نشریه علمی
پژوهش‌های علوم دامی ایران

جلد ۱۶ شماره ۲
سال ۱۴۰۳

(شماره پیاپی: ۵۸)

شاپا: ۳۱۰۶-۲۰۰۸

عنوان مقالات

تغذیه نشخوارکنندگان

تعیین ترکیب شیمیایی، قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر برون‌تنی سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ پالونیا و ذرت علوفه‌ای ۱۵۹
ایوب عزیزی

تغذیه طیور

اثرات مکمل جیره‌ای کروم آلی بر عملکرد تولید، کیفیت تخم‌مرغ، فراسنجه‌های ایمنی و بیوشیمیایی خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید ۱۷۳
مهرداد کریمی، مجید علیایی، حسین جان‌محمدی، روح الله کیانفر، فاطمه خادم‌ناسی

تأثیر سطوح مختلف ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس (*Arthrospira platensis*) بر عملکرد رشد، خصوصیات لاشه، جمعیت میکروبی روده و پاسخ ایمنی جوجه های گوشتی در شرایط تنش گرمایی و مقایسه آن با مکمل ویتامین E ۱۸۹
فرخ نظمی، سیدعلی میرقلنج، محسن دانشیار، محمدامیر کریمی ترشیزی، سینا بیوسنگان، حسنا حاجاتی

تعیین درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم فسفات و تأثیر آن بر عملکرد، کیفیت استخوان و قابلیت هضم فسفر در جوجه های گوشتی سویه آرین ۲۰۵
محمد صدقی، زهرا صزامی، راضیه قاسمی و مهدی زنقابی

اثرات جایگزینی سین بیوتیک و ماکروجلبک سارگاسوم با اکسی‌تتراسایکلین بر عملکرد، ویژگی‌های لاشه، ریخت‌شناسی روده و فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی ۲۲۳
محمد رضا رضوانی، محمد جواد آگاه، زهره گازر حبیب آبادی، علی داد بوستانی، هوشنگ لطف اللهیان، احمد علی تابتان شیرازی

ژنتیک

تجزیه و تحلیل اثرات تنظیمی lncRNAها بر بافت کلیه در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندروم آسیت ۲۳۷
کسری احمدیان، محمدرضا نصیری، کریم حسن پور، علی جوادمنش

پویش ژنومی بر پایه آنالیز چند جمعیتی مشترک مرتبط با صفت تعداد نتاج متولد شده در گوسفندان نژاد بومی و خارجی ۲۵۱
حسین محمدی

ارزیابی ویژگی های کیفی نخ ابریشم در آمیخته‌های کرم ابریشم ایرانی ۲۶۱
سید حسین حسینی مقدم ، رامین عبدلی، کامران محفوظی

تجزیه و تحلیل بیان ژن های کاندیدا در بخش های سفید و تیره بافت پوست در گوسفند لری بختیاری ۲۷۹
خدیجه مرادی، مصطفی محقق دولت آبادی، جواد حبیبی زاد

فیزیولوژی

اثر تزریق اسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند ۲۸۹
عباس فرح آور، حامد احمدی نژاد ، داریوش علیپور، حسن علی عربی

تأثیر شیره نارگیل در رقیق کننده بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی ۳۰۵
سارا رحمتی، سید مجتبی موسوی، علی فروهرمهر

نشریه علمی
پژوهشهای علوم دامی ایران

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

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

جلد ۱۶ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول : دکتر حسن نصیری مقدم

سردبیر : دکتر رضا ولی زاده

اعضای هیئت تحریریه :

دکتر رضا ولی زاده	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر محسن دانش مسگران	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر مرتضی چاجی	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
دکتر حسن علی عربی	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه بوعلی سینا- همدان
دکتر جمال سیف دواتی	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دانشگاه محقق اردبیلی
دکتر حسن نصیری مقدم	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر ابوالقاسم گلیان	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر حسین جانمحمدی	استاد تغذیه طیور	دانشگاه تبریز
دکتر فریبرز خواجعلی	استاد تغذیه طیور	دانشگاه شهرکرد
دکتر احمد حسن آبادی	استاد تغذیه طیور	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر بهروز دستار	استاد تغذیه طیور	دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دکتر نصراله پیرانی	دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه شهرکرد
دکتر محمدرضا نصیری	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر مجتبی طهمورث پور	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر سعید زره داران	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر عباس پاکدل	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دانشگاه صنعتی اصفهان
دکتر حسن دوستی	استاد ریاضیات و آمار	دانشگاه مکواری، استرالیا
دکتر مهدی سرگلزایی	دانشیار ژنتیک	دانشگاه گوئلف، کانادا

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

بسم الله الرحمن الرحیم

مندرجات

تغذیه نشخوارکنندگان **صفحه**

تعیین ترکیب شیمیایی، قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر برون‌تنی سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای ۱۵۹

ایوب عزیزی

تغذیه طیور

اثرات مکمل جیره‌ای کروم آلی بر عملکرد تولید، کیفیت تخم‌مرغ، فراسنجه‌های ایمنی و بیوشیمیایی خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید ۱۷۳

مهرداد کریمی، مجید علیایی، حسین جان‌محمدی، روح الله کیانفر، فاطمه خادم‌ناسی

تأثیر سطوح مختلف ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس(Arthrospira platensis) بر عملکرد رشد، خصوصیات لاشه، جمعیت میکروبی روده و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی و مقایسه آن با مکمل ویتامین E ۱۸۹

فرخ نظمی، سیدعلی میرقلنج، محسن دانشیار، محمدامیر کریمی ترشیزی، سینا پیوستگان، حسنا حاجاتی

تعیین درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم فسفات و تأثیر آن بر عملکرد، کیفیت استخوان و قابلیت هضم فسفر در جوجه‌های گوشتی سویه آرین ۲۰۵

محمد صدقی، زهرا صرّامی، راضیه قاسمی و مهدی زنقایی

اثرات جایگزینی سین‌بیوتیک و ماکروجلبک *سارگاسوم* با اکسی‌تتراسایکلین بر عملکرد، ویژگی‌های لاشه، ریخت‌شناسی روده و فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی ۲۲۳

محمد رضا رضوانی، محمد جواد آگاه، زهره گازر حبیب آبادی، علی‌داد بوستانی، هوشنگ لطف اللهیان، احمد علی ثابتان شیرازی

ژنتیک

تجزیه و تحلیل اثرات تنظیمی lncRNAها بر بافت کلیه در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندروم آسیت ۲۳۷

کسری احمدیان، محمدرضا نصیری، کریم حسن پور، علی جوادمنش

پویش ژنومی بر پایه آنالیز چند جمعیتی مشترک مرتبط با صفت تعداد نتاج متولد شده در گوسفندان نژاد بومی و خارجی ۲۵۱

حسین محمدی

ارزیابی ویژگی‌های کیفی نخ ابریشم در آمیخته‌های کرم ابریشم ایرانی ۲۶۱

سید حسین حسینی مقدم ، رامین عبدلی، کامران محفوظی

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کاندیدا در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفند لری بختیاری ۲۷۹

خدیجه مرادی، مصطفی محقق دولت آبادی، جواد حبیبی زاد

فیزیولوژی

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند ۲۸۹

عباس فرح آور، حامد احمدی نژاد ، داریوش علیپور، حسن علی عربی

تأثیر شیره نارگیل در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی ۳۰۵

سارا رحمتی، سید مجتبی موسوی، علی فروهرمهر

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 157-170

Chemical Composition, Digestibility and *in vitro* Fermentation Variables of Mixed Silage from Different Levels of *Paulownia* Leaves and Forage Corn

Ayoub Azizi [1*]

۱- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
*Corresponding Author's Email: azizi.ay@lu.ac.ir

Received: 19-07-2023
Revised: 06-10-2023
Accepted: 17-10-2023
Available Online: 17-10-2023

How to cite this article:
Azizi, A. (2024). Chemical composition, digestibility and *in vitro* fermentation variables of mixed silage from different levels of *Paulownia* leaves and forage corn. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 157-170. (in Persian with English abstract). http://doi.org//10.22067/ijasr.2023.83509.1161

Introduction: The dry climate and water scarcity in most areas of Iran caused to serious restriction in planting fodder. Therefore, it is very important to find new fodder sources to feed ruminants in order to reduce the ration costs. One of the new sources of fodder that may have a favorable nutritional value are plants of the *Paulowniaceae* family in China, East Asia and some parts of Iran. Several types of *Paulownia* are known in the world. These plants are known for their high growth rate and intense photosynthesis, which are specific to C_4 plants, and with wide leaves with a diameter of about 90 cm. The commercial production of Paulownia wood generates a large quantity of leaves, which are typically used as natural fertilizers. At the age of about 6 to 8 years, the production leaf of each *Paulownia* tree reaches about 100 kg. When the leaves have a favorable nutritional value, they can be used as fodder in feeding ruminants. In Iran, there has been no study on the nutritional value of *Paulownia* leaves for use in animal feed. Therefore, the aim of this research was to investigate the chemical composition of *Paulownia* leaves and the chemical composition, gas production parameters, digestion and fermentation characteristics of the silages from the mixture of different levels of *Paulownia* leaves (Tebjoo hybrid variety) and fodder corn *in vitro*.

Materials and Methods: The corn forage and *Paulownia* leaves (Tebjoo hybrid variety) were prepared. At first, the chemical composition of corn forage and Paulownia leaf samples was determined based on the conventional methods. Then, both forages were chopped into 2-4 cm sizes using a hand chopper for silage preparation. Experimental treatments included silages containing different ratios of fodder corn and *Paulownia* leaves (0:100, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100). The materials were compacted in the plastic containers and the silage period lasted 60 days. Determining the chemical composition of fresh fodders and the nutritional value of experimental silages including chemical composition, *in vitro* gas production and fermentation parameters, digestibility and enzyme activity were carried out based on a completely random design.

Results and Discussion: Results indicated that dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), ether extract (EE), lignin, non-fibrer carbohydrates (NFC) and water soluble carbohydrates content of fresh *Paulownia* leaves were 266, 911, 173, 402, 201, 35.5, 86.4, 404 and 91.2 g/kg DM, respectively. The mentioned chemical composition in *Paulownia* silage were 273, 902, 164, 393, 191, 38.8, 74.5, 386 and 25.4 g/kg DM, respectively. With increasing the proportion of *Paulownia* leaf in silage, DM, CP, lignin, EE, ammonia nitrogen concentration increased linearly ($P<0.05$). However, OM, NDF and ADF decreased linearly ($P<0.05$). By increasing the ratio of *Paulownia* leaf to corn in the silage, *in vitro* gas production (GP) in 24, 36 and 48 h, GP potential (coefficient b) and short-chain volatile fatty acids concentration decreased linearly ($P<0.05$), although it linearly increased ammonia nitrogen concentration and microbial protein synthesis ($P<0.05$). The carboxymethyl cellulase and filter paper degrading activities decreased linearly with increasing the inclusion level of *Paulownia* leaf in silage ($P<0.05$). However,

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org//10.22067/ijasr.2023.83509.1161

ruminal alpha-amylase and protease activity showed a linear increase (P<0.05).

Conclusion: The present study showed that the *Paulownia* leaf of Tebjoo hybrid variety has a favorable nutritional value as a new forage source in animal nutrition. Also, the preparation of silages including different ratio of *Paulownia* leaves and corn is recommended for animal feeding in the conditions of significant shortage of protein resources in the country. Future research is warranted to investigate how *Paulownia* leaf affect ruminant performance.

Keywords: Chemical composition, Corn forage, Digestibility, Fermentation parameters, *Paulownia* leaf, Silage.

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۷۰-۱۵۷

تعیین ترکیب شیمیایی، قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر برون‌تنی سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای

ایوب عزیزی[1*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین ارزش غذایی برگ *پالونیا* و سپس تعیین ترکیب شیمیایی، تولید گاز، هضم‌پذیری و فراسنجه‌های تخمیر برون‌تنی سیلاژ مخلوط سطوح مختلف برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای در شرایط برون‌تنی بود. تیمارهای آزمایشی شامل سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا* (۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵ و ۰:۱۰۰) بود. نتایج نشان داد که محتوای ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی، عصاره اتری، لیگنین، کربوهیدارت‌های غیر فیبری و کربوهیدرات‌های محلول برگ *پالونیای* تازه به‌ترتیب برابر ۲۶۶، ۹۱۱، ۱۷۳، ۴۰۲، ۲۰۱، ۳۵/۵، ۸۶/۴، ۳۰۱ و ۹۱/۲ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود. ترکیبات مذکور در سیلاژ برگ *پالونیا* به‌ترتیب برابر ۲۷۳، ۹۰۲، ۱۶۴، ۳۹۳، ۱۹۱، ۳۸/۸، ۷۴/۵، ۳۸۶ و ۲۵/۴ گرم در کیلوگرم ماده خشک به‌دست آمد. با افزایش نسبت برگ *پالونیا* و کاهش سهم ذرت علوفه‌ای در سیلاژهای مخلوط، درصد ماده خشک، پروتئین خام، لیگنین، عصاره اتری، کربوهیدارت‌های غیر فیبری و غلظت نیتروژن آمونیاکی سیلاژ به‌طور خطی افزایش یافت ($P<۰/۰۵$). امّا، درصد ماده آلی، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با افزایش برگ *پالونیا* کاهش خطی معنی‌داری نشان دادند ($P<۰/۰۵$). با افزایش سطح برگ *پالونیا* در مخلوط سیلویی، تولید گاز برون‌تنی در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، پتانسیل تولید گاز (ضریب b) و غلظت اسیدهای چرب فرار به‌طور خطی کاهش یافت ($P<۰/۰۵$)، هر چند افزایش سطح برگ *پالونیا* سبب افزایش خطی غلظت نیتروژن آمونیاکی و سنتز پروتئین میکروبی شد ($P<۰/۰۵$). فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی با افزایش سطح برگ *پالونیا* در سیلاژ به‌طور خطی کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). امّا فعالیت آلفا آمیلاز و پروتئاز شکمبه افزایش خطی نشان دادند ($P<۰/۰۵$). در کل، نتایج تحقیق نشان داد که برگ *پالونیا* دارای ارزش غذایی مطلوبی جهت استفاده در تغذیه دام به‌ویژه در شرایط کمبود منابع پروتئینی به‌عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید است. به‌علاوه، سیلو کردن سطوح مختلف برگ *پالونیا* مخلوط با ذرت علوفه‌ای به‌عنوان یک روش نگهداری برای آن قابل توصیه است و سبب بهبود محتوای نیتروژن و کربوهیدرات‌های غیر فیبری سیلاژ نیز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: برگ *پالونیا*، ترکیب شیمیایی، ذرت علوفه‌ای، سیلاژ، فراسنجه‌های تخمیر، گوارش‌پذیری

