد. برنامه تکثیر شامل، یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه برای واسرشته شدن اولیه دو رشته DNA و ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشته شدن دو رشته DNA، دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر قطعه مورد نظر بود. همچنین یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه برای بسط نهایی در نظر گرفته شد. در نهایت، صحت تکثیر محصولات PCR توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از دستگاه مستندسازی

ژل، (بایورد، آمریکا) ارزیابی شد.

شرایط فرایند چند شکلی ساختار تک‌رشته‌ای (SSCP)

برای شناسایی آلل‌های مختلف در اگزون یک ژن BMP2 (از نظر بروز جهش، حذف یا اضافه شدند نوکلئوتیدی در ترادف اسیدهای نوکلئیک) از آنالیز SSCP استفاده شد. در آنالیز SSCP، دو میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR به‌دست آمده با هشت میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (فرمامید ۹۸ درصد، EDTA ۱۰ میلی مولار، بروموفنول آبی ۰۲۵/۰ درصد، زایلن-سیانول ۰/۰۲۵ درصد) مخلوط و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه واسرشت سازی شدند (Nazifi *et al*., 2015). سپس نمونه‌ها روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج ساعت، با ولتاژ ثابت ۴۰۰ ولت و با استفاده از بافر TBE 1X الکتروفورز شدند. رؤیت‌سازی باندها با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد (Steinfeld *et al*., 2006). و در ادامه ژنوتیپ نمونه‌ها با مشاهده مستقیم تعیین شد.

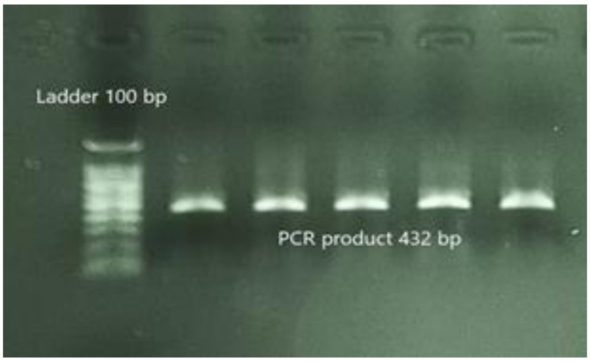
آنالیز آماری

توزیع آللی و ژنوتیپی با شمارش مستقیم آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها از روی ژل اکریل آمید و فراوانی آللی و ژنوتیپی و میزان هتروزیگوسیتی و کای دو توسط نرم‌افزار Popgene محاسبه شد. بررسی اثر ژنوتیپ‌های مختلف در جایگاه ژنی مورد مطالعه بر صفت وزن دنبه با کمک آنالیز مقایسه میانگین و رویه آزمون دانکن توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد.

نتایج و بحث

تکثیر اگزون یک ژن BMP2

اگزون یک ژن BMP2 با موفقیت توسط واکنش PCR تکثیر شد و همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، هیچ‌گونه باند غیراختصاصی و یا آلودگی در طی فرایند تکثیر دیده نمی‌شود. سپس نمونه‌های تکثیر شده برای بررسی وقوع و یا عدم وقوع چند شکلی در طی فرایند SSCP مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۱- محصولات PCR به‌دست آمده از تکثیر اگزون یک ژن BMP2 که با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد رؤیت‌سازی شد

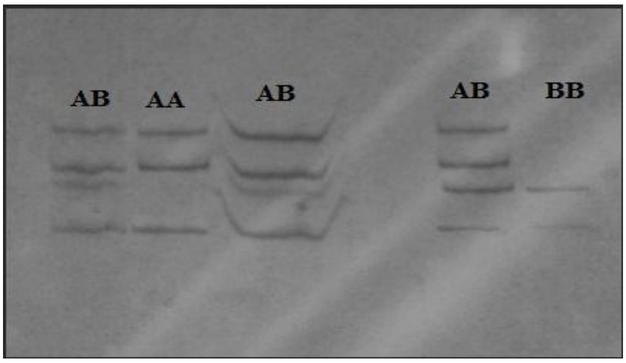
Figure 1- PCR products of BMP2 gene exon 1 visualized on 1.5% agarose gel

بررسی چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 با استفاده از تکنیک SSCP

چند شکلی محصولات حاصل از تکثیر اگزون یک ژن BMP2 به‌کمک تکنیک SSCP و ژل اکریل آمید ۱۲ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فرایند SSCP وقوع پدیده پلی‌مورفیسم را در توالی ژن مورد نظر تائید می‌کند، سه نوع ژنوتیپ AB،BB و AA تائید بر وجود چند شکلی در این ناحیه است.

تعیین وفور آللی و ژنوتیپی اگزون یک ژن BMP2 در نژاد لری بختیاری

مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی اگزون یک ژن BMP2 در میش‌های یک ساله نژاد لری بختیاری در جدول ۱ گزارش شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، هر یک از ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب دارای توزیع ۷۵، ۴۷ و ۲۸ درون جمعیت مورد مطالعه و همچنین به‌ترتیب دارای فراوانی ۵۰ درصد، ۳۱/۳۳ درصد و ۱۸/۶۷ درصد می‌باشند. توزیع هر یک از آلل‌های A و B به‌ترتیب ۱۹۷ و ۱۰۳ است که به‌ترتیب هر یک دارای فراوانی ۶۵/۷ درصد و ۳۴/۳۳ درصد می‌باشند. هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده در این مطالعه به‌ترتیب ۰/۳۱۵۴ و ۰/۶۸۴۶ است.



شکل ۲- ردیابی چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 با کمک تکنیک SSCP

Figure 2- Polymorphism detection in exon 1 of BMP2 gene using SSCP technique

جدول ۱- مقایسه وفور آللی و ژنوتیپی اگزون یک ژن BMP2

Table 1- Comparison of allelic and genotypic abundance of BMP2 gene exon 1

تعداد نمونه Number of sample	توزیع ژنوتیپی Genotype distribution			فراوانی ژنوتیپی (٪) Genotype frequency			توزیع آللی Allele distribution		فراوانی آللی (٪) Allele frequency		کای دو Chi-square test (%2)
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B	A	B	
150	**75**	**47**	**28**	**50**	**31.33**	**18.67**	**197**	**103**	**65.7**	**34.3**	**13.97 ns**

بی معنی

n.s: No Significant

معنی‌دار نبودن کای دو محاسبه شده (۱۳/۹۷) برای فراوانی‌های ژنوتیپی و مقایسه با کای دو جدول نشان می‌دهد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ نمی‌باشند که می‌توان دلیل آن را کوچک بودن جمعیت مورد مطالعه و همچنین تحت فشار انتخاب بودن جمعیت مبدأ برای اصلاح ژنتیکی برای صفت وزن دنبه در مرکز اصلاح نژاد گوسفند گهر دورود دانست.

آنالیز اثر ژنوتیپ‌های اگزون یک ژن BMP2 بر صفت وزن دنبه

نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر ژنوتیپ بر وزن دنبه در نژاد لری بختیاری در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است. به‌طوری‌که ژنوتیپ AA با میانگین وزن دنبه۵/۱۶ عملکرد بیشتری در افزایش وزن دنبه نسبت به ژنوتیپ AB با میانگین وزن دنبه ۴/۲۹ و ژنوتیپ BB با میانگین وزن دنبه ۳/۷۶ را نشان داد. کمترین وزن دنبه مربوط به ژنوتیپ BB بود. مقایسه میانگین صفت وزن دنبه در هر یک از ژنوتیپ‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

کیفیت گوشت و ترکیب لاشه از مهم‌ترین صفات اقتصادی در گوسفند به‌شمار می‌روند. چربی بدن و دنبه از جمله عوامل تأثیرگذار بر کیفیت لاشه و گوشت تولیدی در هر نژاد بوده و وقوع جهش در توالی ژن‌های کنترل‌کننده این صفات می‌تواند عملکرد حیوان و بالطبع ارزش ارثی را تحت تأثیر قرار دهد.

جدول ۲- آنالیز اثر ژنوتیپ بر صفت وزن دنبه در نژاد گوسفند لری بختیاری

Table 2- Analysis of genotype effect on fat tail weight in Lori Bakhtiari sheep breed

نژاد Breed	ژنوتیپ Genotype	تعداد نمونه Number of sample	میانگین Mean	خطای استاندارد Standard error	P-value
لری بختیاری Lori Bakhtiari	AA	75	5.16^{a}	0.13	< 0.05
	AB	47	4.29^{b}	0.17	
	BB	28	3.79^{b}	0.22	

^{a,b}میانگین‌های که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده‌اند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P < ۰/۰۵).

^{a,b} The means in the same column with at least one common letter, do not have significant difference (P<0.05).