مقدمه

منابع علوفه‌ای ایران عمدتاً شامل یونجه، ذرت علوفه‌ای و کاه غلات هستند. کمبود منابع آبی از یک طرف و زیاد بودن نیاز آبی اغلب گیاهان علوفه‌ای رایج از طرف دیگر، سبب شده است تا تولید علوفه با کیفیت در کشور با محدودیت جدی مواجه شود. همچنین، نوع ارقام مورد استفاده، مدیریت کاشت، داشت و برداشت علوفه و مدیریت نگهداری آن نیز سبب کاهش سطح و کیفیت علوفه تولیدی شده است. بنابراین، یافتن و استفاده بهینه منابع علوفه‌ای جدید به‌منظور استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان، به‌ویژه اگر سبب کاهش آلودگی‌های زیست محیطی (گازهای گلخانه‌ای) نیز شود، بسیار مورد توجه است (Huang *et al.*, 2021). یک منبع علوفه‌ای جدید ضمن دارا بودن قابلیت رشد سریع و مقاومت به شرایط گرم و خشک، باید ارزش غذایی مناسبی نیز داشته باشد (Huang *et al.*, 2021). یکی از منابع علوفه‌ای جدید که ممکن است دارای ارزش غذایی مطلوبی

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: azizi.ay@lu.ac.ir)
http://doi.org//10.22067/ijasr.2023.83509.1161

باشد، گیاهان خانواده *پالونیای* (*Paulowniaceae*) چینی و آسیای شرقی هستند (Garcia-Morote *et al.*, 2014). چندین گونه *پالونیا* در دنیا شناخته شده است که مهم‌ترین آن‌ها شامل گونه‌های آلبیفلوا (*P. albiphloea*)، آسترالیس (*P. australis*)، الونگاتا (*P. elongata*)، فارگسی (*P. fargesii*)، فوتونئی (*P. fortunei*)، کاتالبیفولیا (*P. catalpifolia*)، کاواکامی (*P. kawakamii*) و تومنتوسا (*P. tomentosa*) هستند (Yadav *et al.*, 2013; Bodnar *et al.*, 2014). این گیاهان به‌دلیل سرعت رشد زیاد و فتوسنتز شدیدی که مختص گیاهان C_4 است و برگ‌های پهن با قطر حدود ۹۰ سانتی‌متر شناخته می‌شوند (Icka *et al.*, 2016). از تنه این درختان در صنعت چوب استفاده می‌شود، لذا تولید تجاری چوب *پالونیا* باعث تولید توده بسیار زیادی از برگ می‌گردد که معمولاً به‌عنوان کود طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حدود شش تا هشت سالگی، برگ تولیدی هر درخت *پالونیا* به‌حدود ۱۰۰ کیلوگرم می‌رسد. زمانی‌که برگ‌ها دارای ارزش غذایی مطلوبی هستند، می‌توان از آن‌ها به‌عنوان علوفه در تغذیه نشخوارکنندگان استفاده نمود. اخیراً، در مطالعه‌ای محتوای ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، عصاره اتری، الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF)[1]، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)[2]، کربوهیدرات‌های غیر فیبری (NFC)[3] و نشاسته برگ *پالونیا* به‌ترتیب، ۲۷۵، ۸۸۶، ۱۷۵، ۲۴/۴، ۳۴۱، ۲۹۵، ۳۴۵ و ۱۹/۶ گرم در کیلوگرم ماده خشک و محتوای انرژی خام آن ۱۴/۲ مگاژول در کیلوگرم ماده خشک گزارش شد (Huang *et al.*, 2021). از طرفی، برگ‌های *پالونیا* دارای ترکیبات فنولی و به‌خصوص اسیدهای فنولی، ساپونین و فلاونوئید هستند که تغذیه آن‌ها به دام ممکن است سبب تعدیل تخمیر شکمبه‌ای و بروز آثار مفیدی مانند بهبود متابولیسم نیتروژن و سنتز پروتئین میکروبی و کاهش تولید گاز متان شود (Huang *et al.*, 2021; Ozelcam *et al.*, 2021). با توجه به کمبود میزان سیلاژ ذرت تولیدی در کشور و نیز معایبی از قبیل زیاد بودن میزان رطوبت (ماده خشک حدود ۲۲-۲۰ درصد) و محتوای کم پروتئین خام، به نظر می‌رسد که می‌توان با استفاده از مخلوطی از ذرت علوفه‌ای و برگ‌های تازه *پالونیا*، سیلاژی با خصوصیات و ارزش غذایی مطلوب‌تر تهیه کرده، و بخشی از کمبودهای خوراک دام به‌خصوص در مزارع کوچک پرورش دام را مرتفع نمود. این نکته را نیز باید مد نظر داشت که زمان برداشت برگ‌های *پالونیا* در دو ماه اول پاییز هر سال بوده، که این خود همزمان با برداشت ذرت علوفه‌ای در مناطق سردسیر کشور است. کشت و پرورش درخت *پالونیا* و به‌خصوص واریته‌های اصلاح شده و هیبرید آن به‌منظور زراعت چوب در بسیاری از مناطق ایران در حال گسترش است که از منظر تغذیه دام، می‌توان به برگ‌های این درخت به دید ارزش افزوده توجه نمود و آن را در جیره غذایی دام‌ها گنجاند. درباره سطح زیر کشت درخت *پالونیا* در کشور اطلاعات دقیقی در دست نیست، امّا کشت این درخت در کشور به‌طور فزاینده‌ای در حال افزایش است. بر اساس اطلاعات موجود، پراکنش آن بیشتر در استان‌های فارس، اصفهان، مازندران، گیلان، گلستان و خراسان شمالی می‌باشد. تاکنون عمده مطالعاتی که روی برگ *پالونیا* به‌عنوان خوراک دام صورت گرفته، تغذیه برگ خشک یا سیلاژ آن بوده است. اخیراً، در مطالعه‌ای افزودن شش درصد سیلاژ *پالونیا* به‌جای سیلاژ یونجه بر حسب ماده خشک در جیره گاو شیری سبب افزایش pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی، پروپیونات، ایزو والرات، والرات و جمعیت پروتوزوای *ایزوتریش*، *داسیتریشا رومینتیوم*، *ایزوتریشا پروستوماتا* و *ایزوتریشا اینتستینالیس* و کاهش غلظت استات شکمبه شد، هر چند گوارش‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و NDF تحت تأثیر قرار نگرفت (Huang *et al.*, 2022). در مطالعه مذکور، کاربرد سیلاژ برگ *پالونیا* در جیره سبب افزایش جمعیت کل گونه‌های باکتریایی شکمبه به‌جز *رومینوکوکوس فلاووفاسیانس*، *رومینوکوکوس آلبوس* و گونه‌های لاکتوباسیلوس شد، و جمعیت کل آرکی باکتری‌ها، متانومیکروب‌ها و متانوباکتری‌ها کاهش یافت. در ایران تاکنون مطالعه‌ای روی بررسی ارزش غذایی برگ *پالونیای* اصلاح شده برای استفاده در تغذیه دام صورت نگرفته است. لذا، هدف از تحقیق حاضر، بررسی ترکیب شیمیایی برگ *پالونیا* و سپس بررسی ارزش غذایی، فراسنجه‌های تولید گاز، خصوصیات هضم و تخمیر سیلاژ حاصل از مخلوط سطوح مختلف برگ *پالونیای* اصلاح شده رقم "طب جو" با ذرت علوفه‌ای در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ذرت علوفه‌ای و برگ پالونیا و آماده‌سازی سیلاژهای آزمایشی

ذرت علوفه‌ای از مزارع تحت کشت در اطراف شهرستان خرم‌آباد تهیه شد. برگ *پالونیای* اصلاح شده رقم هیبرید طب جو (شرکت طب جویان، شیراز، استان فارس) از یک مزرعه پرورش *پالونیای* ۳-۲ ساله در اطراف شهر خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. برگ‌ها به‌صورت دستی از ۱۵ درخت به‌طور تصادفی برداشت و مخلوط شد. در ابتدا، بر اساس روش‌های مرسوم اقدام به تعیین ترکیب شیمیایی نمونه‌های ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیای* تازه شد (پنج تکرار به‌ازای هر علوفه). قبل از سیلو کردن هر دو علوفه به‌وسیله دستگاه چاپر دستی آشپزخانه در اندازه‌های ۴-۲ سانتی‌متری خرد شد و از هر علوفه به‌مقدار مورد نیاز برای تهیه مخلوط سیلاژهای آزمایشی نمونه‌برداری شد. سپس عملیات سیلو کردن مخلوطی از این دو علوفه به نسبت‌های مختلف

1- Neutral Detergent Fiber
2- Acid Detergent Fiber
3- Non Fiber Carbohydrates

صورت گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل سیلاژهای حاوی ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا* به‌ترتیب با نسبت‌های ۱۰۰:۰، ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰، ۲۵:۷۵ و ۰:۱۰۰ بر اساس درصد ماده خشک بود. نحوه تهیه سیلاژهای آزمایشی به این صورت بود که هر سیلاژ در هشت تکرار (در کل ۴۰ ظرف پلاستیکی) در ظرف‌های پلاستیکی با ظرفیت ۱۰ کیلوگرم قرار داده شد و پس از فشردن و خارج نمودن هوا توسط جارو برقی، از بی‌هوازی بودن آن‌ها حصول اطمینان شد. سپس، درب ظرف‌ها بسته شده و به‌مدت ۶۰ روز عملیات سیلو کردن نمونه‌ها انجام شد. ظرف‌های حاوی مواد سیلویی حاوی روزنه‌ای جهت خروج شیرابه بودند. پس از طی این مدت، درب ظرف‌ها باز شده و خصوصیاتی از قبیل محتوای ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، عصاره اتری، NDF، ADF، کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSC)[1]، NFC و غلظت نیتروژن آمونیاکی سیلاژها بر اساس روش‌های استاندارد تعیین شد. میزان pH سیلاژها نیز بلافاصله اندازه‌گیری شد. برای تعیین pH سیلاژ، ۵۰ گرم نمونه تازه در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری توزین گردید و ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. نمونه‌ها طی یک ساعت به‌طور متناوب به هم زده شدند. سپس، عصاره حاصل به بشر کوچک‌تری منتقل گردید و pH با استفاده از pHمتر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) تعیین شد (Faithfull, 2000).

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

پیش از تجزیه شیمیایی، ابتدا نمونه‌های علوفه و سیلاژ حاصل از آن‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون برای رسیدن به وزن ثابت، خشک شد و سپس با استفاده از آسیاب مجهز به الک با قطر منافذ یک میلی‌متری آسیاب شدند. میزان ماده خشک، خاکستر خام، ماده آلی، پروتئین خام و عصاره اتری در نمونه‌های علوفه تازه و سیلاژ بر اساس روش‌های انجمن شیمیدانان رسمی (AOAC, 2002) تعیین گردید. میزان ADF و لیگنین توسط روش ون‌سوست و همکاران (VanSoest *et al.*, 1991) محاسبه گردید. برای تعیین میزان NDF نمونه‌ها از روش مرتنز (Mertens, 2002) استفاده شد. برای تعیین میزان NDF و ADF نمونه‌ها از دستگاه فایبرتک (Fibertec System M, Tecator, 1020 Hot Extraction, Flawil, Switzerland) و بدون استفاده از سدیم سولفیت و آنزیم آلفا امیلاز مقاوم به حرارت استفاده شد. محتوای WSC نمونه‌ها توسط روش آنترون تعیین شد (MAFF, 1982). در این روش، عصاره کربوهیدراتی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی، در مجاورت معرف آنترون (مخلوط اسید سولفوریک، تیوره و آنترون)، در حمام آب جوش حرارت داده شد تا کمپلکسی به رنگ آبی- سبز ایجاد گردد. سپس، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل ۳۴۰ (HITACHI) خوانده شد. محتوای NFC نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر تخمین زده شد (McDonald *et al.*, 2011):

$$NFC\ (\%) = 100 - [NDF\ \%) + CP\ (\%) + EE\ (\%) + Ash\ (\%)]$$

که در آن، NFC: درصد کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی، NDF: درصد الیاف نامحلول در شوینده خنثی، CP: درصد پروتئین خام، EE: درصد عصاره اتری و Ash: درصد خاکستر خام است. میزان نیتروژن آمونیاکی نمونه‌ها با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت اندازه‌گیری شد (Broderick and Kang, 1980).

آزمون تولید گاز برون‌تنی

به‌منظور انجام آزمون تولید گاز برون‌تنی، مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نژاد لری- بختیاری بالغ که حداقل به‌مدت دو هفته با جیره غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره تغذیه شدند، قبل از تغذیه صبحگاهی از طریق لوله مری تهیه شد. جیره آزمایشی دام‌ها حاوی ۳۰ درصد کاه گندم، ۱پنج درصد سیلاژ ذرت، ۱پنج درصد یونجه خشک، ۱۸/۵ درصد بلغور ذرت، ۲۰ درصد سبوس گندم، ۰/۵ درصد اوره، ۰/۵ درصد کربنات کلسیم، ۰/۲۵ درصد مواد معدنی و ویتامینه و ۰/۲۵ درصد نمک بر حسب ماده خشک بود که بر اساس جداول احتیاجات تغذیه‌ای نشخوارکنندگان کوچک متوازن شده بود (NRC, 2007). گوسفندان روزانه دو بار و در حد احتیاجات نگهداری تغذیه شدند. محتوای پروتئین خام و انرژی قابل متابولیسم جیره تغذیه شده به گوسفندان به‌ترتیب ۱۱/۸ درصد و ۲/۳۳ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک بود.