در طی دهه اخیر به‌دلیل توسعه روزافزون شهرها و رشد اقتصادی و کشاورزی در همه مناطق و از طرفی، تغییر الگوی مصرفی، میزان تقاضا برای محصولات پروتئینی در حال افزایش است. بخش اعظم این افزایش در کشورهایی است که از رشد اقتصادی سریع (کشورهای

آسیای شرق) برخوردار بوده اند. (Koopaei and Koshkoiyeh, 2011)از آن جا که زمین‌های زراعی و مراتع را نمی‌توان بیش از این وسعت داد، امّا می‌توان میزان تولید در هر واحد سطح را هم در زمینه پرورش دام و هم در زمینه تولید محصولات کشاورزی با به‌کارگیری روش‌های علمی و صحیح افزایش داد. از جمله علوم مهمی که در این زمینه به‌کمک بشر آمده است، علم اصلاح نژاد است. کیفیت گوشت یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای است و چون این صفت، یک صفت ترکیبی محسوب می‌شود، لذا به نظر می‌رسد به‌وسیله تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود (Gao, et al, 2007) در دهه گذشته پیشرفت در فناوری‌های ژنومیکی به‌دلیل استفاده از نقشه‌یابی لینکاژی و توالی‌یابی چند برابر شده است و چنانچه بتوان اطلاعات جایگاه‌های مرتبط با صفات کیفیت گوشت را به‌دست آورد و همچنین مشخص شود که ژن‌های کنترل‌کننده این صفات روی چه نواحی کروموزومی واقع هستند، می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نژادی با استفاده از MAS[1] مورد استفاده قرار گیرند و باعث رشد و پیشرفت ژنتیکی در این صفات شوند (Ermias *et al*., 2002) امروزه با تغییر مفاهیم مصرف در جامعه، از ضرورت و مطلوبیت چربی کاسته شده است. علاوه‌براین، رسوبات چربی در ناحیه دم می‌تواند ذخایر سایر قسمت‌های بدن را نیز کاهش دهد که به نوبه خود بر کیفیت گوشت گوسفند تأثیر می‌گذارد (Khaldari and Kalfari, 2014). تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان گوشت گوسفند بر این باورند که کیفیت لاشه را می‌توان با کم کردن چربی در بخش دم گوسفند بهبود بخشید بنابراین، بررسی مکانیسم‌های تنظیم مولکولی رسوب چربی در دم گوسفند برای صنعت تولید گوشت از ارزش بالایی برخوردار است. در سال ۱۳۹۵ محققین وجود چند شکلی در ۲۷ ناحیه ژنومی منتخب برای صفات چربی و وزن دنبه که روی کروموزوم‌های شماره ۵، ۷ و X گوسفند بودند را مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌های خون به‌طور تصادفی از ۳۰۰ رأس گوسفند نژاد لری بختیاری و ۱۰۰ رأس گوسفند نژاد زل جمع‌آوری شد. در هشت مورد از جایگاه‌های مورد بررسی در مطالعه مذکور چند شکلی مشاهده شد و در اکثر این جایگاه‌های چند شکل الگوهای مختلف باندی به‌طور معنی‌داری با ویژگی‌های دنبه در ارتباط بودند ($P < ۰/۰۵$) (Lu *et al*., 2018). پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۲ (BMP2) متعلق به فاکتور رشد دگرگونی خانواده β است. این پروتئین فعالیت بیولوژیکی گسترده‌ای دارد و نقش مهمی در فرآیند رشد ماهیچه‌های اسکلتی، تمایز استخوانی و تمایز چربی دارد (Medela *et al*., 2019; Guiu- Jurado *et al*., Blázquez 2016)

ژن BMP2 در بافت‌های چربی انسان بیان می‌شود و بالاترین سطح بیان را در افراد چاق دارد (Zhang, *et al*., 2019) ژن BMP2نقش مهمی در توسعه استخوان و غضروف نیز ایفا می‌کند بنابراین، به نظر می‌رسد که بهترین کاندید برای بررسی فنوتیپ دم چربی‌دار است. محققین در سال ۲۰۱۹ با بررسی چند شکلی ژن BMP2 از طریق توالی یابی در گوسفند دم کوتاه هان[2] گزارش کردند که چند شکلی تک نوکلئوتیدی که شامل g.48462350C > T در ژن BMP2 است ارتباط معنی‌داری را با صفت نرخ زایش در شکم زایش‌های یک، دو و سه در ۳۸۴ گوسفند دم کوتاه نشان داده است ($P < ۰/۰۵$). زیرا از نظر تولید مثلی، گوسفندان با دم کوتاه برای پرورش و بهبود میزان آبستنی میش‌ها مناسب‌تر هستند. هایپرتروفی دم مانع از جفت‌گیری طبیعی می‌شود و برای کمک به پرورش نیاز به نیروی کار اضافی دارد (Ibrahimi, 2021). در مطالعه‌ای دیگری چند شکلی در اگزون دو ژن BMP2 توسط تکنیک PCR-SSCP و ارتباط آن با برخی از صفات باروری مانند نرخ لقاح میش، تعداد بره زایی میش، نرخ بره‌زایی میش، نرخ دوقلوزایی میش، تعداد کل بره‌های متولد شده در هر میش، وزن کل بره‌های متولد شده در هر میش، تعداد کل بره‌های از شیر گرفته‌شده در هر میش، وزن کل بره‌های شیر گرفته در هر میش و توانایی پرورش میش برای ۲۹۶ رأس میش برکی[3] بررسی شد. نتایج دو الگوی باندی متفاوت (A1 و A2) در ژن BMP2 را نشان داد که حاوی یک تفاوت در توالی نوکلئوتیدی بود (c.962A > T). همچنین تجزیه و تحلیل ارتباط بین این چند شکلی و تعداد کل بره‌های از شیر گرفته شده در هر میش و وزن کل بره‌های شیر گرفته در هر میش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). در پژوهش حاضر برای اولین بار احتمال وقوع چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 در گوسفندان نژاد دنبه‌دار لری بختیاری مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به اطلاعات به‌دست آمده در بخش نتایج، بررسی چند شکلی در اگزون یک ژن BMP2 در گوسفندان نژاد دنبه‌دار لری بختیاری توسط تکنیک SSCP، پلی مورف بودن این جایگاه ژنی را اثبات کرد و نتایج آنالیز آماری نیز نشان داد که حضور آلل A سبب سنگین‌تر شدن وزن دنبه و حضور آلل B سبب کمتر شدن وزن دنبه می‌شود ($P < ۰/۰۵$). بنابراین با به‌کارگیری روش‌های تشخیص مولکولی و شناسایی گوسفندان حامل آلل‌های B و انتخاب آن‌ها به‌عنوان والدین نسل بعد می‌توان گله‌هایی با وزن دنبه کمتر و بازارپسندی بیشتر ایجاد نمود.

1- Marker-assisted selection

2- Small Tail Han sheep

3- Barki ewes

References

1. Blázquez‐Medela, A. M., Jumabay, M., & Boström, K. I. (2019). Beyond the bone: Bone morphogenetic protein signaling in adipose tissue. *Obesity Reviews, 20*(5), 648-658. https://doi.org/10.1111/obr.12822
2. Cockett, N. E., Smit, M. A., Bidwell, C. A., Segers, K., Hadfield, T. L., Snowder, G. D., Georges, M., & Charlier, C. (2005). The callipyge mutation and other genes that affect muscle hypertrophy in sheep. *Paper presented at the Genetics Selection Evolution*. https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S65
3. Ermias, E., Yami, A., & Rege, J. (2002). Fat deposition in tropical sheep as adaptive attribute to periodic feed fluctuation. *Journal of Animal Breeding and Genetics, 119*(4), 235-246. https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2002.00344.x
4. Gao, Y., Zhang, R., Hu, X., & Li, N. (2007). Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. *Meat science, 77*(1), 36-45. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.026
5. Guiu‐Jurado, E., Unthan, M., Böhler, N., Kern, M., Landgraf, K., Dietrich, A., Schleinitz, D., Ruschke, K., Klöting, N., & Faßhauer, M. (2016). Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) may contribute to partition of energy storage into visceral and subcutaneous fat depots. *Obesity, 24*(10), 2092-2100. https://doi.org/10.1002/oby.21571
6. Ibrahim, A. H. (2021). Genetic variants of the BMP2 and GDF9 genes and their associations with reproductive performance traits in Barki ewes. *Small Ruminant Research, 195*, 106302. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106302
7. Khaldari, M., & Kalfari, M. (2014). Introduction a new system for measuring volume of fat-tail in sheep. *Journal of Livestock Research, 3*(3), 71-78. https://doi.org/10.22077/JLR.2014.303
8. Khaldari, M., Kashan, N., Afzalzadeh, A., & Salehi, A. (2007). Growth and carcass characteristics of crossbred progeny from lean-tailed and fat-tailed sheep breeds. *South African Journal of Animal Science, 37*(1), 51-56. https://doi.org/10.4314/sajas.v37i1.4026
9. Koopaei, H. K., & Koshkoiyeh, A. E. (2011). Application of genomic technologies to the improvement of meat quality in farm animals. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 6*(6), 126-132.
10. Lu, Z., Du, L., Liu, R., Di, R., Zhang, L., Ma, Y., Li, Q., Liu, E., Chu, M., & Wei, C. (2018). MiR-378 and BMP-Smad can influence the proliferation of sheep myoblast. *Gene, 674*, 143-150. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.039
11. Moioli, B., Pilla, F., & Ciani, E. (2015). Signatures of selection identify loci associated with fat tail in sheep. *Journal of Animal Science, 93*(10), 4660-4669. https://doi.org/10.2527/jas.2015-9389
12. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrbabak, M., Dodds, K. G., & McEwan, J. C. (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*(1), 1-15. https://doi.org/10.1186/1471-2156-13-10
13. Nazifi, N., Rahimi-Mianji, G., & Ansari-Pirsarai, Z. (2015). Polymorphism in FSHβ and FSHRGenes and their relationship with productive and reproductive performance in Iran black, Arman and BaluchiSheep Breeds. *Iranian Journal of Applied Animal Science, 5*(2), 361-368.
14. Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Rosales, M., & De Haan, C. (2006). Livestock's long shadow: Environmental issues and options: *Food & Agriculture Org.*
15. Wood, J., Enser, M., Fisher, A., Nute, G., Sheard, P., Richardson, R., Hughes, S., & Whittington, F. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A Review. *Meat Science, 78*(4), 343-358. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.019
16. Zhang, Z., Liu, Q., Di, R., Hu, W., Wang, X., He, X., Ma, L., & Chu, M. (2019). Single nucleotide polymorphisms in BMP2 and BMP7 and the association with litter size in Small Tail Han sheep. *Animal Reproduction Science, 204*, 183-192. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.04.001

Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 447-457

Molecular Diversity and Phylogenetic Analysis of Turkmen Camel and Different Species of Camels based on CYTB Gene Sequence

Karim Nobari[1]*, Abbas Bahari[2], Shokoufe Ghazanfari[3]

Received: 20-04-2021
Revised: 07-09-2021
Accepted: 08-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Nobari, K., Bahari, A., & Ghazanfari, S. (2022). Molecular diversity and phylogenetic analysis of Turkmen camel and different species of camels based on CYTB gene sequence. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *14*(3), 447-457.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.69937.1017

Introduction: Camels play a major role in the life of people in parts of Africa and Asia, especially in the desert areas. Today, camels are important for sustainable livestock production species in many arid regions of the world. Camels are economically important in terms of meat, milk and wool production in the desert. Due to climate change, camel as a desirable animal for arid areas, requires more extensive scientific view. According to FAO statistics, about 95% of 35 million humped camels worldwide are single-humped camels. The cytochrome b sequence is part of the mitochondrial DNA, passing from mother to offspring's, can be used to elucidate genetic diversity and evolutionary history within and between different species. The aim of this study was to compare the genetic diversity using cytochrome b sequence in Turkmen camel and its genetic relationship with one and two-humped camels. In addition, the genetic relationship of within and between different species of camels has been objected.

Materials and Methods: After preparing a blood sample from the abdominal vein of Turkmen camel, DNA extraction was performed using salting out method. Turkmen camel sequencing was performed using Illumina HighSeq 2000. Sequencing creates 150 bp reads of the genome sequence. The reads were assembled by Denovo method using CLC software and the contig of containing the cytochrome b gene was isolated based on the reference gene, NC_009849. Relevant data were obtained to compare the CYTB reference gene in new (Lamini) and old (Camelini) world species of camels. To study the genetic diversity of the camel species, a total of 42 one-humped camels, 31 wild tow-humped camels, 121 domestic tow-humped camels, and wild lamas including 31 guanicoe (Lama guanico) And 6 vicogna-vicogna (vicogna vicogna) and domestic llamas including 6 lama glama and 5 alpaca (Lama pacos) were compared. The alignment of CYTB gene sequence samples of different species was performed using CLC Genomics Workbench 12 software. Then the number of gaps, the number of differences and identities were obtained. A phylogenetic tree was drawn to investigate the genetic relationships between and within species. Sequences of Turkmen camels and other Iranian and Arabian one-humped camels along with other species were analyzed for alignment using CLC software. Phylogenetic tree of DNA and proteins sequences of the gene was performed using Neighbor Joining method with Jukes-Cantor protein distance size with 1000 bootstrap replications.

Results and Discussion: DNA extraction based on spectrophotometry was 304 ng/µl and was suitable for sequencing. After sequencing, 589,326,158 readings of 150 base-pairs containing more than 88 billion bases were obtained. Assembling of the obtained reads produced 235978 contigs from which the contig of containing cytochrome b gene was selected based on the reference gene. The sequence of other camel species was extracted from the database and used based on the fact that the data contained the entire cytochrome b gene, which corresponds to 1140 bp of the reference gene. There is the biggest difference between new world of wild and domestic camels. There was a minimal difference between Arabian and Turkmen camels with 100% similarity,

1- Assistant Professor, Animal Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran.
2- Assistant Professor, Research Institute of modern biological techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3- Associated Professor, Department of Animal and Poultry Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran.
*Corresponding Author Email: k.nobari@areeo.ac.ir

followed by Lama Glama and Lama Guanico, as well as between wild and domestic two-humped camels. The Turkmen camel was completely similar to the Arabian camel and had the greatest difference with wild two-humped camels. In the study of Di Rocco et al. (2010) it was shown that the difference of cytochrome b sequence between wild camels (VV and L Cuanicoe) was 6.4%, which in this study was 6.3% which could be due to the larger number of samples in this study. The phylogenetic tree of cytochrome b protein sequence showed that the llamas and one and two-humped camels are located in different branches of the tree. According to the results of DNA phylogenetic tree, llamas were on one side and two-humped camels were on the other side of the tree and one-humped camels were located between them. There was a great diversity within the population of llamas. Some domestic one and two-humped camels are associated with wild two-humped camels. The results indicate that wild two-humped female camels were mated with domestic one and two-humped males that resulted one and two-humped domestic camels phenotype. The same is true of llamas, with domesticated Lama Glama and Lama Pacos locating among the wild species of Lama Guanicoe and Vicogna vicogna phylogenetic branch. Ming et al. (2016) demonstrated that domestic and wild two-humped camel species are genetically distinct from each other. In this study, it was shown that the domestic and wild two-humped camels is phylogenetically close to each other and distanced from one-humped camels. Based on the cytochrome b sequence, Cui et al. (2007) were concluded that one and two-humped camels separated before migrating to Eurasia. Similarly, in this study, it has been shown that one-humped camels are separated from two-humped camels, then wild and domestic two-humped camels are separated from each other. As a result, there is a greater phylogenetic distance between llamas and humped camels.

Conclusion: Iranian one-humped camels can be classified into four genetic groups, two of which are originated from wild and domestic two-humped camels and the other two groups are among the one-humped camels. Iranian domestic two-humped camels were also phylogenetically divided into four genetic groups.

Keywords: Cytochrome B, Genetic diversity, Phylogenetic tree, Turkmen camel.

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

تنوع مولکولی و تجزیه فیلوژنتیکی شتر ترکمن و گونه‌های مختلف شتر براساس توالی ژن سیتوکروم b

کریم نوبری[1*]، عباس بهاری[2]، شکوفه غضنفری[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

نوبری، ک.، بهاری، ع.، و غضنفری، ش. (۱۴۰۱). تنوع مولکولی و تجزیه فیلوژنتیکی شتر ترکمن و گونه‌های مختلف شتر براساس توالی ژن سیتوکروم b. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴ (۳)، ۴۵۷-۴۴۷.

چکیده

شتر یکی از دام‌های بسیار مهم در مناطق خشک و بیابانی می‌باشد و با توجه به تغییرات اقلیمی، به‌عنوان حیوان مطلوب برای این مناطق مستلزم نگاه علمی دقیق‌تری است. مطالعات اندکی در رابطه با تنوع و خصوصیات ژنتیکی آن در مقایسه با سایر گونه‌های دامی صورت گرفته است. شناخت خصوصیات ژنتیکی می‌تواند در تعیین استراتژی‌های حفظ تنوع ژنتیکی و اصلاح نژاد کمک کند. به‌منظور بررسی ساختار جمعیتی و تنوع ژنتیکی موجود در بین و درون گونه‌های مختلف شتر می‌توان از نشانگرهای موجود بر روی DNA میتوکندری استفاده نمود. هدف این مطالعه مقایسه تنوع ژنتیکی با استفاده از توالی سیتوکروم b میتوکندری شتر تک‌کوهانه ترکمن با شترهای تک‌کوهانه، دوکوهانه و گونه‌های شتر بدون کوهان بود. برای این منظور، توالی کامل سیتوکروم b به‌طول ۱۱۴۰ جفت باز در شتر ترکمن با استفاده از روش توالی‌یابی کل ژنوم به‌دست آمد و با توالی سیتوکروم b در ۴۲ نفر شتر تک‌کوهانه، ۳۱ نفر شتر دوکوهانه وحشی، ۱۲۱ نفر شتر دوکوهانه اهلی، شترهای بدون کوهان وحشی شامل ۳۱ رأس گواناکو (Lama guanicoe) و شش رأس ویکونا-ویکونا (vicugna vicugna) و شترهای بدون کوهان اهلی شامل شش رأس لاما گلاما (Lama glama) و پنج رأس آلپاکا (Lama pacos) مورد مقایسه قرار گرفتند. شترهای تک‌کوهانه ایرانی با شترهای دوکوهانه وحشی ارتباط ژنتیکی داشتند، به‌طوری‌که ماده شترهای دوکوهانه وحشی با شترهای نر تک‌کوهانه آمیزش داده شده‌اند. به نظر می‌رسد که شترهای تک‌کوهانه دارای مادران دوکوهانه وحشی در شجره خود، به‌طور کامل از کشور ایران می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، درخت فیلوژنتیکی، سیتوکروم b، شتر ترکمن.