محتویات شکمبه هر سه رأس گوسفند در هر مرحله در یک فلاسک عایق که از قبل توسط گاز دی اکسید کربن بی‌هوازی شده بود، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد کاملاً مخلوط گردید و سریعاً (در کمتر از ۲۰ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل شد. قبل از تزریق به داخل ویال‌های آزمایشی، محتویات شکمبه توسط چهار لایه پارچه متقال صاف شد. دو آزمون تولید گاز به‌طور همزمان و در سه سری (Run) مجزا انجام شد. در آزمون اول، ابتدا میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه سیلاژ کاملاً خشک آسیاب شده و با اندازه ذرات یک میلی‌متر به داخل هر ویال برای تعیین پارامترهای آزمون تولید گاز قرار داده شد (پنج تکرار به‌ازای هر تیمار در هر سری؛ ۲۵ ویال آزمایشی در هر سری به‌علاوه سه ویال بلانک، جمعاً ۲۸ ویال در هر سری، و در کل ۸۴ ویال در هر سه سری برای آزمایش تولید گاز). سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، با پنج میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی

1- Water Soluble Carbohydrates

تلقیح گردید (Marten and Barnes, 1980). جهت حصول اطمینان از ایجاد شرایط بی‌هوازی، گاز دی اکسید کربن به شیرابه شکمبه صاف شده و بزاق مصنوعی قبل و پس از تزریق به داخل ویال‌ها نیز تزریق گردید. میزان سه ویال نیز به‌عنوان بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شده و در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان گاز تولیدی هر ویال توسط دستگاه فشارسنج دیجیتال در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای تعیین پارامترهای تولید گاز از معادله ۱ استفاده گردید (Blümmel *et al.*, 2003).

$$P = b(1 - e^{-ct})$$ معادله (۱)

که در آن، b: گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c: سرعت تولید گاز در ساعت، t: زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P: میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

آزمون دوم تولید گاز با هشت تکرار به‌ازای هر تیمار و سه سری (هشت تکرار به‌ازای هر تیمار در هر سری؛ ۴۰ ویال آزمایشی در هر سری به‌علاوه سه ویال بلانک، جمعاً، ۴۳ ویال در هر سری، و در کل، ۱۲۹ ویال در هر سه سری برای فراسنجه‌های هضم و تخمیر برون‌تنی). به‌منظور تعیین گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک، قابلیت هضم ماده آلی و تخمین انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی و نیز فراسنجه‌های تخمیر شامل pH، نیتروژن آمونیاکی، سنتز پروتئین میکروبی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و فعالیت آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Vercoe *et al.*, 2010)، ابتدا میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید، سپس pH به‌وسیله pHمتر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) قرائت شد. محتوای هر ویال با دور ۲۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک شده و میزان گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون محاسبه گردید. جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان گوارش‌پذیری ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم سیلاژهای آزمایشی به‌ترتیب بر اساس معادله‌های ۲ و ۳ تخمین زده شد (Menke and Steingass, 1988):

$$IVOMD\ (g/kg\ OM) = 148.8 + 8.89\ GAS + 4.50\ CP + 6.51\ XA$$ معادله ۲

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.2 + 0.136GP + 0.0157CP + 0.00002859CP^2$$ معادله ۳

که در این معادله‌ها، IVOMD: میزان گوارش‌پذیری ماده آلی، GAS: میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (Menke and Steingass, 1988)، CP: میزان پروتئین خام به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک، XA: خاکستر به‌صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک و ME: انرژی قابل متابولیسم می‌باشد.

تولید پروتئین میکروبی (MPS)[1] به‌صورت معادله ۴ محاسبه گردید (Blümmel *et al.*, 1997):

$$MPS\ (mg/g\ DM) = mg\ ADS - (ml\ gas \times 2.2\ mg/ml)$$ معادله ۴

که در آن، ADS: سوبسترای هضم شده ظاهری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ml gas: حجم گاز تولیدی پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته و ۲/۲: عامل استوکیومتری بر حسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای سنتز اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.

غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (Getachew *et al.*, 2002):

$$SCFA\ (mmol/200\ mg\ DM) = 0.0222GP - 0.0042$$ معادله ۵

که در آن، SCFA: اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر تولیدی و GP: حجم گاز تولیدی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

تعیین فعالیت آنزیم‌های هیدرولتیک میکروبی شکمبه

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی، آلفا آمیلاز و پروتئاز موجود در بخش میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های جمع‌آوری شده) بر اساس روش آگاروال (Agarwal, 2000) تخمین زده شد. روش کار به این صورت بود که پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، ابتدا محتوای هر ویال (چهار ویال به‌ازای هر تیمار) به‌مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ گردیده و بقایا جمع‌آوری گردید. سپس بقایا با تتراکلرید کربن و آنزیم لیزوزیم فرآیند شده و مخلوط آنزیم‌های مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور ۲۷۰۰۰×g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌دست آمد. برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه صاف شده و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز یک درصد (به‌عنوان سوبسترا) بوده که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی‌لیتر شیرابه

1- Microbial Protein Synthesis

شکمبه صاف شده و یک میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز یک درصد (به‌عنوان سوبسترا) بوده که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به‌منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی‌لیتر شیرابه شکمبه صاف شده و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به‌عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن سه میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش میلر (Miller, 1959) تخمین زده شد. فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی، توانایی تولید یک میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی‌لیتر را تحت شرایط مخلوط واکنش دارد، محاسبه گردید. برای تعیین فعالیت پروتئازی شکمبه، مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۰/۲۵ میلی‌لیتر کازئین (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ساعت انکوبه گردید. سپس، مخلوط واکنش با افزودن تری‌کلرو استیک اسید (۲۰۰ میلی‌لیتر در لیتر) متوقف شده و پروتئین بر اساس روش مربوطه تعیین شد (Lowry *et al.*, 1951).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیای* تازه و سیلاژهای آزمایشی حاصل از آن‌ها با استفاده از رویه GLM و توسط نرم‌افزار آماری (SAS, 2005) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به‌صورت مدل زیر بود:

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

که در آن، Y_{ij}، μ، T_i و e_{ij}: به‌ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام و اثر خطای آزمایشی است. میانگین‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری پنج درصد با هم مقایسه شدند.

تجزیه واریانس سایر داده‌ها شامل تولید گاز، گوارش‌پذیری مواد مغذی، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیمی سیلاژهای آزمایشی با استفاده از رویه MIXED و توسط نرم‌افزار آماری (SAS, 2005) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به‌صورت مدل زیر بود:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + Run_j + e_{ijk}$$

که در آن، Y_{ijk}، μ، T_i، Run_j و e_{ijk}: به‌ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر ثابت تیمار آزمایشی iام، اثر تصادفی دوره jام و اثر خطای آزمایشی است. میانگین‌های صفات به‌دست آمده با استفاده از مقایسات متعامد (خطی و غیر خطی) و در سطح معنی‌داری پنج درصد با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی برگ *پالونیا*، ذرت علوفه‌ای و سیلاژهای حاصل از آن‌ها

در جدول ۱، نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیای* تازه ارائه شده است. محتوای ماده خشک، پروتئین خام و لیگنین در برگ *پالونیا* به‌طور معنی‌داری بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود ($P<0/05$). این در حالی است که محتوای ماده آلی، NDF و ADF ذرت علوفه‌ای به‌طور معنی‌داری بیشتر از برگ *پالونیا* به‌دست آمد ($P<0/05$). میزان عصاره اتری، NFC و WSC دو علوفه مشابه بود ($P>0/05$). در جدول ۲، نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی سیلاژهای مخلوط حاوی نسبت‌های مختلف برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای ارائه شده است. با افزایش سطح برگ *پالونیا* در سیلاژ، درصد ماده خشک، پروتئین خام، لیگنین، عصاره اتری، و غلظت نیتروژن آمونیاکی به‌طور خطی افزایش یافت ($P<0/05$). به هر حال، درصد ماده آلی، NDF و ADF با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به‌طور خطی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). محتوای NFC، WSC و pH سیلاژهای آزمایشی تحت تأثیر نسبت برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای قرار نگرفت ($P>0/05$). باید عنوان نمود که به‌جز محتوای ماده خشک که در سیلاژ برگ *پالونیا* و سیلاژ ذرت علوفه‌ای اندکی بیشتر از علوفه تازه آن‌ها بود (جداول ۱ و ۲)، میزان سایر ترکیبات شیمیایی در هر سیلاژ کمتر از میزان آن در علوفه تازه بود. افزایش میزان ماده خشک در سیلاژها احتمالاً به‌دلیل خروج بخشی از رطوبت آن‌ها به‌صورت شیرابه سیلویی باشد. میزان پروتئین خام در علوفه و سیلاژ برگ *پالونیا* به‌طور قابل توجهی بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود (جداول ۱ و ۲) که این می‌تواند پتانسیل و مزیت برگ *پالونیا* به‌عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید، به‌خصوص در شرایطی که پروتئین به‌عنوان یک عامل محدودکننده در جیره نشخوارکنندگان مطرح باشد، را نشان دهد. همچنین، برخلاف ذرت علوفه‌ای، غلظت پروتئین خام در برگ تازه و سیلو شده *پالونیا* (به‌ترتیب ۱۷۳ و ۱۶۴ گرم در کیلوگرم ماده خشک) بیشتر از حداقل پروتئین خام مورد نیاز (هشت درصد ماده خشک) برای تولید آمونیاک کافی در شکمبه به‌منظور دستیابی به حداکثر رشد میکروبی بود (Norton, 1998)، این می‌تواند یکی دیگر از مزیت‌های استفاده از برگ یا سیلاژ *پالونیا* در تغذیه دام باشد. با سیلو کردن، غلظت پروتئین خام هر دو سیلاژ آزمایشی در مقایسه با علوفه تازه آن‌ها اندکی کاهش یافت که این احتمالاً به‌دلیل تجزیه بخشی از پروتئین خام در اثر فعالیت میکروب‌ها و تولید آمونیاک می‌باشد (McDonald *et al.*, 2011).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیای* تازه (گرم در کیلوگرم ماده خشک یا واحد بیان شده)

Table 1- Chemical composition of fresh forage corn and *Paulownia* leaf (g/kg DM or as statsed)

پارامتر Parameter	نوع علوفه Forage type ذرت Corn	 برگ *پالونیا* *Paulownia* leaf	خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	احتمال معنی‌داری P-value
ماده خشک Dry matter	234[b]	266[a]	4.82	<0.01
ماده آلی Organic matter	936[a]	911[b]	5.27	0.02
پروتئین خام Crude protein	81.4[b]	173[a]	7.27	<0.01
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	502[a]	402[b]	6.74	<0.01
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	325[a]	201[b]	7.08	<0.01
لیگنین Lignin	63.4[b]	86.4[a]	2.85	<0.01
عصاره اتری Ether extract	33.5	35.5	1.64	0.41
کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی Non-fiber carbohydrates	319	301	6.65	0.11
کربوهیدرات‌های محلول در آب Water soluble carbohydrates	101	91.2	3.65	0.11

حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

Different letters in each row indicate significant difference between groups (P<0.05).

مطابق با این نتایج، در مطالعه‌ای محتوای پروتئین خام برگ تازه گونه *پالونیا* الونگاتا ۱۷۲ گرم در کیلوگرم ماده خشک گزارش شد (Stewart *et al.*, 2018). در پژوهش دیگری، محتوای پروتئین خام برگ خشک *پالونیا* ۱۷۴ گرم در کیلوگرم ماده خشک بود (Al-Sagheer *et al.*, 2019). در کل، محتوای پروتئین خام برگ *پالونیا* در دامنه ۱۱۳ تا ۲۷۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک گزارش شده است (Descals *et al.*, 2013). وجود اختلافات در نتایج محققان، ممکن است به‌دلیل عواملی مانند رقم گیاه، زمان کاشت و برداشت، شرایط جغرافیایی محل کشت، نوع و میزان کاربرد کودهای شیمیایی و مدیریت تهیه سیلاژ باشد (Kaiser *et al.*, 2004). محتوای NDF و ADF در برگ تازه و سیلاژ *پالونیا* به‌طور قابل توجهی کمتر از ذرت علوفه‌ای بود که نشان‌دهنده پتانسیل مطلوب *پالونیا* به‌عنوان یک منبع علوفه‌ای است، زیرا مشخص شده است که مقدار NDF گیاه با مصرف خوراک رابطه معکوس دارد (McDonald *et al.*, 2011). لذا، عدم اثر منفی فیبر برگ *پالونیا* بر مصرف خوراک در نشخوارکنندگان قابل انتظار است.

محتوای NDF سیلاژ برگ *پالونیا* در مطالعه حاضر بیشتر از مقادیر گزارش شده توسط هوانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2022) بود (۳۵۹ گرم در کیلوگرم ماده خشک)، امّا مشابه با مقدار گزارش شده (۴۴۷ گرم در کیلوگرم ماده خشک) توسط استوارت و همکاران (Stewart *et al.*, 2018) بود. در پژوهش دیگری (Al-Sagheer *et al.*, 2019) میزان NDF برگ *پالونیا* ۴۰۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک گزارش شد که کمتر از نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر است. کاهش محتوای فیبری سیلاژها در مقایسه با علوفه تازه مطابق با نتایج سایر محققان است (Rezaei *et al.*, 2009) و دلیل آن را می‌توان به تجزیه سلولز و همی‌سلولز در اثر فعالیت میکروب‌ها حین تخمیر و نیز هیدرولیز آن‌ها در pH اسیدی سیلاژ نسبت داد (Rezaei *et al.*, 2009). محتوای لیگنین در برگ تازه و سیلاژ *پالونیا* بیشتر از ذرت علوفه‌ای بود که این ممکن است بر ارزش غذایی آن اثر منفی داشته باشد و لذا، در زمان استفاده از برگ یا سیلاژ *پالونیا* در جیره نشخوارکنندگان باید به غلظت کل جیره کامل مخلوط توجه نمود. همچنین، با افزایش نسبت برگ *پالونیا* در جیره، غلظت لیگنین به‌تدریج افزایش معنی‌داری یافت، هر چند اختلاف خیلی زیاد نبود.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی (گرم در کیلوگرم ماده خشک یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا*

Table 2- Chemical composition (g/kg DM or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and *Paulownia* leaf (PL)

صفت Parameter	نسبت های ذرت و پالونیا در سیلاژ(٪) Proportions of corn and *Paulownia* in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	فقط ذرت (Corn only FC) 100:0	75:25	50:50	25:75	فقط پالونیا (Paulownia only PL) 0:100		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
ماده خشک Dry matter	242[c]	252[bc]	260[ab]	267[a]	273[a]	4.30	<0.01	0.65
ماده آلی Organic matter	927[a]	920[ab]	915[bc]	907[bc]	902[c]	4.97	<0.01	0.97
پروتئین خام Crude protein	80.5[e]	102[d]	122[c]	144[b]	164[a]	3.56	<0.01	0.93
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	487[a]	465[b]	438[c]	415[d]	393[e]	4.24	<0.01	0.78
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	310[a]	278[b]	253[c]	223[d]	191[e]	3.94	<0.01	0.74
لیگنین Lignin	60.1[c]	63.9[bc]	66.3[bc]	70.3[ab]	74.5[a]	2.38	<0.01	0.77
عصاره اتری Ether extract	33.4[b]	35.1[ab]	35.9[ab]	37.2[ab]	38.8[a]	1.57	0.03	0.91
کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی Non-fiber carbohydrates	326	318	319	311	306	7.28	0.10	0.75
کربوهیدرات‌های محلول در آب Water soluble carbohydrates	22.9	23.5	24.4	25.3	25.4	1.19	0.11	0.81
pH	3.96	3.99	4.11	4.26	4.29	0.157	0.15	0.89
نیتروژن آمونیاکی Ammonia-N (g/kg total N)	51.3[b]	54.2[ab]	54.8[ab]	57.3[ab]	59.1[a]	1.59	0.02	0.46

حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

Different letters in each row indicate significant difference between groups (P<0.05).