مقدمه

جمعیت‌های مختلف شتر دارای تنوع ژنتیکی بوده و تعداد زیادی از آلل‌های منحصر به فرد دارند که می‌تواند برای افزایش تنوع ژنتیکی دیگر جمعیت‌های شتر به‌کار گرفته شوند. اطلاعات در رابطه با تنوع ژنتیکی می‌تواند در تعیین استراتژی‌های حفاظت و بهبود ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد (Piro *et al.*, 2020). شتر در زندگی مردمان بخش‌هایی از آفریقا و آسیا، به‌خصوص مناطق صحرایی، نقش اساسی داشته است (Bahbahani *et al.*, 2019). شتر جهت حمل و نقل، منبع

۱- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

۲- استادیار پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان،دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: k.nobari@areeo.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2021.69937.1017

غذا و همچنین جنگ مورد استفاده قرار می‌گرفته است. امروزه شتر به‌عنوان گونه دامی پایدار برای پرورش در بسیاری از مناطق خشک جهان دارای اهمیت می‌باشد (Burger, 2016). شتر به‌دلیل تولید شیر، گوشت، پشم، چرم، حمل بار، راهپیمایی طولانی، مقاومت به دمای زیاد و شرایط خشک دارای اهمیت می‌باشد (Faraz, 2019; Bhakat and Sahani 2019; Gebreyohanes and Assen, 2017). شترهای اهلی کوهان‌دار در مناطق صحرایی از لحاظ تولید گوشت، شیر و پشم دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند (Groeneveld *et al.*, 2010). بر اساس آمار فائو حدود ۳۵ میلیون رأس شتر کوهان‌دار در سراسر دنیا وجود دارند (FAO, 2019) که ۹۵ درصد آن را شتر تک‌کوهانه تشکیل می‌دهد (Hashim *et al.*, 2015).

شتر ترکمن در بیابان‌های نوار مرزی استان گلستان در محدوده‌ای بین شهرهای مراوه‌تپه، کلاله، گنبد کاووس، آق‌قلا، گمیشان و بندرترکمن و برای مصرف شیر و تولید گوشت پرورش داده می‌شود. پرورش‌دهندگان این اکوتیپ از شتر ایرانی، به‌واسطه فرهنگ و سنت خود، تولید شیر را بیشتر از سایر صفات مورد توجه قرار داده‌اند.

شتر از راسته زوج‌سمان (Artiodactyla) و خانواده camelida، در دوره ائوسن در آمریکای شمالی زندگی می‌کردند که حدود سه میلیون سال پیش مهاجرت خود را به اوراسیا و آمریکای جنوبی آغاز کردند که نتیجه آن ایجاد شترهای کوهان‌دار و بدون کوهان امروزی بوده است (Wheeler, 1995). شترهای کوهان‌دار شامل شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه هستند که در صحراهای آفریقا و آسیا زندگی می‌کنند (Wu *et al.*, 2014). خانواده camelida دارای سه جنس camelus، vicugna و lama می‌باشد که جنس camelus داری سه گونه شتر تک‌کوهانه اهلی(dromedaries)، شتر دوکوهانه وحشی (ferus) و شتر دوکوهانه اهلی (bactrianus) و جنس vicugna دارای دو گونه vicugna و pacos و جنس lama دارای دو گونه glama و guanicoe می‌باشد (Ali *et al.*, 2019). تمام گونه‌های این خانواده دارای ۷۴ کروموزوم (۳۷ جفت) بوده و از لحاظ مقدار و الگوی توزیع هتروکروماتین با یکدیگر تفاوت دارند (Balmus *et al.*, 2007).

توالی ژن سیتوکروم b دارای هر دو نوع از کدون‌های در حال تکامل سریع و کند بوده، به‌طوری‌که دارای مناطق بسیار حفاظت شده و مناطق بسیار متغیر می‌باشد (Kameshpandian *et al.*, 2016). توالی سیتوکروم b بخشی از DNA میتوکندریایی می‌باشد که این نوع توالی معمولاً از مادر به فرزند منتقل می‌گردد. توالی DNA میتوکندریایی می‌تواند برای شفاف نمودن تنوع ژنتیکی و تاریخچه تکاملی درون و بین گونه‌های مختلف استفاده گردد (Ming *et al.*, 2016). بنابراین، در این نوع مطالعات از تولی سیتوکروم b استفاده می‌گردد. توالی ژن سیتوکروم b برای تشخیص منشأ گوشت حیوانات اهلی، وحشی و ماهیان نیز قابل استفاده می‌باشد (Farag *et al.*, 2020). در مطالعه الاسکر و همکاران (AlAskar *et al.*, 2020) که با استفاده از ۱۰ مارکر STR بر روی ۷۰۱ نفر از ۲۷ نوع شتر که در ۱۱ کشور مختلف یافت می‌شود، نشان داد که تنوع ژنتیکی تمایزدهنده بین شترهای تک‌کوهانه مورد بررسی یافت نمی‌شود. هدف این مطالعه، مقایسه تنوع ژنتیکی با استفاده از توالی سیتوکروم b در شتر تک‌کوهانه ترکمن و رابطه ژنتیکی آن با شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه بود. علاوه‌بر آن، بررسی وضعیت روابط ژنتیکی در درون و بین گونه‌های مختلف شترهای کوهان‌دار و بدون کوهان مد نظر بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده

توالی ژن سیتوکروم B (CYTB) در شتر ترکمن

بعد از تهیه نمونه خون از رگ شکمی یک نفر شتر ترکمن، استخراج DNA به‌روش بهینه نمکی انجام گرفت. توالی‌یابی شتر ترکمن با استفاده از Illumina HighSeq 2000 صورت گرفت. خوانش‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار CLC به‌روش Denovo اسمبل شده و کانتیگ‌ها به‌دست آمدند که از میان آن‌ها کانتیگ مربوط به ژن سیتوکروم b بر اساس ژن رفرنس جداسازی شد. سپس ژن سیتوکروم b شتر ترکمن بر اساس ژن رفرنس شماره NC_009849 از کانتیگ جداسازی گردید.

توالی ژن CYTB در بانک داده

جهت مقایسه ژن رفرنس CYTB در گونه‌های مختلف شتر و همچنین برای به‌دست آوردن تنوع ژنتیکی شترها در درون گونه‌های تک‌کوهانه و دوکوهانه، توالی ژن رفرنس و توالی شترهای مختلف درون گونه‌های شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه از بانک داده نوکلئوتیدی مربوط به مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به‌دست آمد. به‌طور کلی ژن رفرنس در هفت گونه شترسانان شامل دو گونه شتر دوکوهانه و یک گونه شتر تک‌کوهانه و چهار گونه شتر بدون کوهان از بانک داده بین‌المللی اخذ گردید. جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌های شتر بدون کوهان، تک‌کوهانه و دو کوهانه، شترهای دنیای جدید و قدیم، در مجموع تعداد ۴۲ نفر شتر تک‌کوهانه، ۳۱ نفر شتر دوکوهانه وحشی، ۱۲۱ نفر شتر دوکوهانه اهلی، شترهای بدون کوهان وحشی شامل ۳۱ رأس گواناکو (Lama guanicoe) و شش رأس ویکونا–ویکونا (vicogna vicogna) و شترهای بدون کوهان اهلی شامل شش رأس لاما گلاما (lama glama) و پنج رأس آلپاکا (Lama pacos) مورد مقایسه قرار گرفتند. از بین توالی‌های مختلف ژن سیتوکروم b موجود در بانک داده، تنها نمونه توالی‌هایی انتخاب گردید که طول آن‌ها برابر ۱۱۴۰ جفت باز بودند.

تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن رفرنس و ترسیم درخت

فیلوژنتیکی در گونه‌های مختلف

هم‌ترازی[1] ژن‌های رفرنس گونه‌های مختلف با استفاده نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 12 صورت گرفت. سپس گسست‌ها، تعداد تفاوت‌ها و تشابه به‌دست آمد. جهت بررسی میزان روابط ژنتیکی بین گونه‌ها نیز درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. علاوه‌بر موارد فوق با توجه به حاشیه‌نگاری (Annotation) ژن‌های رفرنس توالی پروتئین نیز به‌دست آمد. توالی‌های پروتئین به‌دست آمده مورد تجزیه هم‌ترازی قرار گرفته و میزان گسست‌ها، تعداد تفاوت‌ها و تشابه‌ها محاسبه گردید. سپس با استفاده از روش Neighbor Joining درخت فیلوژنتیکی مربوط به هم‌ترازی ترسیم شده برای توالی پروتئین نیز ترسیم گردید. ترسیم درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئین مربوط به ژن‌های رفرنس با استفاده از روش Neighbor Joining با اندازه فاصله پروتئینی Jukes-Cantor با تعداد تکرار بوت استراپ ۱۰۰۰ انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن در جمعیت‌های گونه‌های مختلف

توالی شتر ترکمن و سایر شترهای ایرانی و عربی تک‌کوهانه به همراه گونه‌های دیگر با استفاده از نرم‌افزار CLC تحت تجزیه هم‌ترازی قرار گرفتند. پس از مشخص شدن تعداد گسست‌ها، تفاوت‌ها و شباهت‌ها، درصد شباهت و تفاوت، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor Joining برای جمعیت‌های گونه‌های مختلف شتر ترسیم گردید.

نتایج و بحث

اخذ توالی ژن

استخراج DNA بر اساس اسپکتروفتومتری مقدار ۳۰۴ نانوگرم در میکرولیتر و مناسب برای توالی‌یابی بود. پس از توالی‌یابی تعداد ۵۸۹/۳۲۶/۱۵۸ خوانش ۱۵۰ جفت بازی شامل بیش از ۸۸ میلیارد باز از توالی‌یابی به‌دست آمد. خوانش‌های به‌دست آمده تعداد ۲۳۵۹۷۸ کانتیگ تولید کردند که از میان آن‌ها کانتیگ مربوط به ژن سیتوکروم b بر اساس ژن رفرنس انتخاب شد. توالی سایر گونه‌های شتر نیز بر اساس اینکه داده مورد نظر حاوی کل ژن سیتوکروم b که منطبق با ۱۱۱۴۰ جفت باز ژن رفرنس می‌باشد، از بانک داده استخراج و مورد استفاده قرار گرفت.

مقایسه توالی ژن در شتر ترکمن با گونه‌های دیگر

کانتیگ به‌دست آمده از شتر ترکمن به همراه ژن‌های رفرنس مربوط به سیتوکروم b در گونه‌های مختلف شتر تحت تجزیه هم‌ترازی قرار گرفتند (شکل ۱).

سپس تعداد گسست‌ها، تفاوت‌ها و تشابه‌ها در نوکلئوتید ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، بیشترین تفاوت بین شتر دوکوهانه وحشی و آلپاکا وجود دارد. حداقل تفاوت بین شتر عربی و ترکمن با تشابه ۱۰۰ درصد و سپس، لاما گلاما و لاما گواناکو و همچنین بین شترهای دوکوهانه وحشی و اهلی وجود داشتند. شتر ترکمن به‌صورت کامل مشابه شتر عربی بود و بیشترین تفاوت را در بین شترهای کوهان‌دار با شتر دوکوهانه وحشی داشت. در مطالعه دی–روکو و همکاران (Di Rocco *et al.*, 2010) نشان داده شده که درصد تفاوت توالی سیتوکروم b در بین شترهای بدون‌کوهان وحشی (V vicugna و L Cuanicoe) ۶/۴ درصد محاسبه شده بود که در این مطالعه این میزان برابر ۶/۳ می‌باشد که دلیل تفاوت آن می‌تواند تعداد نمونه بیشتر در این مطالعه باشد. ترسیم درخت فیلوژنتیکی توالی ژن‌های رفرنس گونه‌های مختلف شتر با استفاده از روش Neighbor Joining با اندازه فاصله نوکلئوتیدی Kimura 80 با تعداد ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استراپ انجام گرفت (شکل ۲).

توالی پروتئین ژن‌های رفرنس به‌دست آمده و مورد تجزیه هم‌ترازی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ گسستی بین توالی‌های پروتئین گونه‌های مختلف شتر وجود ندارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی شترهای بدون‌کوهان، دوکوهانه و تک‌کوهانه در شاخه‌های مختلف قرار گرفتند که در شکل ۲ آورده شده است.

تعداد گسست‌ها، تفاوت‌ها و تشابه‌ها در هم‌ترازی توالی پروتئین ژن رفرنس گونه‌های مختلف شتر به‌صورت جدول محاسبه گردید.

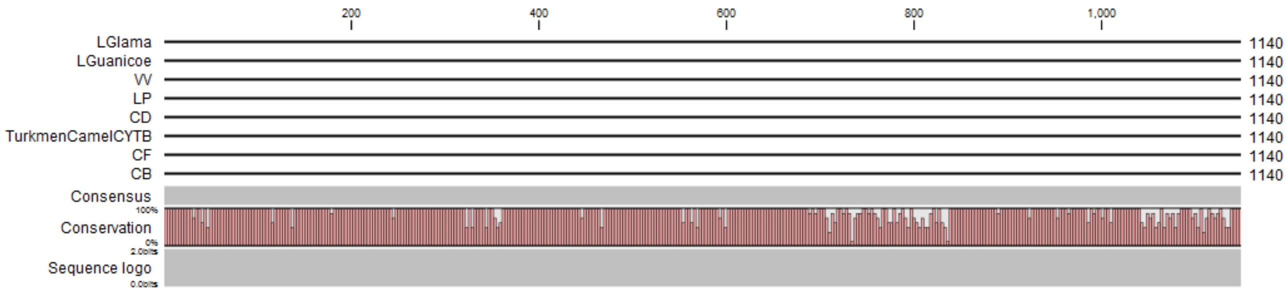
درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئین‌های مربوط به ژن‌های رفرنس در شکل زیر آورده شده است.

توالی ژن شتر ترکمن در بین گونه‌های

موقعیت گونه‌های مختلف شتر با ترسیم درخت فیلوژنتیکی برای جمعیت‌های گونه‌ها به‌دست آمد. نتایج ترسیم درخت فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف به‌صورت زیر می‌باشد.

همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، شترهای بدون کوهان در یک طرف و شترهای دوکوهانه در طرف دیگر درخت قرار دارند و شترهای تک‌کوهانه در بین آن‌ها قرار گرفته‌اند. در درون جمعیت شترهای بدون کوهان تنوع زیادی وجود داشت.

1- Alignment



شکل ۱- هم‌ترازی توالی DNA ژن سیتوکروم b در شتر ترکمن و سایر گونه‌های شتر

Figure 1- Alignment of DNA sequence of cytochrome b gene in Turkmen camel and other camel species

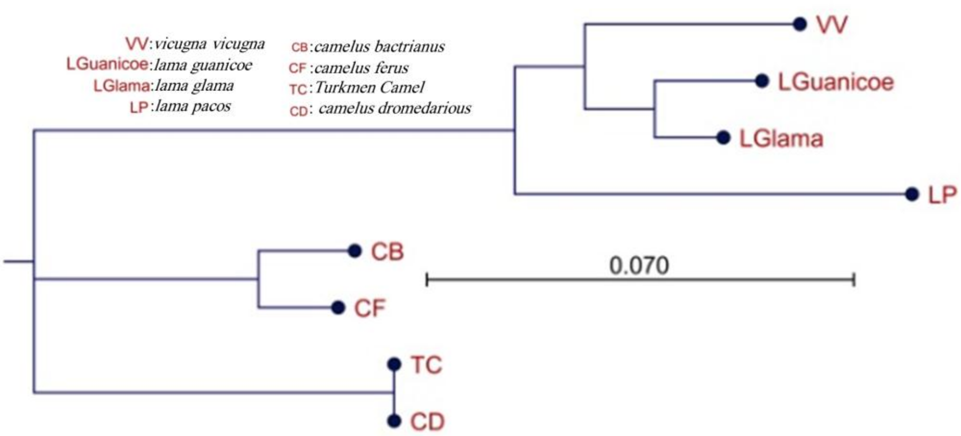
جدول ۱- تعداد گسست، تفاوت‌ها و تشابه نوکلئوتیدهای توالی سیتوکروم b گونه‌های مختلف شتر

Table 1- Number of gaps, differences and identities of CYTB in different camel species

گونه Species	تعداد گسست‌ها Gaps							تعداد تفاوت‌ها Differences							تعداد تشابه Identities						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
2	0							32							1108						
3	0	0						68	72						1072	1068					
4	16	16	16					113	123	134					1035	1025	1014				
5	2	2	2	16				178	184	175	209				963	957	966	939			
6	2	2	2	16	0			178	184	175	209	0			963	957	966	939	1140		
7	2	2	2	16	0	0		167	169	165	211	116	116		974	972	976	937	1024	1024	
8	2	2	2	16	0	0	0	175	177	169	208	110	110	32	966	964	972	940	1030	1030	1108

لاما گلاما (۱)، لاما گواناکو (۲)، ویکونا ویکونا (۳)، لاما پاکوس یا آلپاکا (۴)، شتر عربی (۵)، شتر ترکمن ایرانی (۶)، شتر دوکوهانه وحشی (۷)، شتر دوکوهانه اهلی (۸)