تفاوت غلظت WSC در علوفه تازه هر دو گیاه از نظر آماری معنی‌دار نبود (۱۰۱ و ۹۱/۲ گرم در کیلوگرم ماده خشک). به نظر می‌رسد که غلظت WSC در هر دو علوفه برای ایجاد یک تخمیر پایدار و مطلوب حین سیلو کردن کافی بوده است، زیرا مشخص شده است که حداقل میزان WSC در علوفه که بتوان آن را سیلو نمود باید حدود ۳۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک باشد (Haigh and Parker, 1985). پس از سیلو کردن، میزان WSC به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که این قابل انتظار بود، زیرا قندهای محلول علوفه طی فرایند تخمیر بی‌هوازی توسط میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص باکتری‌های مولد اسید لاکتیک مصرف شده و تولید لاکتات جهت کاهش pH سیلاژ و پایدرای آن خواهند کرد (Nkosi and Mekuria, 2010). افزایش سهم برگ *پالونیا* در سیلاژهای مخلوط تأثیری بر غلظت WSC نداشت. محتوای خاکستر خام برگ تازه (۸۹ گرم در کیلوگرم ماده خشک) و سیلاژ *پالونیا* (۹۸ گرم در کیلوگرم ماده خشک) بیشتر از علوفه تازه و سیلاژ ذرت بود. بالا بودن غلظت خاکستر خام برگ *پالونیا* در مطالعه دیگری (به‌ترتیب ۱۱۴ و ۱۲۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک در برگ خشک و سیلاژ *پالونیا*) نیز گزارش شده است (Huang *et al.*, 2022).

افزایش محتوای ماده خشک، پروتئین خام، لیگنین و عصاره اتری با افزایش سهم برگ *پالونیا* نسبت به ذرت در سیلاژهای مخلوط، احتمالاً به‌دلیل غلظت بیشتر ترکیبات مذکور در برگ *پالونیا* بوده است. کاهش محتوای فیبری سیلاژ با افزایش نسبت برگ *پالونیا* احتمالاً

به‌دلیل محتوای NDF و ADF کمتر برگ *پالونیا* باشد. میزان pH سیلاژهای آزمایشی در دامنه مناسب ۴/۲-۳/۸ برای یک تخمیر مطلوب قرار داشت (Faithfull, 2000) و تحت تأثیر نسبت ذرت و برگ *پالونیا* قرار نگرفت، هر چند انتظار این بود که سیلاژهای حاوی برگ *پالونیا* به‌دلیل افزایش میزان پروتئین خام، در برابر افت pH سیلو، مقاومت از خود نشان دهند. با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به ذرت علوفه‌ای، غلظت نیتروژن آمونیاکی سیلاژ افزایش یافت که این احتمالاً به‌خاطر محتوای پروتئین خام برگ *پالونیا* بوده که حین عمل تخمیر تبدیل به آمونیاک شده است.

تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری برون‌تنی

همان‌طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است، با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ، تولید گاز در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ و نیز پتانسیل تولید گاز (ضریب b) به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). هر چند، حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۱۶، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعته (کل گاز تولیدی) و نرخ تولید گاز (ضریب c) تحت تأثیر قرار نگرفت (P>۰/۰۵). تفاوت در میزان گاز تولیدی در زمان‌های انکوباسیون مربوطه احتمالاً به‌دلیل اختلاف در غلظت پروتئین خام، NDF و لیگنین سیلاژهای آزمایشی بوده است، زیرا یک رابطه معکوس بین ترکیباتی مانند پروتئین خام، NDF و مخصوصاً لیگنین با تولید گاز وجود دارد (VanSoest, 1994). دلیل دیگر کاهش تولید گاز با افزایش نسبت برگ *پالونیا* در سیلاژ را می‌توان با کمتر بودن میزان ماده آلی توجیه کرد.

نتایج مربوط فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری در جدول ۴ ارائه شده است. با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ غلظت نیتروژن آمونیاکی و سنتز پروتئین میکروبی به‌طور خطی افزایش نشان داد (P<۰/۰۵)، هر چند، غلظت اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر به‌طور خطی کاهش یافت. میزان pH، انرژی قابل متابولیسم و گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک تحت تأثیر سیلاژهای آزمایشی قرار نگرفت. امّا با افزایش سهم برگ *پالونیا* در سیلاژ، گوارش‌پذیری ماده آلی تمایل به کاهش خطی پیدا کرد (P=۰/۰۸).

جدول ۳- فراسنجه‌های تولید گاز آزمایشگاهی (میلی‌لیتر به‌ازای ۲۵۰ میلی‌گرم سوبسترا یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا*

Table 3- *In vitro* gas production parameters (ml/250 mg substrate or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and *Paulownia* leaf (PL)

صفت Parameter	نسبت های ذرت و پالونیا در سیلاژ(٪) Proportions of corn and *Paulownia* in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
تولید گاز ۱۶ ساعته Gas production at 16 h	31.2	32.3	32.6	34.2	34.5	2.05	0.21	0.95
تولید گاز ۲۴ ساعته Gas production at 24 h	52.3[a]	48.1[ab]	45.8[b]	43.4[bc]	40.5[c]	1.60	<0.01	0.68
تولید گاز ۳۶ ساعته Gas production at 36 h	59.8[a]	57.5[ab]	56.3[ab]	52.6[bc]	49.5[c]	1.98	<0.01	0.58
تولید گاز ۴۸ ساعته Gas production at 48 h	64.2[a]	63.1[ab]	61.1[ab]	58.1[ab]	55.8[b]	2.70	0.02	0.83
تولید گاز ۷۲ ساعته Gas production at 72 h	64.9	63.8	61.6	60.8	58.8	2.21	0.09	0.87
تولید گاز ۹۶ ساعته Gas production at 96 h	65.1	64.5	62.3	62.2	60.3	2.50	0.16	0.76
کل گاز تولیدی ۱۲۰ ساعته Total gas production (120 h)	66.7	65.5	63.3	61.1	60.9	2.58	0.18	0.87
پتانسیل تولید گاز (b) Gas production potential	72.1[a]	68.3[a]b	67.5[ab]	65.8[ab]	63.5[b]	2.11	0.02	0.87
نرخ تولید گاز (c) Rate of gas production (c; %/h)	0.033	0.032	0.031	0.030	0.030	0.002	0.22	0.55

حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

Different letters in each row indicate significant difference between groups (P<0.05).

دلیل کاهش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر احتمالاً محتوای NDF کمتر و لیگنین بیشتر برگ *پالونیا* بوده است. یکی دیگر از دلایل این امر می‌تواند این باشد که احتمالاً تخمیر و مواد آلی بیشتر سبب تولید پروتئین میکروبی شده‌اند، زیرا برگ پالونیا دارای محتوای قابل ملاحظه‌ای ترکیبات فنولی (۶۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک) بوده (Huang *et al.*, 2022) که در مطالعاتی نشان داده شده است که ترکیبات مذکور با تعدیل کردن تجزیه پروتئین در شکمبه سبب تولید بهینه پروتئین میکروبی می‌شوند (Makkar *et al.*, 1995). دلیل اینکه گوارش‌پذیری ماده خشک برخلاف گوارش‌پذیری ماده آلی که با افزایش کاربرد برگ *پالونیا* به‌جای ذرت علوفه‌ای تمایل به کاهش نشان داد، تفاوتی بین سیلاژها نداشت، احتمالاً به‌خاطر میزان خاکستر بالاتر برگ *پالونیا* بوده که معمولاً گوارش‌پذیری بالایی دارد و از این طریق، از افت بیش از حد گوارش‌پذیری ماده خشک جلوگیری نموده است. با انکوباسیون همه سیلاژهای آزمایشی، غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون بیشتر از حداقل مقدار مورد نیاز آن (پنج میلی‌گرم در دسی‌لیتر) جهت رشد بهینه میکروبی بود (Satter and Slytor, 1974). دلیل افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ، احتمالاً به‌دلیل غلظت پروتئین خام بیشتر برگ *پالونیا* بوده است و در حقیقت، پروتئین بیشتری در فرایند تجزیه و آمین‌زدایی وارد شده است. افزایش پروتئولیز شکمبه (جدول ۵) نیز می‌تواند توجیه‌کننده این نتایج باشد. ویژگی‌های پروتئین دو نمونه علفی و مقاومت آن‌ها در برابر پروتئولیز هم ممکن است در این زمینه اثر داشته باشد. برگ *پالونیا* دارای مقادیر قابل توجهی ترکیبات فنولی است که ممکن است با کند کردن روند تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه، از طریق تبدیل آمونیاک به پروتئین میکروبی سبب کاهش غلظت آن در مایع شکمبه شود، امّا در مطالعه حاضر به‌دلیل زیاد بودن محتوای پروتئین خام با افزایش نسبت برگ *پالونیا* در سیلاژ، احتمالاً تجزیه زیاد پروتئین توسط ریزجانداران پروتئولتیک شکمبه مانع از دیده شدن اثرات مثبت ترکیبات فنولی شده است. انرژی قابل متابولیسم سیلاژهای آزمایشی تحت تأثیر سطح *پالونیا* قرار نگرفت. انرژی قابل متابولیسم به‌دست آمده در این مطالعه کمتر از نتایج به‌دست آمده (۱۰/۸ مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) توسط قزلکام و همکاران (Özelçam *et al.*, 2012) بود.

جدول ٤- فراسنجه‌های تخمیر و گوارش‌پذیری آزمایشگاهی مواد مغذی سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا*

Table 4- Fermentation parameters and *in vitro* nutrient digestibility of silages containing different proportion of forage corn (FC) and *Paulownia* leaf (PL)

صفت Parameter	نسبت های ذرت و پالنیا در سیلاژ(٪) Proportions of corn and *Paulownia* in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (mmol/g DM) Short chain fatty acids	4.64[a]	4.26[ab]	4.05[b]	3.83[bc]	3.58[c]	0.142	<0.01	0.68
گوارش‌پذیری ماده خشک (٪) Dry matter digestibility	58.4	59.4	59.8	60.8	61.4	1.87	0.24	0.97
گوارش‌پذیری ماده آلی (٪) Organic matter digestibility	60.4	58.9	58.4	58.2	57.4	1.14	0.08	0.70
انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM) MJ/kg)Metabolisable energy (DM	8.52	8.30	8.21	8.32	8.31	0.171	0.41	0.56
pH	6.59	6.66	6.63	6.66	6.70	0.043	0.13	0.87
نیتروژن آمونیاکی (mg/dl) Ammonia-N	11.9[c]	12.8[c]	14.3[b]	16.1[a]	16.3[a]	0.383	<0.01	0.55
پروتئین میکروبی (mg/g DM) Microbial protein	146[e]	165[d]	182[c]	202[b]	223[a]	4.35	<0.01	0.71

حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

Different letters in each row indicate significant difference between groups (P<0.05).

جدول ۵- فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه (واحد در ساعت در میلی‌لیتر یا واحد ذکر شده) سیلاژهای حاوی نسبت‌های مختلف ذرت علوفه‌ای و برگ *پالونیا*

Table 5- Rumen activity of hydrolytic enzymes (U/h/ml or as stated) of silages containing different proportion of forage corn (FC) and *Paulownia* leaf (PL)

صفت Parameter	نسبت های ذرت و پالونیا در سیلاژ(٪) Proportions of corn and *Paulownia* in the silage (% of DM)					خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	Contrast	
	Control (only FC)	75:25	50:50	25:75	100 (only PL)		خطی Linear	غیر خطی Quadratic
کربوکسی متیل سلولاز Carboxymethyl cellulase	16.2[a]	14.8[ab]	14.6[ab]	15.3[ab]	13.8[b]	0.586	0.03	0.72
میکروکریستالین سلواز Microcrystalline cellulase	10.9[a]	10.4[ab]	10.4[ab]	10.3[ab]	10.6[b]	0.492	0.50	0.39
فعالیت تجزیه کاغذ صافی Filter paper degrading	28.9	25.9	24.9	24.1	22.8	1.49	<0.01	0.55
آلفا امیلاز α-amylase	31.1[b]	32.8[b]	33.3[b]	37.1[ab]	42.1[a]	2.54	0.01	0.61
پروتئاز (میکروگرم پروتئین هیدرولیز شده در ساعت) Protease	70.6[b]	73.9[ab]	76.6[ab]	79.4[ab]	84.1[a]	3.25	0.01	0.84

حروف غیر مشترک در هر ردیف تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

Different letters in each row indicate significant difference between groups (P<0.05).

فعالیت آنزیمی شکمبه

در جدول ۵، نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی محیط کشت با انکوباسیون سیلاژهای آزمایشی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون گزارش شده است. فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی با افزایش نسبت برگ *پالونیا* به ذرت علوفه‌ای در سیلاژ به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، هر چند، فعالیت آلفا آمیلاز و پروتئازی شکمبه افزایش خطی نشان داد (P<۰/۰۵). فعالیت میکروکریستالین سلولاز تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). فعالیت کمپلکس‌های آنزیمی شکمبه به‌طور غیر مستقیم نشان‌دهنده جمعیت میکروب‌های دخیل در تخمیر و تجزیه مواد خوراکی است (Raghuvansi *et al.*, 2007).

با افزایش نسبت برگ *پالونیا* در سیلاژ، محتوای NDF و ADF سیلاژها به‌طور خطی کاهش یافت، که این کاهش سوبسترا می‌تواند دلیلی برای کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های شاخص تجزیه‌کننده فیبر شامل کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی باشد. افزایش میزان لیگنین سیلاژهای حاوی *پالونیا* نیز ممکن است دلیل دیگری برای این منظور باشد، زیرا رابطه معکوسی بین سطح لیگنین و تخمیرپذیری و هضم علوفه‌ها گزارش شده است (VanSoest, 1994). نتایج مربوط به گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده آلی (جدول ۴) تأییدکننده این نتایج است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز محیط کشت با افزایش سطح برگ *پالونیا* در سیلاژ احتمالاً به‌دلیل فراهمی بیشتر سوبستراهای پروتئین خام بوده است (جدول ۲).