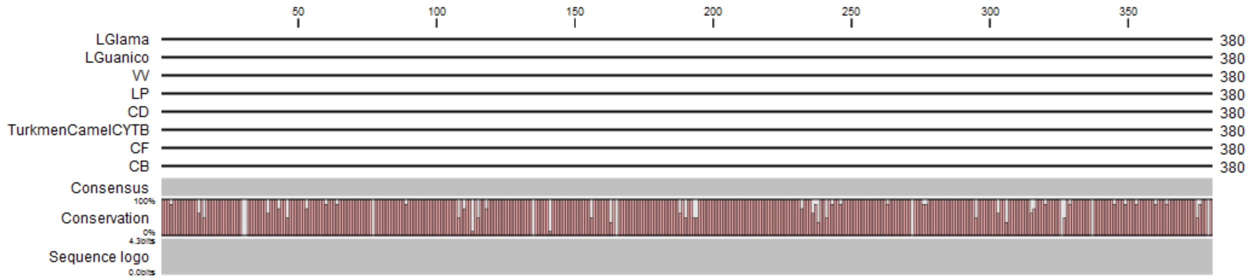
Lama glama (1), Lama guanicoe (2), Vicugna vicugna (3), Lama pacos or Alpaca (4), Arabian camel (5), Iranian Turkmen camel (6), Wild Bactrian camel (7), Bactrian camel (8)



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی توالی DNA ژن‌های رفرنس سیتوکروم b

Figure 2- Phylogenetic tree of DNA sequences of cytochrome b reference genes

با بررسی فیلوژنی سیتوکروم b گونه‌های مختلف شتر، مشخص گردید که برخی از شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه اهلی با شترهای دوکوهانه وحشی ارتباط دارند. نتایج حاکی از آن است که شترهای ماده دوکوهانه وحشی با شترهای نر تک‌کوهانه و دوکوهانه اهلی آمیزش یافته و فنوتیپ تک‌کوهانه یا دوکوهانه اهلی حاصل از آن‌ها پرورش یافته‌اند. در میان شترهای بدون کوهان نیز تداخل بین گونه‌ای وجود دارد، به‌طوری‌که مشاهده می‌شود Lama Glama و Lama Pacos که اهلی هستند در میان گونه‌های وحشی Lama Guanicoe و Vicogna vicogna قرار می‌گیرند.



L Glama: Lama glama; L Guanico: Lama guanico; VV: Vicugna vicugna; LP: Lama pacos or Alpaca; CD: Arabian camel; TurkmenCamelCYTB: Iranian Turkmen camel; CF: Wild Bactrian camel; CB: Bactrian camel

شکل ۳– هم‌ترازی توالی پروتئین ژن سیتوکروم b در شتر ترکمن و سایر گونه‌های شتر

Figure 3- Alignment of protein sequences of cytochrome b gene in Turkmen camel and other camel species

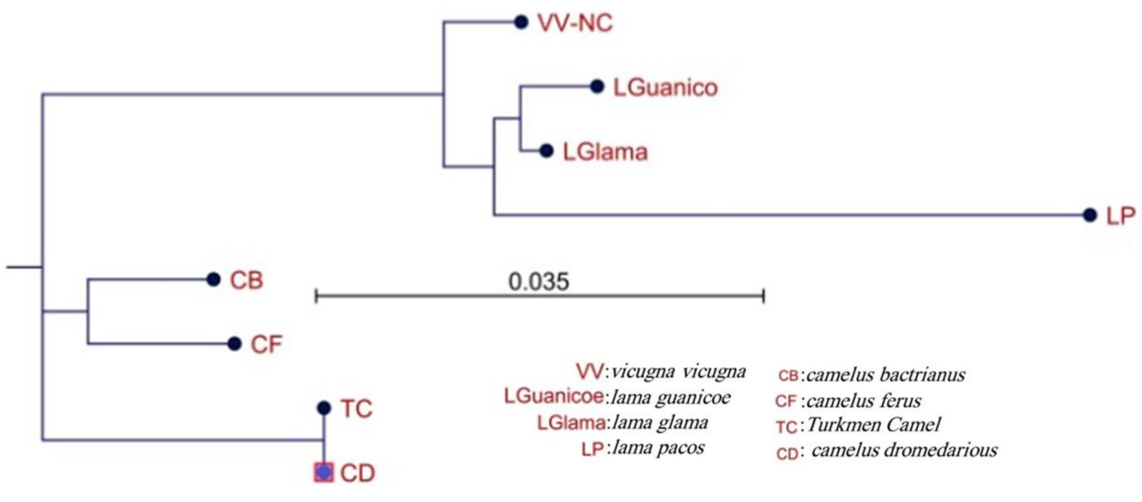
جدول ۲– تعداد گسست‌ها، تفاوت‌ها و تشابه‌ها در هم‌ترازی توالی پروتئین ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف

Table 2- Number of gaps, differences and identities of CYTB protein in different camel species

گونه Species	تعداد گسست‌ها Gaps							تعداد تفاوت‌ها Differences							تعداد تشابه Identities						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
2	0							3							377						
3	0	0						4	7						376	373					
4	0	0	0					19	20	22					361	360	358				
5	0	0	0	0				23	24	22	37				357	356	358	343			
6	0	0	0	0	0			23	24	22	37	0			357	356	358	343	380		
7	0	0	0	0	0	0		21	22	19	33	15	15		359	358	361	347	365	365	
8	0	0	0	0	0	0	0	21	22	19	33	12	12	8	359	358	361	347	368	368	372

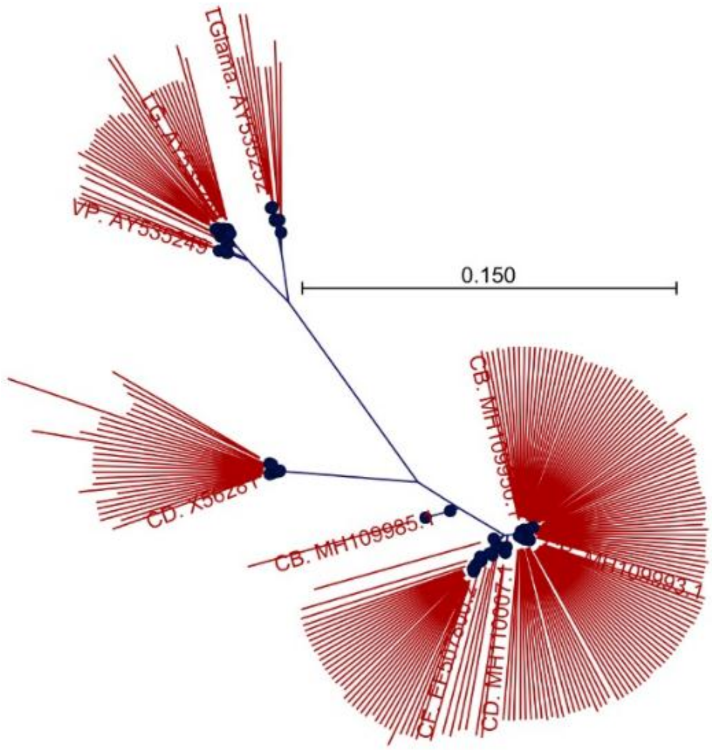
لاما گلاما (۱)، لاما گواناکو (۲)، ویکونا ویکونا (۳)، لاما پاکوس یا آلپاکا (۴)، شتر عربی (۵)، شتر ترکمن ایرانی (۶)، شتر دوکوهانه وحشی (۷)، شتر دوکوهانه اهلی (۸)

Lama glama (1), Lama guanicoe (2), Vicugna vicugna (3), Lama pacos or Alpaca (4), Arabian camel (5), Iranian Turkmen camel (6), Wild Bactrian camel (7), Bactrian camel (8)



شکل ٤– درخت فیلوژنتیکی توالی پروتئین‌های ژن‌های رفرنس سیتوکروم b

Figure 4- Phylogenetic tree of protein sequences of cytochrome b reference genes



L Glama: Lama glama; L Guanico: Lama guanico; VV: Vicugna vicugna; LP: Lama pacos or Alpaca; CD: Arabian camel; TurkmenCamelCYTB: Iranian Turkmen camel; CF: Wild Bactrian camel; CB: Bactrian camel

شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی توالی DNA ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف

Figure 5- Phylogenetic tree of DNA sequences of cytochrome b in different species