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر نشان داد که برگ *پالونیا* رقم اصلاح شده طب جو دارای ارزش غذایی مطلوبی به‌عنوان یک منبع علوفه‌ای جدید در تغذیه دام است. همچنین، تهیه سیلاژهای آزمایشی با مخلوط کردن سطوح مختلف برگ *پالونیا* و ذرت علوفه‌ای امکان‌پذیر است و سبب افزایش محتوای پروتئین خام سیلاژ شده، که در شرایط کمبود منابع خوراکی پروتئینی، کاربرد آن در تغذیه دام قابل توصیه است. به هر حال، با توجه به افزایش سطح زیر کشت درخت *پالونیا* در کشور و نیز میزان برگ سبز تولیدی قابل توجه، طراحی دستگاهی جهت سهولت در برداشت برگ‌ها، امکان تولید سیلاژ در سطح تجاری را امکان‌پذیر می‌سازد. همچنین، انجام آزمایش‌های بیشتر به‌خصوص در دام زنده ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم شرکت دانش‌بنیان اصلاح نژاد گوسفند و بز گهر درود به‌خاطر حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات لازم جهت

انجام طرح تحقیقاتی حاضر نهایت تشکر و قدردانی را دارم. از همکار گرامی جناب آقای دکتر سعید حیدری، عضو هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه لرستان به‌سبب تأمین برگ *پالونیا* از مزرعه ایشان جهت انجام طرح تحقیقاتی حاضر کمال تشکر را دارم. از معاونت محترم پژوهشی و بخش ارتباط با صنعت دانشگاه لرستان به‌جهت هماهنگی‌ها و کمک شایان جهت انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Agarwal, N. (2000). Estimation of fiber degrading enzyme. In: L. C. Chaudhary, N. Agarwal, D. N. Kamra, and D. K. Agarwal, ed. Feed microbiology. *Izatnagar (India): CAS Animal Nutrition*, pp. 278–291.
2. Al-Sagheer, A. A., Abd El-Hack, M. A., Alagawany, M., Naiel, M. A., Mahgoub, S. A., Badr, M. M., Hussein, E. O. S., Alowaimer, A. N., & Swelum, A. A. (2019). *Paulownia* leaves as a new feed resource: Chemical composition and effects on growth, carcasses, digestibility, blood biochemistry, and intestinal bacterial populations of growing rabbits. *Animals*, 9, 95. https://doi.org/10.3390/ani9030095.
3. AOAC. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC International (17th ed., 1th rev.). Gaithersburg (MD): Association of Official Analytical Chemists.
4. Blümmel, M., Karsli, A., & Russell J. R. (2003). Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms *in vitro* and *in vivo*: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition*, *90*, 625–634. https://doi.org/10.1079/bjn2003934.
5. Blümmel, M., Steingss, H., & Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ^{15}N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, *77*, 911–921. https://doi.org/10.1079/BJN19970089
6. Bodnar, A., Pajor, F., Steier, J., Kispal, T., & Poti, P. (2014). Nutritive value of *Paulownia* (*Paulownia* spp.) hybrid tree leaves. *Hungarian Agricultural Research*, *23*, 27–32. https://doi.org/10.3390/ani9030095.
7. Broderick, G., & 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.
8. Descals, P., Seradj, A., Villorbina, G., & Balcells, J. (2013). Estudiodel valor nutritio de la hoja de *Paulownia* como recursoforrajero. AIDA, XV Jornadas sobre Producciyn Animal, TomoI, pp. 240-242 (E).
9. Faithfull, N. T. (2000). Methods in Agricultural Chemical Analysis; A Practical Handbook. Cab Int., Wallingford, UK.
10. García-Morote, F. A., L´opez-Serrano, F. R., Martínez-García, E., Andr´es-Abell´an, M., Dadi, T., Candel, D., Rubio, E., & Lucas-Borja, M. E. (2014). Stem biomass production of *Paulownia elongata* × *P. fortunei* under low irrigation in a semi-arid environment. *Forests*, *5*, 2505–2520. https://doi.org/10.3390/f5102505.
11. Getachew, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationshipbetween short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*, *139*, 341–352. https://doi.org/10.1017/S0021859602002393.
12. Haigh, P. M., & Parker, J. W. G. (1985). Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake and on live weight change of young cattle. *Grass and Forgae Science*, *40*(4), 429-436. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1985.tb01774.x.
13. Huang, H., Lechniak, D., Szumacher-Strabel, M., Patra, A. K., Kozłowska, M., Kolodziejski, P., Gao, M., Ślusarczyk, S., Petrič, D., & Cieslak, A. (2022). The effect of ensiled paulownia leaves in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, fatty acid composition, and milk production performance of dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13, 104. https://doi.org/10.1186/s40104-022-00745-9.
14. Huang, H., Szumacher-Strabel, M., Patra, A. K., ´Slusarczyk, S., Lechniak, D., Vazirigohar, M., Varadyova, Z., Kozłowska, M., & Cie´slak, A. (2021). Chemical and phytochemical composition, *in vitro* ruminal fermentation, methane production, and nutrient degradability of fresh and ensiled *Paulownia* hybrid leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 279, 115038. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115038.
15. Icka, P., Damo, R., & Icka, E. (2016). *Paulownia tomentosa*, a fast growing timber. *Annals of "Valahia" University of Târgovişte. Agriculture,10*, 14-9. https://doi.org/10.1515/agr-2016-0003.
16. Kaiser, A. G., Piltz, J. W., Burn, H. M., & Grinffiths, N. W. (2004). Successful Silage, 2nd ed. Dairy Australia and NSW Dept. of Primary Industries, New South Wales, Australia.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 262–275. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
18. MAFF. (1982). The Analysis of Agricultural Materials, 2nd ed. Ministry of Agriculture Fisheries and FOOD, London, UK.
19. Makkar, H. P. S., Blümmel, M., & Becker, K. (1995). *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of Science of Food and Agriculture*, *69*, 481–

493.https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690413.
20. Marten, G. C., & Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages within vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: W. J. Pidgen, C. C. Balch, and M. Graham Ed. Standardization of analytical methodology for feeds. International Development Research Center, Ottawa, pp. 61-71.
21. McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). Animal Nutrition. 5th ed. Prentice Hall, Essex, UK.
22. Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, *28*, 7–55.
23. Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds using refluxing in beakers or crucibles; collaborative study. *Journal AOAC International*, *85*, 1217-1240.
24. Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, *31*, 426–429. https://doi.org/10.1021/ac60147a030.
25. Nkosi, M. T., & Mekuria, F. (2010). Cloud computing for enhanced mobile health applications. Cloud Computing Technology and Science, 2010 IEEE Second International Conference on 2010. https://doi.org/10.1109/CloudCom.2010.31.
26. Norton, B. W. (1998). The nutritive value of tree legumes. In: R. C. Gutteridge & H. M. Sheton ed. Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. Tropical grfor aland Society Aus. Inc., St Lucia. Queensland, Australia, pp. 15-48.
27. NRC. (2007). National Research Council, Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington (DC, USA): National Academy of Sciences.
28. Özelçam, H., İpçak, H. H., Özüretmen, S., & Canbolat, Ö. (2012). Feed value of dried and ensiled paulownia (*Paulownia* spp.) leaves and their relationship to rumen fermentation, *in vitro* digestibility, and gas production characteristics. *Revista Brasileiro de Zootecnia*, *50*, e20210057. https://doi.org/10.37496/rbz5020210057.
29. Raghuvansi, S. K. S., Prasad, R., Tripathi, M. K. & Mishra, A. S. (2007). Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilization, and rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal*, *1*, 221-226. https://doi.org/10.1017/S1751731107284058.
30. Rezaei, J., Rouzbehan, Y., & Fazaeli, H. (2009). Nutritive value of fresh and ensiled amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) treated with different levels of molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 151, 153-160. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.12.001.
31. SAS Institute Inc. (2005). User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
32. 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.
33. Stewart, M., Vaidya, B., Mahapatra, A., Terrill, T., & Joshee, N. (2018). Potential use of multipurpose *Paulownia elongata* tree asan animal feed resource. *American Journal of Plant Sciences*, *9*, 1212-1227. https://doi.org/10.4236/ajps.2018.96090.
34. VanSoest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*, 3583–3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
35. VanSoest, P. J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Cornell Universuty Press, Itacha, NY, USA, pp.476.
36. Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., & Schlink, A. C. (2010). *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritionalattributes in ruminants: Nuclear and related methodologies (2th ed.). Springer Verlag Gmbh.
37. Yadav, N. K., Vaidya, B. N., Henderson, K., Lee, J. F., Stewart, W. M., Dhekney, S. A., & Joshee, N. (2013). A review of *Paulownia* biotechnology: A short rotation, fast growing multipurpose bioenergy tree. *American Journal of Plant Science*, *4*, 2070. https://doi.org/10.4236/ajps.2013.411259.

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 171-186

Effects of Dietary Organic Chromium Supplementation on Laying Performance, Egg Quality, Immune and Blood Biochemical Parameters of Laying Hens in the Late Phase of Production

Mehrdad Karimi[1], Majid Olyayee[2*], Hossein Jonmohammadi[3], Rohollah Kianfar[4], Fatemeh Khademnasi[5]

1, 2, 3, 4 and 5- M.Sc. Graduate, Associated Professor, Professor, Associated Professor and Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: majidolyayee@tabrizu.ac.ir

Received: 03-01-2023
Revised: 28-02-2023
Accepted: 01-03-2023
Available Online: 01-03-2023

How to cite this article:
Karimi, M., Olyayee, M., Jonmohammadi, H., Kianfar, R., & Khademnasi, F. (2023). Effects of dietary organic chromium supplementation on laying performance, egg quality, immune and blood biochemical parameters of laying hens in the late phase of production. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 171-186. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

Introduction: Although minerals include a small part of the total cost of poultry feed, they perform special functions in the body. Given that today's birds are primarily raised under stressful conditions (including high production demands, environmental stress, heat, and exposure to various other stress factors), their nutrient metabolism, including the absorption of minerals, has changed. This has led to decreased feed consumption, reduced mineral absorption, and consequently, increased excretion of minerals. Minerals that serve as cofactors for many enzymes are crucial; thus, to support proper functioning and enhance the immune system's response, higher amounts of these nutrients are required in diets. Chromium (Cr) is a critical micronutrient for humans and animals. It contributes to physiological and nutritional efficiency. Chromium increases glucose glycogenesis, promotes glucose transport, and increases protein synthesis. Chromium is important in protein digestion and reduction of lipid peroxidation and increased growth production. Chromium deficiency is associated with reduced growth rate, and glucose, and protein metabolism. Under environmental, nutritional, and hormonal stress, the benefits of chromium supplementation clearly demonstrated. Considering that with the increase in age and egg size, the egg quality decreases, and also the function of the immune system decreases at the late phase of egg production. Therefore, supplementation of layer hen diets with some nutrients at the end of the production period can improve the egg quality and potentiate the humoral immune response. Thus, the subject of the current study was to investigate the effects of dietary supplementation of chromium-methionine on egg laying performance, egg quality traits at different storage times and temperatures, humoral immune response, and some blood biochemical parameters of laying hens at late–phase of the egg production cycle.

Materials and Methods: A total of 120 Leghorn laying hens (Hy-line W36, 73 weeks- old) were assigned in a completely randomized design with 6 dietary treatments, 5 replicates and 4 laying hens in each replicate for 6 weeks. The experimental treatments were 6 levels of chromium-methionine supplementation (0, 400, 800, 1200, 1600, and 2000 µg/kg of diet) of corn-soybean meal-based diet. The hens were housed in a 60 × 60 × 40 cm cage. All hens were housed in an environmentally controlled house with temperature maintained at approximately 25ºC. The house had controlled ventilation and lighting (16L: 8D). All hens were supplied with feed and water ad libitum. The hen-day egg production, egg weight, egg mass, feed intake, and feed conversion ratio were recorded daily. The feed conversion ratio was expressed in kilograms of feed consumed per kilogram of the egg mass. The effects of organic chromium supplementation of laying hens on egg quality traits were evaluated every 2 weeks at 75, 77, and 79 weeks of age. The egg shape index was calculated by dividing egg length to egg width. At the end of the experiment, to measure certain blood parameters, one bird from each replicate was selected, and blood was drawn from the wing vein. After preparing the serum, the concentrations of triglycerides, cholesterol, total protein, albumin, globulin, uric acid, alanine transaminase, aspartate

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

transaminase, glucose, and malondialdehyde were measured using Pars Azmoon kits according to the manufacturer's instructions.

Results and Discussion: Supplementing the diet with chromium-methionine had a significant effect on laying performance (including feed intake, feed conversion ratio, and egg production) and egg quality traits (such as eggshell weight, yolk color, yolk weight, albumen height, and Haugh unit). The results showed that birds fed 2000 µg/kg chromium-methionine had the lowest feed intake and the best feed conversion ratio and egg production percentage were observed with the addition of 1600 and 2000 g/kg organic chromium. By suppressing stress factors, chromium can increase the ovulation rate and increase the percentage of egg production. Addition of organic chromium except 2000 µg/kg improved albumen height and Haugh unit compared to the control group. The interaction effect between egg storage time and storage temperature on the yolk height and yolk percentage, albumen and yolk pH were significant. Carotenoids are responsible for the color of the yolk and they are a part of the fat-soluble compounds, so any factor that can improve the digestion and absorption of fats will probably lead to an increase in the color of the egg yolk. Haugh unit is a measure to determine the quality of egg white, which determines the quality of the egg. The higher HU means better egg quality (fresher, higher quality eggs have thicker whites). Blood serum cholesterol of chickens fed with 800 µg/kg of chromium-methionine decreased compared to the control group. The lowest serum concentration of malondialdehyde was observed using 1600 and 2000 µg/kg organic chromium. Addition of 1600 µg/kg of chromium-methionine increased total immunoglobulin production against sheep red blood cells. The effects of dietary chromium supplementation on improving immune responses can be attributed to its antioxidant activity. By enhancing antioxidant activity, chromium reduces the production of corticosterone, a potent suppressor of immune system function. This reduction in corticosterone levels prevents the decrease in lymphocyte production and proliferation, ultimately supporting the continued production of antibodies.

Conclusion: In total, dietary supplementation of 1600 µg/kg chromium-methionine can improve egg laying performance including feed conversion ratio, egg production, and egg mass, as well as egg quality traits such as egg shell weight and albumen height of laying hens at the late-phase of laying cycle. Supplementation of layer diets with 1600 µg/kg organic chromium improved the humoral immune response at the late-phase of egg production cycle by increasing the production of total immunoglobulin against sheep red blood cells.

Keywords: Humoral immunity, Egg quality, Chromium-methionine, Blood parameters, Laying hens

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۸۶-۱۷۱

اثرات مکمل جیره‌ای کروم آلی بر عملکرد تولید، کیفیت تخم‌مرغ، فراسنجه‌های ایمنی و بیوشیمیایی خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید

مهرداد کریمی[۱]، مجید علیایی[۲*]، حسین جان‌محمدی[۳]، روح الله کیانفر[۴]، فاطمه خادم‌ناسی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۱

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کروم آلی بر عملکرد تولید تخم‌مرغ، کیفیت تخم‌مرغ در زمان و دمای مختلف نگهداری و عملکرد سیستم ایمنی و بیوشیمیایی خون با استفاده از ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار نژاد لگهورن سویه‌های لاین W36 در سن ۷۳ هفتگی در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه پرنده در هر تکرار طراحی شد. جیره‌های آزمایشی عبارت بودند از: ۱- شاهد (بدون افزودن کروم آلی)، ۲ الی ۶- جیره شاهد به‌همراه افزودن سطوح ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره (µg/kg). نتایج نشان داد که مرغ‌های دریافت‌کننده ۲۰۰۰ µg/kg کروم- متیونین، کمترین مصرف خوراک را داشتند و بهترین ضریب تبدیل خوراک و درصد تولید تخم‌مرغ با افزودن ۱۶۰۰ g/kg و ۲۰۰۰ کروم آلی مشاهده شد. افزودن کروم آلی به‌جز ۲۰۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم ارتفاع سفیده و واحد هاو را در مقایسه با گروه کنترل بهبود داد. اثر متقابل بین مدت زمان و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر ارتفاع و درصد زرده، pH سفیده و زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود. کلسترول سرم خون مرغ‌های تغذیه شده با ۸۰۰ µg/kg کروم- متیونین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. کمترین غلظت سرمی مالون دی‌آلدهید با استفاده از ۱۶۰۰ µg/kg و ۲۰۰۰ کروم آلی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. افزودن µg/kg ۱۶۰۰ کروم- متیونین موجب افزایش تولید ایمونوگلوبولین کل بر علیه گلبول قرمز گوسفند شد. در مجموع، افزودن ۱۶۰۰ µg/kg کروم- متیونین می‌تواند اثرات سودمندی بر مرغ‌های تخم‌گذار مسن با بهبود عملکرد تولید، عملکرد سیستم ایمنی هومورال و کاهش غلظت مالون دی آلدهید سرم داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ایمنی هومورال، فراسنجه‌های خونی، کروم - متیونین، کیفیت تخم‌مرغ، مرغ تخم‌گذار

مقدمه

اگر چه مواد معدنی تنها بخش کوچکی از هزینه‌های خوراک طیور را تشکیل می‌دهند، امّا وظایف ویژه‌ای را در بدن ایفا می‌کنند، به‌عنوان مثال، این مواد در وظایف ساختمانی، به‌عنوان کوفاکتور در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی، در متابولیسم پروتئین، چربی و کربوهیدرات و سایر فرایندهای بیولوژیکی نقش ایفا می‌کنند. با توجه به اینکه پرندگان امروزی عمدتاً تحت شرایط تنش‌زا (مانند سرعت تولید زیاد، تراکم پرورش، محیط پرورش، دمای پرورش و تنش‌های تغذیه‌ای، فیزیولوژیکی و محیطی) پرورش می‌یابند، متابولیسم مواد مغذی در آن‌ها تغییر می‌کند و با کاهش مصرف خوراک، جذب مواد معدنی نیز کاهش می‌یابد. این باعث افزایش دفع مواد معدنی می‌شود که به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیمی برای بسیاری از فرایندهای زیستی ضروری هستند. بنابراین، برای حمایت از عملکرد مناسب و بهبود عملکرد سیستم ایمنی، نیاز به مصرف مقادیر بیشتری از این مواد مغذی در جیره‌های غذایی طیور وجود دارد. کروم یکی از عناصر کم مصرف و ضروری برای انسان و حیوانات است (Nattapon *et al.*, 2012) که اولین بار توسط شوارتز و مرتز در سال ۱۹۵۹ به‌عنوان یک عنصر ضروری در موش تشخیص داده شد و ضرورت آن در انسان در سال ۱۹۷۷ میلادی مشخص شد (Jeejeebhoy *et al.*, 1977). از دهه ۱۹۹۰ میلادی به بعد، کروم به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان یک عنصر ضروری در حیوانات اهلی (مانند گاو، گوسفند، اسب، خوک و طیور) مورد مطالعه قرار گرفته است (Pechova and Pavlata,

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشیار و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: majidolyayee@tabrizu.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80958.1127

2007).

کروم وظایف مهمی در بدن دارد. کروم در بدن توسط ترکیب اولیگوپپتیدی زیست فعال به‌نام کرومودیولین[1] یا ماده متصل به کروم با وزن مولکولی کم[2] انتقال می‌یابد. این پروتئین به گیرنده انسولین متصل می‌شود و منجر به افزایش جذب گلوکز به داخل سلول می شود. همچنین، کروم بخشی از پروتئین عامل تحمل گلوکز[3] (GTF) است که می‌تواند عملکرد انسولین را تقویت کرده و گلوکز را از خون به داخل سلول‌ها به‌منظور تولید انرژی منتقل کند. کروم همچنین در سوخت و ساز کربوهیدرات، پروتئین و چربی‌ها بسیار اهمیت دارد. در صورت کمبود کروم در جیره غذایی، توانایی انسولین در سوخت و ساز مواد مغذی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Pechova and Pavlata, 2007). کروم نرخ گلیکوژنز را افزایش می‌دهد، انتقال گلوکز را تسریع می‌کند و سبب افزایش سنتز پروتئین می‌شود (Hayirli, 2005). استفاده از مکمل کروم در جیره غذایی طیور، عملکرد تولید را بهبود می‌بخشد (Habibian *et al*., 2013). تحت تنش‌های محیطی، تغذیه‌ای و هورمونی، افزودن کروم به‌طور قابل مشاهده‌ای بهره‌وری را افزایش می‌دهد (Sahin *et al*., 2002). تحقیقات نشان داده است که اشکال مختلف شیمیایی کروم، از نظر قابلیت زیست فراهمی و تأثیر بر حیوانات مختلف، متفاوت هستند. همچنین ثابت شده است که منابع آلی کروم، نسبت به منابع معدنی، دارای زیست‌فراهمی بهتری هستند. کروم پیکولینات، کروم نیکوتینات، کروم پروپیونات (کروم متصل به مخمر) و کروم- متیونین، رایج‌ترین شکل‌های کروم هستند که به‌عنوان مکمل غذایی در جیره غذایی طیور استفاده می‌شوند (Valera *et al*., 2019).

در سال‌های اخیر، مطالعات بیشتری در مورد استفاده از کروم و اثرات مفید آن بر طیور انجام شده است. مکمل کروم می‌تواند در کمک به حداقل رساندن اثرات نامطلوب تنش محیطی بر عملکرد رشد و تولید مؤثر باشد (Nasiroleslami and Torki, 2011). به‌طور کلی، افزودن کروم به جیره غذایی می‌تواند تولید تخم‌مرغ، ضریب تبدیل خوراک و استحکام پوسته تخم مرغ را بهبود بخشد، به‌ویژه در پرندگانی که در شرایط تنش سرمایی یا گرمایی پرورش می‌یابند (Khan *et al*., 2014)؛ با این حال، در برخی موارد، نتایج مبهم درباره بهبود عملکرد و غلظت انسولین و گلوکز سرم (Habibian *et al*., 2013) هنگامی که پرندگان با مکمل کروم تحت شرایط تنش گرمایی تغذیه می‌شوند، گزارش شده است. همچنین، افزودن کروم به جیره غذایی طیور می‌تواند عملکرد سیستم ایمنی را از طریق افزایش وزن نسبی اندام‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند تیموس، طحال و بورس فابرسیوس بهبود بخشد و نسبت هتروفیل به لنفوسیت (H/L) را کاهش دهد. همچنین، گزارش شده است که با افزودن کروم به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، پاسخ آنتی‌بادی بهبود می‌یابد (Luo *et al*., 1999).

با توجه به اینکه با افزایش سن و بزرگ‌تر شدن اندازه تخم‌مرغ، کیفیت پوسته تخم‌مرغ کاهش می‌یابد و همچنین عملکرد سیستم ایمنی در اواخر دوره تولید مرغ تخم‌گذار کاهش می‌یابد؛ افزودن برخی از مواد مغذی به جیره غذایی پرندگان در اواخر دوره تولید می‌تواند کیفیت تخم‌مرغ را بهبود بخشد و وضعیت سیستم ایمنی هومورال را ارتقا دهد. بنابراین، هدف از اجرای این آزمایش، بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف کروم آلی بر عملکرد تولید تخم، صفات کیفیت تخم مرغ در زمان و دمای مختلف نگهداری، عملکرد سیستم ایمنی هومورال و برخی از فراسنجه‌های خونی مرغ‌های تخم‌گذار است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سالن تحقیقات مرغ تخم‌گذار ایستگاه آموزشی و پژوهشی خلعت پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز اجرا شد. در این آزمایش، تعداد ۱۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار نژاد لگهورن (سویه‌های- لاین W36) از سن ۷۱ هفتگی بعد از دو هفته دوره عادت‌پذیری (درصد تولید تخم‌مرغ در شروع دوره ۴/۹۶ ± ۶۰/۴۷ درصد)، از ۷۳ هفتگی به‌مدت شش هفته مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، پنج تکرار و چهار قطعه پرنده در هر تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل شش سطح مکمل کروم آلی (صفر، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم در هر کیلوگرم جیره غذایی) بودند. مکمل کروم آلی مورد استفاده در این تحقیق به‌شکل کروم- متیونین بود که از شرکت آمریکایی Zinpro Corp با نام تجاری MICROPLEX® تهیه گردید. این محصول حاوی ۱۰ درصد کروم و ۹۰ درصد متیونین (وزنی/وزنی) بود. بر اساس توصیه سویه‌های-لاین W-36، در کل دوره آزمایشی، ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی اعمال شد. دسترسی پرندگان به آب و خوراک به‌صورت آزادانه فراهم شد. جیره‌های آزمایشی به‌کمک نرم‌افزار UFFDA طبق توصیه‌های تغذیه‌ای سویه‌های- لاین W36 (۲۰۱۸) در سن ۷۳ هفتگی تنظیم شدند. ترکیب جیره های غذایی آزمایشی و اجزای تشکیل‌دهنده آن در جدول ۱ نشان داده شده است.

صفات عملکرد تولید

صفات عملکرد شامل درصد تولید تخم‌مرغ، وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ تولیدی، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک مورد بررسی قرار گرفت. تخم‌مرغ‌های تولیدی، روزانه و در یک ساعت مشخص

1- Chromodulin
2- Low-molecular-weight chromium-binding substance (LMWCr)
3- Glucose tolerance factor (GTF)

(ساعت پنج عصر) جمع‌آوری، توزین و تعداد آن‌ها ثبت شد و با استفاده از معادله ۱ درصد تولید تخم‌مرغ بر اساس روز مرغ (معادله ۲) تعیین شد. برای اندازه‌گیری وزن تخم‌مرغ، ابتدا تخم‌مرغ‌های هر یک از واحدهای آزمایشی به‌صورت انفرادی توزین و برای محاسبه میانگین وزن تخم‌مرغ، در هر روز تمام تخم‌مرغ‌های تولید شده مربوط به هر واحد آزمایشی توزین شد و سپس با تقسیم وزن به تعداد تخم‌مرغ‌ها، میانگین وزن تخم‌مرغ هر واحد آزمایشی به‌صورت هفتگی محاسبه شد. از حاصل‌ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ تولیدی در درصد تولید، توده تخم‌مرغ تولیدی به‌ازای هر مرغ در روز محاسبه گردید. مصرف خوراک هر واحد آزمایشی، از تفاضل مقدار دان توزیع شده از مقدار دان باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. ضریب تبدیل خوراک برای تولید تخم‌مرغ در هر هفته با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد.

معادله (۱)

$$\text{درصد تولید بر اساس روز مرغ} = \frac{\text{تعداد کل تخم‌مرغ تولیدی واحد آزمایش}}{\text{روز مرغ واحد آزمایش}} \times ۱۰۰$$

معادله (۲)

$$\text{روز مرغ} = (\text{تعداد روزهای آزمایش} \times \text{تعداد مرغ‌های زنده})$$

معادله (۳)

$$\text{ضریب تبدیل خوراک} = \frac{\text{خوراک مصرفی (گرم)}}{\text{توده تخم‌مرغ تولیدی (گرم)}}$$

صفات خارجی و داخلی کیفیت تخم‌مرغ

برای بررسی صفات کیفیت تخم‌مرغ، در پایان هر دو هفته، تعداد دو عدد تخم‌مرغ از هر تکرار (در مجموع، ۱۰ تخم‌مرغ برای هر تیمار) به‌صورت تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. طول و عرض تخم‌مرغ با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس با تقسیم کردن عرض تخم‌مرغ بر طول آن، شاخص شکل تخم‌مرغ به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری درصد پوسته تخم‌مرغ، پس از شکستن تخم‌ها، پوسته جدا و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون نگهداری شد و پس از بیرون آوردن از آون و خنک شدن، وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و به‌صورت درصدی از وزن تخم‌مرغ بیان شد. پس از توزین، پوسته از سه مقطع (پهن، باریک و قسمت میانی) جدا شد و ضخامت پوسته تخم‌مرغ، به‌وسیله دستگاه ریزسنج مخصوص (FHK، ژاپن) با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. میانگین سه عدد به‌دست آمده، به‌عنوان ضخامت پوسته آن تخم‌مرغ ثبت شد. برای تعیین خاکستر پوسته، ابتدا دو گرم پوسته خشک شده برداشته و در کوره تحت دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج ساعت قرار گرفت. سپس درصد خاکستر پوسته محاسبه شد. ارتفاع سفیده غلیظ تخم‌مرغ با استفاده از ریزسنج سه پایه اندازه‌گیری و واحد هاو با استفاده از معادله ۴ محاسبه شد (Torki *et al.*, 2014)

معادله (۴)

$$HU = 100 \log (AH - 1.7EW^{0.37} + 7.57)$$

که در آن، HU: واحد هاو، AH: ارتفاع سفیده برحسب میلی‌متر و EW: وزن تخم‌مرغ برحسب گرم می‌باشد.

برای محاسبه درصد زرده و سفیده، ابتدا زرده و سفیده جدا و توسط ترازوی الکترونیکی، توزین شدند و بر اساس درصدی از وزن تخم‌مرغ بیان شدند. صفت رنگ زرده با استفاده از مقیاس رنگ رش ارزیابی شد. شاخص زرده پس از اندازه‌گیری قطر و ارتفاع زرده تخم مرغ با استفاده از کولیس دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر) اندازه‌گیری و شاخص زرده از تقسیم قطر زرده به ارتفاع زرده ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. pH زرده و سفیده تخم‌مرغ با استفاده از pH متر HANA-210 (ساخت ایتالیا) با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. بدین منظور، پس از کالیبره کردن pH متر با استفاده از محلول‌های بافری استاندارد، دو گرم از سفیده و زرده برداشته و به درون بشر انتقال و با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌طور کامل مخلوط گردید. پس از یکنواخت شدن، الکترود pH متر را به درون محلول وارد کرده و پس از ثابت شدن عدد نمایشگر مقدار pH ثبت گردید. به‌منظور بررسی اثرات افزودن کروم آلی در جیره غذایی بر کیفیت تخم‌مرغ، در دما و زمان‌های مختلف نگهداری در پایان هر دو هفته آزمایش، تعداد چهار عدد تخم‌مرغ از هر تکرار اخذ و در دو زمان هفت و ۱۴ روزگی و در دو دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) و دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و صفات کیفیت تخم‌مرغ اندازه‌گیری شدند (Karami et al., 2018).