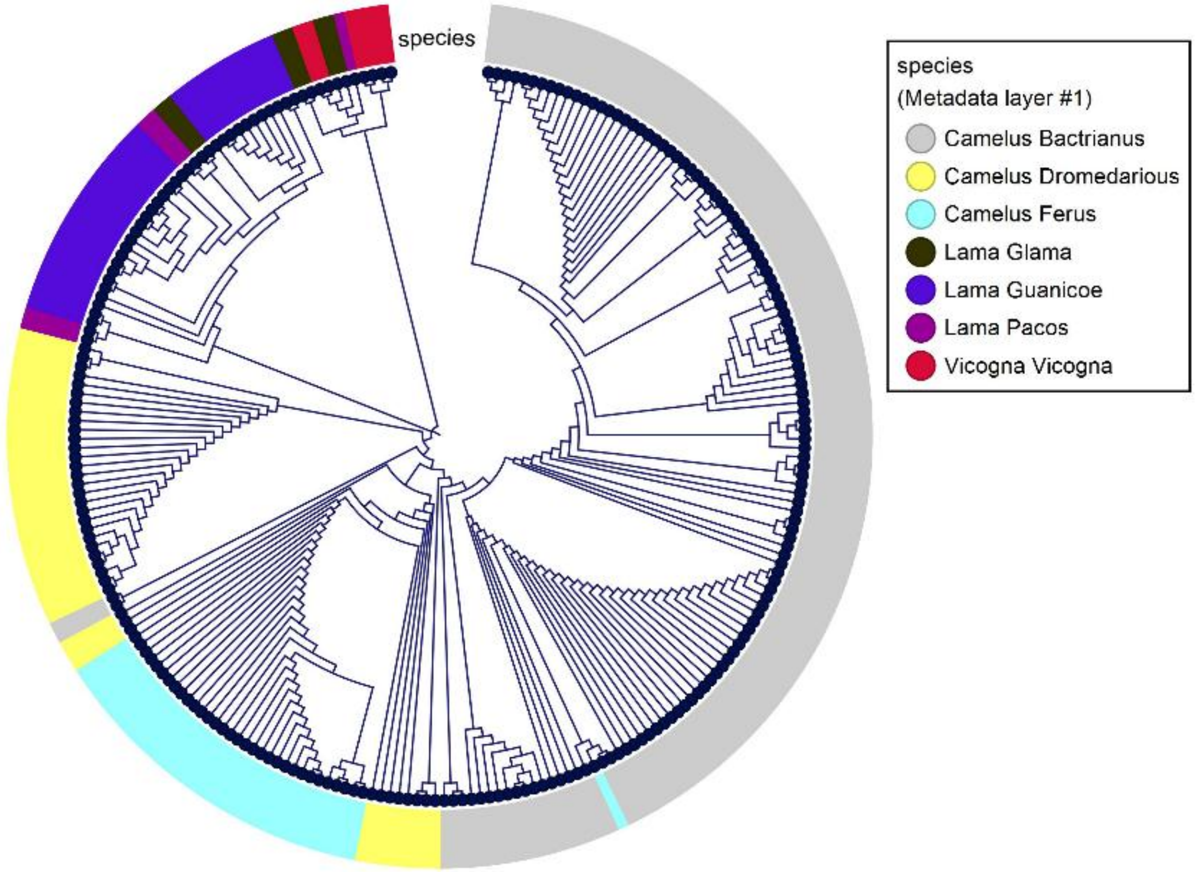
همان‌طور که در شکل ۶ مشخص است، شترهای بدون کوهان از لحاظ ژنتیکی بسیار نزدیک به هم می‌باشند، ویکوناها از لحاظ ژنتیکی فاصله بیشتری با گواناکوها دارند، امّا انواع اهلی لاما قرابت ژنتیکی با هر دونوع وحشی فوق دارند. برخی از شترهای تک‌کوهان نیز در بین شترهای دوکوهانه وحشی قرار می‌گیرند. به‌طوری‌که شترها دارای فنوتیپ تک‌کوهانه بودند، امّا از لحاظ ژنتیکی در میان دوکوهانه‌ها قرار دارند. علاوه‌بر آن، شترهای دوکوهانه اهلی نیز از لحاظ ژنتیکی منشعب از دوکوهانه‌های وحشی می‌باشند و برخی از آن‌ها از لحاظ ژنتیکی بین شترهای تک‌کوهانه و دوکوهانه‌های وحشی می‌باشند. یک شتر دوکوهانه وحشی نیز در میان دوکوهانه‌های اهلی قرار گرفت. برای مشخص کردن موقعیت جغرافیایی هر یک از موارد فوق نموداری با مشخص کردن منشأ جغرافیایی گونه‌ها ترسیم گردید. مینگ و همکارن (Ming *et al*., 2016) در بررسی گونه‌های شتر دوکوهانه اهلی و وحشی نشان دادند که این دو گونه به‌صورت مستقل از همدیگر تکامل یافتند، در مطالعه آن‌ها مشخص گردید که فاصله فیلوژنتیکی شترهای دوکوهانه اهلی و وحشی به همدیگر نزدیک و از شترهای تک‌کوهانه دور می‌باشند. سوی و همکاران (Cui *et al*., 2007) بر اساس توالی حاصل از سیتوکروم b به این نتیجه رسیده‌اند که شترهای تک‌کوهانه قبل از مهاجرت آن‌ها به اوراسیا از هم جدا شده‌اند. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شده است که شترهای تک‌کوهانه از دوکوهانه جدا شده، سپس شترهای دوکوهانه وحشی و اهلی از یکدیگر جدا شده‌اند. همانند نتایج آن‌ها، فاصله فیلوژنتیکی بیشتری بین شترهای بدون‌کوهان و کوهان‌دار وجود دارد (Cui *et al*., 2007). فیلوژنی ترسیم شده در این تحقیق با نتایج حسنین و همکاران (Hassanin *et al*., 2012) که بر روی میتوکندری گونه‌های مختلف شتر ترسیم نموده‌اند، مطابقت دارد.

همان‌طور که مشخص گردید، شترهای تک‌کوهانه‌ای که از لحاظ ژنتیکی در بین شترهای دوکوهانه قرار دارند، تماماً نمونه‌های مربوط به کشور ایران می‌باشند. بدان معنی که شترهای تک‌کوهانه این نمونه‌های ایرانی دارای مادران دوکوهانه وحشی بودند، به‌طوری‌که ماده شترهای دوکوهانه وحشی به‌عنوان مولد با نرهای تک‌کوهانه اهلی آمیزش داده شده‌اند. برخی از نمونه‌های دیگر شترهای تک‌کوهانه ایرانی نیز در بین شترهای تک‌کوهانه قرار گرفتند، به‌طوری‌که هیچ قرابت ژنتیکی با شترهای دوکوهانه وحشی نداشتند. برخی از شترهای تک‌کوهانه ایرانی نیز قرابت نزدیکی با شترهای دوکوهانه اهلی داشتند. شتر تک‌کوهانه ترکمن ایرانی توالی‌یابی شده در این تحقیق نیز کاملاً در بین شترهای تک‌کوهانه قرار داشت، هر چند از لحاظ ژنتیکی، با انواع ایرانی در این

گروه اندکی فاصله داشت. به‌طور کلی، همان‌طور که در شکل ۷ مشخص است، با در نظر گرفتن شتر ترکمن، چهار گروه ژنتیکی برای شترهای تک‌کوهانه ایران وجود دارد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی در این گونه دامی می‌باشد. منشأ جغرافیایی نمونه شتر دوکوهانه وحشی که در بین دوکوهانه‌های اهلی قرار داشت، کشور ژاپن بود.

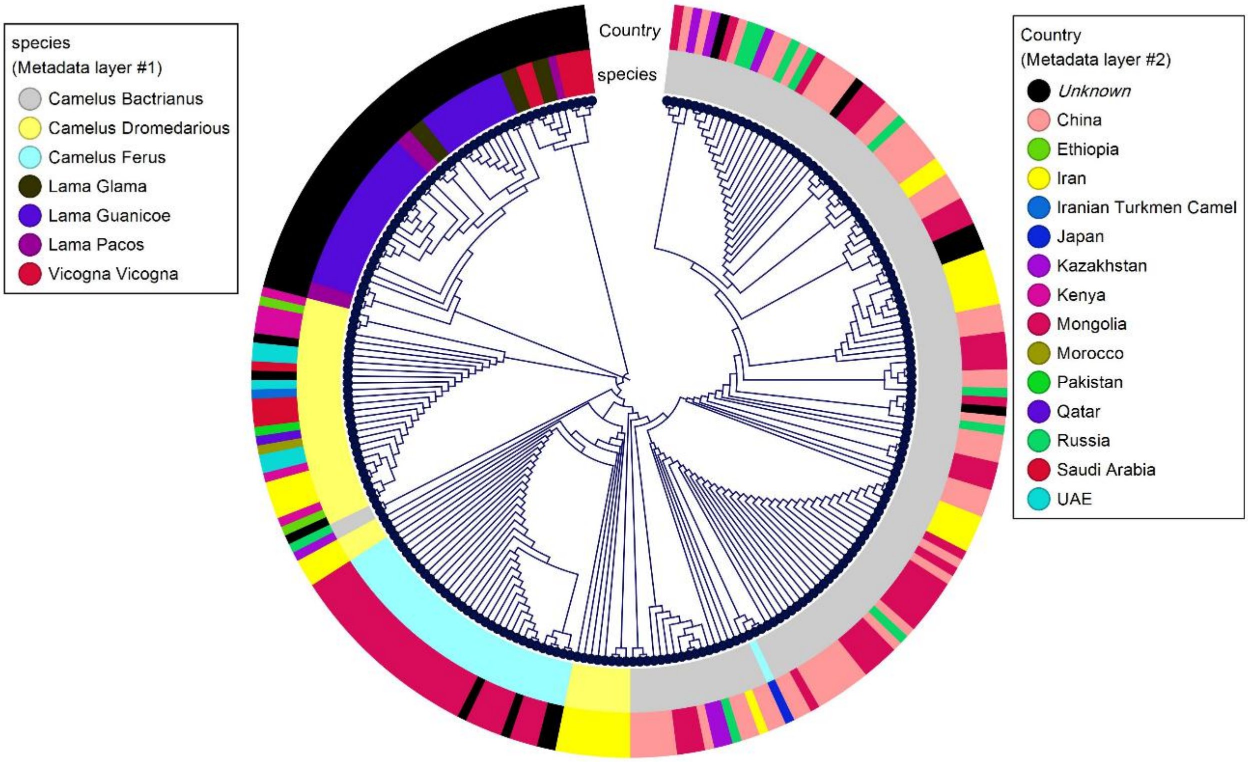
نتیجه‌گیری کلی

شترهای تک‌کوهانه ایرانی را با در نظر گرفتن نمونه تحقیق حاضر می‌توان در چهار گروه ژنتیکی دسته‌بندی نمود که دو گروه آن‌ها دارای منشأ شترهای دوکوهانه وحشی و اهلی می‌باشند و دو گروه دیگر در بین شترهای تک‌کوهانه اصیل قرار می‌گیرند. شترهای دوکوهانه اهلی ایرانی نیز از لحاظ فیلوژنتیکی به چهار گروه ژنتیکی قابل تقسیم بودند. از نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان در تعیین راهبردهای اصلاح نژادی این گونه ارزشمند استفاده نمود.



شکل ٦- درخت فیلوژنتیکی توالی DNA ژن سیتوکروم b در گونه‌های مختلف

Figure 6- Phylogenetic tree of DNA sequences of cytochrome b in different species



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی توالی DNA ژن سیتوکروم b در نمونه‌های گونه‌ها و کشورهای مختلف

Figure 7- Phylogenetic tree of DNA sequences of cytochrome b in samples of different countries and species

References

1. AlAskar, H., Alhajeri, B. H., Almathen, F., & Alhaddad, H. (2020). Genetic diversity and population structure of dromedary camel-types. *Journal of Heredity*, *111*(4), 405–413. DOI: 10.1093/jhered/esaa016.
2. Ali, A., Baby, B., & Vijayan, R. (2019). From desert to medicine: A review of camel genomics and therapeutic products. *Frontiers in Genetics*, *10*: 17. DOI: 10.3389/fgene.2019.00017.
3. Bhakat, C., & Sahani, S. (2019). Camel: A unique species in hot arid desert ecosystem. India: *Everyman's Science, XL*(6): 426-429. DOI: 10.31219/osf.io/6at4x.
4. Bahbahani, H., Musa, H. H., Wragg, D., Shuiep, E. S., Almathen, F., & Hanotte, O. (2019). Genome diversity and signatures of selection for production and performance traits in dromedary camels. *Frontiers in Genetics, 10*: 893. DOI: 10.3389/fgene.2019.00893.
5. Balmus, G., Trifonov, V. A., Biltueva, L. S., O'Brien, P. C. M., Alkalaeva, E. S., Fu, B., & Ferguson-Smith, M. A., (2007). Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: Further insights into the putative cetartiodactyla ancestral karyotype. *Chromosome Research*, *15*(4): 499–515. DOI: 10.1007/s10577-007-1154-x.
6. Burger, P.A. (2016). The history of old world camelids in the light of molecular genetics. *Tropical Animal Health and Production*, *48*(5): 905–913. DOI: 10.1007/s11250-016-1032-7.
7. Cui, P., Ji, R., Ding, F., Qi, D., Gao, H., Meng, H., Yu, J., Hu, S., & Zhang, H. (2007). A complete mitochondrial genome sequence of the wild two-humped camel (camelus bactrianus ferus): An evolutionary history of camelidae. *BMC Genomics*, *8*: 241. DOI: 10.1186/1471-2164-8-241.
8. Di Rocco, F., Zambe, A., Mate, L., & Vidal-Rioja, L. (2010). The complete mitochondrial DNA sequence of the guanaco (lama guanicoe): comparative analysis with the vicun˜a (Vicugna vicugna) genome. *Genetica*, *138*: 813–818. DOI: 10.1007/s10709-010-9465-9.
9. FAO. The food and agriculture organization of the United Nations. 2019. Italy: *FAOSTAT*. ISBN: 978-92-5-106215-9.
10. Farag, M. R., El Bohi, K. M,. Khalil, S. R., Alagawany, M., Arain, M. A., Sharun, K., Tiwari, R., & Dhama, K. (2020). Forensic applications of mitochondrial cytochrome b gene in the idendification of domestic and wild animal species. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 8*(1): 1–8. DOI: 10.18006/2020.8(1).1.8.
11. Faraz, A. (2019). The camel: a short communication on classification and attributes. *Journal of Fisheries and Livestock Production*, *7*: 1–3. DOI: 10.4172/2332-2608.1000289.

12. Gebreyohanes, M. G., & Assen, A. M. (2017). Adaptation mechanisms of camels (camelus dromedarius) for desert environment: A review. *Journal of Veterinary Science and Technology, 8*: 1–5. DOI: 10.4172/2157-7579.1000486.
13. Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, B., Negrini, R., Finalay, E. K., Jianglin, H., Groeneveld, E., & Wigend, S. (2010). Genetic diversity in farm animals – A review. *Animal Genetics, 41*(Suppl 1): S6–S31. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02038.x.
14. Hashim, M. W., Galal, Y. M., Ali, M. A., Khalafalla, A. I., Hamid, A. S., & Salah Eldein, S. A. (2015). Dromedary camels in sudan, types and sub types, distribution and movement. *International Journal of Pharmacological Research and Analysis, 5*: 8–12.
15. Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Van-Vuuren, B. J., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T. T., & Couloux, A. (2012). Pattern and timing of diversification of cetartiodactyla (mammalia, laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies, 335*: 32–50. DOI: 10.1016/j.crvi.2011.11.002.
16. Kameshpandian, P., Thomas, S., & Nagarajan, M. (2016). Genetic diversity and relationship of Indian Muscovy duck populations. *Mithochondrial DNA part A, 29*(2): 165-169. doi: 10.1080/24701394.2016.1261851. DOI: 10.1080/24701394.2016.1261851.
17. Ming, L., Yi, L., Guo, F.C., Siriguleng, S., & Jirimutu, J. (2016). Molecular phylogeny of the bactrian camel based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Genetics and Molecular Research, 15*(3): gmr.15038983. DOI: 10.4238/gmr.15038983.
18. Ming, L., Yi, L., Sa, R., Wang, Z.X., Wang, Z., & Ji, R. (2016). Genetic diversity and phylogeographic structure of bactrian camels shown by mitochondrial sequence variations. *Animal Genetics, 48*: 217–220. DOI: 10.1111/age.12511.
19. Piro, M., Mabsoute, F. E., El Khattaby, N., Laghouaouta, H., & Boujenane, I. (2020). Genetic variability of dromedary camel populations based on microsatellite markers. *Animal, 14*(12): 2452–2462. DOI: 10.1017/S1751731120001573.
20. Wheeler, J. C. (1995). Evolution and present situation of the South American camelidae. *Biological Journal of Linnean Society, 54*: 271–295. DOI: 10.1016/0024-4066(95)90021-7.
21. Wu, H. G., Guo, X. M., BAl-Fageeh, M., Cao, J. W., Pan, S. K., Zhou, H. M., Zhang, L., Abutarboush, M. H., Zhang, D., Li, J., Manee, M. M., Yang, Z. L., Yang, L. F., Liu, Y. Y., Zhang, J. L., Altammami, M. A., Wang, S. Y., Yu, L. L., Zhang, W. B., Liu, S. Y., Ba, L., Wang, J. Y., Yang, X. K., Meng, F. H., Wang, S. W., Li, L., Li, E. L., Wu, K. F., Zhang, S., Wang, J. Y., Yin, Y., Yang, H. M., Al-Swailem, A. M., & Wang, J. (2014). Camelid genomes reveal evolution and adaptation to desert environment. *Nature Communications, 5*: 5188. DOI: 10.1038/ncomms6188.

Contents

« Scientific Journal»
Iranian Journal of Animal Science Research

Vol. 14 **No. 3** **Fall 2022**

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad (F.U.M.)
Responsible Manager: H. Nassiri Moghaddam (Prof.)
Editor-in-Chief: R. Valizadeh (Prof.)

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

Ferdowsi University of Mashhad

Vol. 14 No. 3

2022

Iranian Journal of Animal Science Research

ISSN:2008-3106

Contents