فراسنجه‌های سرم خون و سیستم ایمنی هومورال

در پایان دوره، به‌منظور اندازه‌گیری برخی از فراسنجه‌های سرم خون، از هر تکرار یک پرنده انتخاب و از ورید بال خون گرفته شد. سپس پس از آماده‌سازی سرم، میزان تری‌گلیسرید، کلسترول، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، اسید اوریک، آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز، گلوکز، مالون دی‌آلدهید با استفاده از کیت‌های پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل توصیه شده، اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال، از دو رأس گوسفند نر، ۲۰ میلی‌لیتر خون اخذ و در شیشه حاوی سیترات سدیم ریخته شد. سپس توسط سانتریفیوژ (با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه) گلبول‌های قرمز خون گوسفند (SRBC) از سرم و گلبول‌های سفید جدا و سه بار با بافر فسفات سالین (به‌صورت محلول ۱۰ درصد) شسته شدند. در نهایت، محلول پنج درصد گلبول قرمز گوسفند در بافر فسفات سالین تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن به ماهیچه سینه دو مرغ از هر تکرار تزریق شد. هفت روز پس از تزریق، از مرغ‌های تزریق

شده خون‌گیری به عمل آمد و سرم آن برای تعیین ایمونوگلوبولین کل و ایمونوگلوبولین G و M بر ضد SRBC به‌روش میکروهموگلوتیناسیون استفاده شد (Kuehn et al, 2006).

مدل آماری طرح آزمایشی

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار اجرا شد. مدل آماری طرح مورد استفاده به‌صورت زیر است:

معادله (۵) $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$

که در آن، Y_{ij}: مقدار هر مشاهده، μ: میانگین مشاهدات، t_i: اثر تیمار (i=1….6) و ij: اشتباه آزمایشی مربوط به مشاهده است. داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار آماری SAS، نسخه ۹/۱ (SAS., 2004) و با استفاده از رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت و برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از آزمون توکی- کرامر در سطح پنج درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت تخم‌مرغ در دما و زمان‌های مختلف نگهداری در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل ۳×۲×۶ با شش سطح کروم- متیونین افزودنی جیره غذایی، دو دمای مختلف نگهداری (دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و دمای یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد)) و سه زمان مختلف نگهداری (تازه، ۷ و ۱۴ روز نگهداری) انجام گرفت. مدل آماری این آزمایش به‌صورت زیر بود:

معادله (۶)

$$y_{ijkl} = \mu + A_j + B_k + C_l + (AB)_{jk} + (AC)_{jl} + (BC)_{kl} + (ABC)_{jkl} + \varepsilon_{ijkl}$$

که در آن، y_{ijkl} : i امین مشاهده از j امین سطح عامل A، k امین سطح عامل B و l امین سطح عامل C، A_j: اثر j امین سطح عامل A، سطوح مختلف کروم –متیونین جیره غذایی (i=1,…,6)، B_k: اثر k امین سطح عامل B ، دو دمای مختلف نگهداری (۲۵و ۴ درجه سانتی‌گراد) (k=1, 2)، C_l: اثر l امین سطح عامل C، سه زمان مختلف نگهداری (تازه، ۷ و ۱۴ روز نگهداری) (l=1,2,3)، $(AB)_{jk}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و k امین سطح عامل B، $(AC)_{jl}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و l امین سطح عامل C، $(BC)_{kl}$: اثر متقابل k امین سطح عامل B و l امین سطح عامل C، $(ABC)_{jkl}$: اثر متقابل j امین سطح عامل A و k امین سطح عامل B و l امین سطح عامل C و ε_{ijkl}: خطای آزمایشی می‌باشند.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی

Table 1- The ingredient and chemical composition of experimental diets

اجزا مواد خوراکی Feed Ingredient	درصد (%)	ترکیب شیمیایی Chemical composition	واحد Unit
ذرت زرد Yellow corn	58.45	انرژی قابل سوخت و ساز Metabolisable energy (kcal/kg)	2800
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین خام) Soybean meal (44% CP)	23.52	پروتئین خام Crude protein	15.5 (%)
صدف shell	11.52	کلسیم Calcium	4.75 (%)
روغن سویا Soybean oil	3.83	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	0.4 (%)
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate (DCP)	1.36	متیونین Methionine	0.44(%)
مکمل ویتامین و مواد معدنی[1] Vitamin and mineral premix[1]	0.5	متیونین+سیستئن Met+Cys	0.66(%)
نمک طعام Common salt	0.25	لیزین Lysine	0.8 (%)
بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.33	ترئونین Threonin	0.59 (%)
دی ال-متیونین DL-methionine	0.18	تریپتوفان Tryptophan	0.23 (%)
ال-لیزین L-lysine	0.06		

[1] در هر کیلوگرم خوراک ویتامین و مواد معدنی تأمین شده: ویتامین A، ۱۰۰۰۰ IU ؛ ویتامین D_3، ۲۵۰۰ IU ، ویتامین E، ۱۰ IU ، ویتامین K_3، ۱۰ میلی‌گرم، ویتامین B_1، ۲/۲ میلی‌گرم، ویتامین B_2، ۴ میلی‌گرم، ویتامین B_3، ۸ میلی‌گرم، ویتامین B_6، ۲ میلی‌گرم، ویتامین B_{12}، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم، اسید فولیک ۰/۵۶ میلی‌گرم، کولین کلراید، ۲۰۰ میلی‌گرم، منگنز، ۸۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۰ میلی‌گرم؛ روی، ۶۰ میلی‌گرم؛ مس، ۱۲ میلی‌گرم؛ ید، ۱ میلی‌گرم؛ و سلنیت سدیم، ۰/۳ میلی‌گرم.

[1] Vitamins and minerals provided per kg of diet: Vitamin A, 10000 IU; Vitamin D_3, 2500 IU, Vitamin E, 10 IU, Vitamin K_3, 10 mg, Vitamin B_1, 2.2 mg, Vitamin B_2, 4 mg, Vitamin B_3, 8 mg, Vitamin B_6, 2 mg, Vitamin B_{12}, 0.015 mg, folic acid 0.56 mg, choline chloride, 200 mg, manganese, 80 mg; iron, 50 mg; zinc, 60 mg; copper, 12 mg; iodine, 1 mg; and sodium selenite, 0.3 mg.

نتایج و بحث

صفات عملکرد تولید

نتایج اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات عملکردی مرغ‌های تخم‌گذار در جدول ۲ ارائه شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان مصرف خوراک روزانه معنی‌دار بود و با افزایش سطح کروم آلی در جیره غذایی مصرف خوراک به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). پرندگان دریافت‌کننده ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در هر کیلوگرم جیره غذایی کمترین میزان مصرف خوراک روزانه (۹۱/۵۴ گرم در روز) را داشتند. نتایج این پژوهش موافق و هماهنگ با نتایج یوانیک و همکاران (Uyanik *et al.*, 2002) بود که مشاهده کردند افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل کلرید کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار باعث کاهش مصرف خوراک شد. درحالی‌که ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2002) گزارش کردند که استفاده از مکمل کروم در مرغ‌های تخم‌گذار مصرف خوراک را افزایش داد. وجود نتایج متناقض می‌تواند تا حدودی به سطح و نوع منبع کروم مورد استفاده مربوط باشد. افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی ضریب تبدیل خوراک مرغ‌های تخم‌گذار را تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). ضریب تبدیل خوراک گروه‌های تغذیه شده با کروم- متیونین در مقابل گروه شاهد کاهش یافت، به‌طوری‌که ضریب تبدیل خوراک پرندگان دریافت‌کننده سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین کمتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۰۱). موافق با نتیجه تحقیق حاضر، ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2005) در بلدرچین‌های تخم‌گذار بهبود ضریب تبدیل خوراک را با استفاده از مکمل کروم مشاهده کردند؛ درحالی‌که ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2018) گزارش کردند که مکمل کروم بر ضریب تبدیل خوراک در مرغ‌های تخم‌گذار قهوه‌ای تأثیر معنی‌داری نداشت. در تناقض با یافته‌های این تحقیق، جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) در مرغ‌های تخم‌گذار گزارش کردند که سطوح کروم- متیونین جیره بر ضریب تبدیل خوراک اثر معنی‌دار ندارد. حبیبیان و همکاران (Habibian *et al.*, 2013) گزارش کردند که افزودن مقادیر ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم برکیلوگرم کروم از منابع کلرید کروم و کروم متیونین به جیره جوجه های گوشتی بر افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک تأثیر مثبتی نداشته است. این نتایج متفاوت می‌تواند ناشی از وضعیت کروم در حیوان، زیست‌فراهمی مکمل‌های کروم، وجود یا عدم وجود تنش، شدت تنش، میزان کروم افزوده شده، نوع پرنده، ترکیب جیره پایه و طول دوره استفاده از مکمل کروم باشد. دلیل بهبود ضریب تبدیل خوراک می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی کروم مربوط باشد. زیرا به‌خوبی مشخص شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها با احیای آهن سه ظرفیتی موجب بهبود جذب آهن می‌شوند، زیرا آهن دو ظرفیتی در روده جذب شده و به این ترتیب مقاومت در برابر عفونت‌ها بهتر می‌شود. آسیب‌های اکسیداتیو که منجر به تغییرات در شکل پروتئین‌ها می‌گردند، می‌توانند آنزیم‌های پانکراس را مهار و نیز مقاومت پروتئین غذایی در برابر هضم شدن را القا کنند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کروم می‌تواند تا حدودی با دناتوراسیون اکسیداتیو پروتئین تداخل داشته و هضم مواد غذایی و ضریب تبدیل خوراک را بهبود ببخشد.

با افزایش سطح کروم در جیره میزان تولید تخم‌مرغ نیز به‌صورت خطی افزایش یافت (P<۰/۰۰۰۱) و افزودن ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین درصد تولید تخم مرغ بیشتری نسبت به سایر تیمارها به جزء تیمار ۱۶۰۰ میکروگرم کروم –متیونین داشت (P<۰/۰۰۱). مطابق با نتیجه مطالعه حاضر، کیم و همکاران (Kim *et al.*, 1996) بیشترین میزان تولید تخم‌مرغ را در گروه‌هایی مشاهده کردند که بالاترین سطح کروم را دریافت کردند. کروم با سرکوب عوامل تنش‌زا قادر است نرخ تخمک‌اندازی را افزایش داده و درصد تولید تخم‌مرغ را افزایش دهد (Sahin *et al.*, 2002). افزودن کروم به جیره غذایی در کل دوره تأثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ تولیدی نداشت (P>۰/۰۵). هماهنگ با این نتایج، یوانیک و همکاران (Uyanik *et al.*, 2002) نشان دادند که افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل کلرید کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر وزن تخم‌مرغ ندارد. احتمالاً بهبود اندک اندازه تخم‌مرغ در گروه‌های دارای مکمل کروم، ناشی از افزایش احتمالی قابلیت هضم پروتئین و چربی جیره غذایی می‌باشد. اثر کروم بر سوخت و ساز پروتئین‌ها از طریق تأثیر بر فعالیت انسولین صورت می‌گیرد (Pechova and Pavlata, 2007). توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه با افزودن مکمل کروم متیونین به جیره، به‌صورت خطی افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۰۰۱)، به‌طوری‌که تیمارهای حاوی سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه بیشتری را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. مقدار توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه از حاصل‌ضرب میانگین وزن تخم‌مرغ در درصد تولید محاسبه می‌گردد، از آنجایی که تیمارهای حاوی سطوح ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم- متیونین بیشترین درصد تولید تخم‌مرغ را داشتند، بدین ترتیب بیشترین توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه نیز مربوط به این تیمارها بود.

صفات کیفیت تخم‌مرغ

نتایج اثرات افزودن مکمل کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم مرغ‌های تخم‌گذار برای کل دوره (هفته ۷۳ تا ۷۹) در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزودن کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ (شاخص شکل تخم‌مرغ، درصد پوسته و ضخامت پوسته) به غیر از وزن پوسته تخم‌مرغ معنی‌دار نبود

(P>۰/۰۵). با افزودن کروم وزن پوسته به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که وزن پوسته بیشتری در تیمارهای حاوی ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم در مقایسه با شاهد مشاهده شد. در مورد صفات مرتبط با کیفیت خارجی تخم‌مرغ، اثر مدت زمان نگهداری (روز) بر وزن پوسته تخم‌مرغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که با افزایش مدت زمان نگهداری (۷ و ۱۴ روز) وزن پوسته افزایش یافت. دمای نگهداری تخم‌مرغ بر هیچ یک از صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ تأثیر معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). اثر متقابل کروم-متیونین با دما و مدت زمان نگهداری در صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ تأثیر معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). ترکی و همکاران (Torki *et al.*, 2014) گزارش کردند که استفاده از ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم کروم در شرایط تنش گرمایی باعث افزایش وزن پوسته تخم‌مرغ می‌شود. موافق با این نتایج، یویانیک و همکاران (Uyanik *et al.*, 2002) گزارش کردند که افزودن ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کلرید کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار تأثیر معنی‌داری بر ضخامت پوسته تخم‌مرغ ندارد. همچنین لین و همکاران (Lien *et al.*, 1996) نیز نشان دادند که افزودن پیکولینات کروم به جیره مرغ‌های تخم‌گذار ضخامت پوسته را تحت تأثیر قرار نداد. ساهین و همکاران (Sahin et *al.*, 2005) نیز در مطالعه خود در بلدرچین‌های تخم‌گذار کاهش خطی شاخص شکل تخم‌مرغ را گزارش کردند. مایسا (Maysa, 2011) نیز نشان داد که افزودن مکمل کروم به جیره مرغ‌های تخم-گذار تأثیر معنی‌داری بر شاخص شکل تخم‌مرغ نداشت. همچنین کرمی و همکاران (Karami *et al.*, 2018) نیز گزارش نمودند افزودن کروم تأثیر معنی‌داری بر شاخص شکل تخم‌مرغ نداشت.

جدول ۲- اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات عملکرد تولید مرغ‌های تخم‌گذار از ۷۳ تا ۷۹ هفتگی

Table 2- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on egg laying performance of layer hens at 73-79 weeks

صفات عملکردی Performance traits	سطح کروم- متیونین Chromium- methionine level (µg/kg)							مقایسات متعامد Orthogonal comparisons	
	0	400	800	1200	1600	2000	اشتباه استاندارد میانگین SEMها	خطی Linear	درجه دوم Quadratic
مصرف خوراک روزانه (گرم/مرغ/روز) Feed intake (g/hen/day)	97.17[a]	95.45[b]	95.84[b]	95.49[b]	93.59[c]	91.54[d]	0.380	<0.001	0.0048
ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio	2.75[a]	2.65[a]	2.64[a]	2.67[a]	2.45[b]	2.37[b]	0.045	0.0001	0.087
تولید تخم‌مرغ (درصد) Egg production (%)	54.40[c]	55.23[c]	56.19[bc]	55.71[c]	58.69[ab]	59.64[a]	0.955	<0.0001	0.330
وزن تخم مرغ (گرم) Egg weight (g)	65.40	65.48	64.92	65.07	65.86	65.96	0.434	0.269	0.176
توده تخم‌مرغ تولیدی روزانه Egg mass (g/d/bird)	35.53[b]	36.15[b]	36.43[b]	36.24[b]	38.64[a]	39.31[a]	0.614	0.0001	0.132

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

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

نتایج اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج نشان داد که مکمل کروم آلی ارتفاع سفیده، رنگ زرده و واحد هاو را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). ارتفاع سفیده تخم‌مرغ با افزودن ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در هر کیلوگرم جیره غذایی کاهش معنی‌داری را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد، درحالی‌که افزودن سطوح ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره منجر به افزایش ارتفاع سفیده در مقایسه با گروه کنترل (بدون مکمل کروم- متیونین) شد. حسین (Hossain, 1998) بیان کرد که مکانسیم احتمالی تأثیر کروم بر کیفیت تخم‌مرغ از سه طریق: ۱) نقش کروم در ترکیب ساختمانی آلبومن یا پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها ۲) نقش در سنتز اووموسین که مسئول ساختار ژله‌ای آلبومن است ۳) تسهیل انتقال کاتیون‌ها به داخل آلبومن در طی فرآیندهای پمپاژی در رحم است. بنابراین، می‌توان بیان کرد که با افزودن مقادیر کمتر از ۱۶۰۰ میکروگرم مکمل کروم- متیونین به جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید، کیفیت سفیده تخم‌مرغ بهبود می‌یابد. افزودن کروم سبب افزایش شاخص رنگ زرده در مقایسه با شاهد شد (P<۰/۰۵). از آنجایی که کاروتنوئیدها که مسئول ایجاد رنگ زرده هستند، جزو ترکیبات محلول در چربی می‌باشند، لذا هر عاملی که

بتواند هضم و جذب چربی‌ها را بهبود بخشد، احتمالاً منجر به افزایش رنگ زرده تخم‌مرغ خواهد شد. ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2005) گزارش کردند استفاده از مکمل کروم سبب افزایش قابلیت هضم چربی‌ها می‌گردد. افزودن مکمل کروم- متیونین به‌جز تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی سبب افزایش واحد هاو در مقایسه با گروه کنترل گردید. واحد هاو معیاری برای تعیین کیفیت سفیده تخم‌مرغ است که کیفیت تخم‌مرغ را تعیین می‌کند (Karami *et al.*, 2018).

جدول ۳- اثرات افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت خارجی تخم‌مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش (۷۳ تا ۷۹ هفتگی)

Table 3- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on external egg quality traits of laying hens from 73 to 79 weeks of age

عامل Factor	شاخص شکل تخم‌مرغ (٪) Egg shape index (%)	وزن پوسته (گرم) Shell weight (g)	درصد پوسته (٪) Shell percentage (%)	ضخامت پوسته (میکرومتر) Shell thickness (µm)
	کروم- متیونین(میکروگرم در کیلوگرم) Chromium-methionine (µg/kg)			
0	76.63	5.33[c]	8.51	0.39
400	77.22	5.54[bc]	8.74	0.39
800	76.35	5.47[bc]	8.99	0.37
1200	77.65	5.58[bc]	9.02	0.38
1600	77.09	5.92[ab]	9.20	0.38
2000	77.21	6.05[a]	9.50	0.36
مدت نگهداری (روز) Storage period (d)				
تازه Fresh	76.83	5.35[b]	8.78	0.38
7	77.28	5.60[ab]	8.88	0.37
14	76.87	5.84[a]	9.23	0.38
دمای نگهداری (°C) Storage temperature (°C)				
4	77.13	5.61	8.92	0.38
25	76.86	5.70	9.10	0.38
سطح معنی‌داری P-value				
کروم- متیونین CrMet	0.813	0.022	0.242	0.215
مدت نگهداری Storage period	0.570	0.020	0.264	0.603
دمای نگهداری Storage temperature	0.420	0.752	0.703	0.348
کروم- متیونین× مدت نگهداری CrMet × storage period	0.704	0.379	0.830	0439
کروم- متیونین × دمای نگهداری CrMet × storage temperature	0.898	0.744	0.787	0.898
مدت نگهداری × دمای نگهداری Storage period × storage Temperature	0.338	0.260	0.955	0.307
کروم متیونین× مدت نگهداری × دمای نگهداری CrMet× storage period × storage temperature	0.473	0.504	0.329	0.350

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

[a, b] Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

جدول ٤- اثرات افزودن مختلف کروم- متیونین بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش (۷۳ تا ۷۹ هفتگی)

Table 4- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on internal egg quality traits of laying hens during the entire experimental period (from 73 to 79 weeks of age)

عامل Factor	ارتفاع سفیده (میلی‌متر) Albumen height (mm)	ارتفاع زرده (میلی‌متر) Yolk height (mm)	رنگ زرده Yolk color	شاخص زرده Yolk index	pH زرده Yolk Ph	pH سفیده Albumen pH	درصد زرده Yolk percentage (%)	درصد سفیده Albumen percentage (%)	واحد هاو Haugh unit
کروم- متیونین Chromium-methionine (µg/kg)									
0	8.19^{b}	18.37	6.63^{b}	23.64	6.20	8.68	29.55	61.93	88.97^{b}
400	8.72^{a}	17.92	6.86^{a}	23.50	6.17	8.73	28.45	62.80	92.34^{a}
800	8.88^{a}	18.00	6.90^{a}	23.66	6.24	8.63	29.94	61.06	93.23^{a}
1200	8.93^{a}	17.62	7.06^{a}	23.43	6.24	8.95	28.43	62.54	93.04^{a}
1600	8.63^{ab}	17.94	7.00^{a}	23.21	6.25	8.71	28.48	62.31	91.25^{ab}
2000	7.70^{c}	17.93	7.03^{a}	24.11	6.18	8.65	28.96	61.36	85.67^{c}
مدت نگهداری (روز) Storage period (d)									
تازه Fresh	8.82^{a}	17.99	7.00	23.79^{ab}	6.17^{b}	8.65^{b}	29.56	61.68	92.91^{a}
7	8.62^{a}	18.07	6.83	22.81^{b}	6.18^{b}	8.65^{b}	28.48	62.62	91.12^{ab}
14	8.24^{b}	17.85	6.96	24.27^{a}	6.27^{a}	8.88^{a}	29.15	61.54	89.31^{b}
دمای نگهداری (°C) Storage temperature (C°)									
4	8.58	17.93	6.94	23.37	6.22	8.70	29.03	61.04	90.96
25	8.41	18.02	6.87	23.92	6.21	8.77	28.87	61.95	90.43
اثر متقابل مدت نگهداری (روز) × دمای نگهداری (°C) Interaction effect of storage period (d) × storage temperature (°C)									
تازه × ۲۵ (°C) Fresh ×25 °C	8.82	17.99^{a}	7.00	23.73	6.17^{b}	8.56^{b}	29.56^{a}	61.69	92.91
۷ (روز) × ۴ (°C) 7 (d) ×4 °C	8.64	18.32^{a}	6.81	23.03	6.20^{b}	8.75^{ab}	29.05^{a}	62.01	91.74
۷ (روز) × ۲۵ (°C) 7 (d) ×25 °C	8.60	17.82^{b}	6.86	23.84	6.18^{b}	8.57^{b}	27.92^{b}	63.25	90.51
۱۴ (روز) × ۴ (°C) 14 (d) ×4 °C	8.27	17.73^{b}	6.94	24.01	6.23^{b}	8.79^{ab}	28.70^{ab}	61.89	89.13
۱۴ (روز) × ۲۵ (°C) 14 (d) ×25 °C	8.22	17.98^{a}	6.97	23.96	6.32^{a}	8.97^{a}	29.61^{a}	61.19	89.49

سطح معنی داری
P-value

Table 4 Continue ادامه جدول ٤

کروم- متیونین CrMet	0.0002	0.178	0.007	0.904	0.067	0.109	0.276	0.478	0.0001
مدت نگهداری Storage period	0.011	0.372	0.155	0.003	0.0001	0.001	0.146	0.156	0.005
دمای نگهداری Storage temperature	0.724	0.438	0.565	0.083	0.162	0.990	0.817	0.651	0.610
کروم- متیونین× مدت نگهداری CrMet ×storage period	0.106	0.196	0.439	0.680	0.226	0.249	0.354	0.785	0.080
کروم- متیونین × دمای نگهداری CrMet × storage temperature	0.049	0.497	0.353	0.921	0.152	0.553	0.894	0.849	0.045
مدت نگهداری × دمای نگهداری Storage period × storage temperature	0.946	0.025	0.847	0.067	0.007	0.010	0.034	0.110	0.357
کروم- متیونین× مدت نگهداری × دمای نگهداری CrMet × storage period× storage temperature	0.008	0.455	0.644	0.345	0.071	0.048	0.082	0.090	0.017

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

[a, b] Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ، کاهش معنی‌داری در ارتفاع سفیده دیده شد. این اثرات به‌صورت مشابهی برای واحد هاو نیز مشاهده شد (P<۰/۰۵). سیریرات و همکاران (Sirirat et al., 2013) گزارش کردند که افزودن سطوح مختلف مکمل کروم به جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار باعث افزایش معنی‌دار واحد هاو در مقایسه با گروه شاهد شد. درحالی‌که جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) گزارش کردند که با افزودن مکمل کروم- متیونین واحد هاو کاهش یافت. اثر متقابل کروم آلی و مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر متقابل بین کروم -متیونین و دمای نگهداری بر صفات ارتفاع سفیده و واحد هاو معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به نظر می‌رسد، با توجه به اینکه با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ ارتفاع سفیده و به تبع آن واحد هاو کاهش می‌یابد، چنین نتیجه‌ای مورد انتظار است. اثر متقابل بین مدت زمان و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر صفات کیفیت داخلی تخم‌مرغ از جمله ارتفاع زرده، pH زرده و سفیده تخم‌مرغ، و درصد زرده معنی‌دار بود. اثر متقابل سه‌گانه بین کروم- متیونین و مدت زمان نگهداری و دمای نگهداری تخم‌مرغ بر ارتفاع سفیده، pH سفیده و واحد هاو معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).به نظر می‌رسد که علت معنی‌دار بودن ارتفاع سفیده، به کاهش ارتفاع سفیده با افزایش مدت زمان نگهداری تخم‌مرغ مربوط باشد.

فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون

نتایج اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول، گلوکز و مالون دی‌آلدهید سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار را تحت تأثیر قرار داد (P<۰/۰۵). به‌دلیل اثرگذاری مکمل کروم به کارکرد بهتر انسولین، می‌توان کاهش میزان تری‌گلیسرید سرم خون با افزودن ۴۰۰ میکروگرم کروم آلی در هر کیلوگرم جیره غذایی را ناشی از کاهش میزان لیپولیز و یا جلوگیری از به هم خوردن موقعیت تری‌گلیسرید (کاهش انتقال) در بافت‌های محیطی دانست (Subiyatno *et al.*, 1996). کاربرد کروم در جیره مرغ‌های تخم‌گذار (Lien *et al.*, 2003) و گاوهای شیری دوره انتقال هم (Subiyatno *et al.*, 1996) توانست به کاهش معنی‌دار غلظت تری‌گلیسرید خون در حیوانات منجر شود. میزان کلسترول سرم خون در تیمار حاوی ۸۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که کروم برای متابولیسم لیپیدها و کاهش خطر آتروژنز ضروری است. برای مثال، موش‌ها و خرگوش‌هایی که از جیره‌هایی با کمبود کروم استفاده می‌کردند، کلسترول و چربی بیشتری در خون داشته و شکل‌گیری پلاک در رگ‌های آن‌ها بیشتر بود (Mowat, 1997). موافق با پژوهش حاضر، جهانیان و میرفندرسکی (Jahanian and Mirfendereski, 2015) نشان دادند که غلظت کلسترول پلاسمای مرغ‌های تخم‌گذار با افزودن ۱۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم (کروم- متیونین) جیره کاهش یافت. در مطالعه حاضر نیز تیمار ۸۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی به جزء تیمار ۴۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در کیلوگرم، سطح کلسترول کمتری داشت (P<۰/۰۵). هیچ یک از پارامترهای پروتئینی سرم (پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین) تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. اوندرچی و همکاران (Onderci *et al.*, 2003) نشان دادند که غلظت پروتئین کل سرم مرغ‌های تخم‌گذار پرورش یافته در دمای محیطی پایین با مکمل کروم افزایش یافت. افزایش غلظت پروتئین کل سرم با استفاده از مکمل کروم در جیره غذایی توسط ترکی و همکاران (Torki *et al.*, 2014) مشاهده شد؛ زمانی‌که ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم کروم (کروم پیکولینات) در جیره مرغ‌های تخم‌گذار تحت شرایط استرس گرمایی استفاده کردند. همچنین گزارش نمودند که غلظت آلبومین سرم نیز افزایش یافت، غلظت اسیداوریک و آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید (۷۹ هفتگی) تحت تأثیر سطوح افزودن کروم- متیونین جیره‌های غذایی قرار نگرفت. ما و همکاران (Ma *et al.*, 2014) نشان دادند که مکمل ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم غلظت اسیداوریک را تا ۳۱ درصد کاهش داد. با این حال، مشابه نتایج مطالعه حاضر، سامانتا و همکاران (Samanta *et al.*, 2008) نشان دادند که غلظت اسیداوریک سرم برای جوجه‌های دریافت‌کننده ۵۰۰ یا ۱۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم (کروم پیکولینات) و آن‌هایی که جیره شاهد دریافت کردند مشابه بود. مطابق نتایج جدول ۵، میزان گلوکز سرم خون با افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). طبق گزارش پالویک و همکاران (Palvik *et al.*, 2007) سطح گلوکز خون توسط مکانیسم‌های هموستاتیک حساسی، پیوسته در سطح نسبتاً ثابتی حفظ می‌شود و میزان آن به مرحله رشد و بلوغ، مصرف خوراک، عملکرد تولیدی و تغییرات محیطی بستگی دارد. کروم یک کوفاکتور برای فعالیت انسولین بوده و برای استفاده طبیعی از گلوکز و رشد حیوان لازم است و برای متابولیسم طبیعی گلوکز ضروری و یکی از اجزای فاکتور تحمل گلوکز GTF می‌باشد که از طریق انسولین، گلوکز را وارد سلول کرده و تولید انرژی می‌کند. انسولین منجر به تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین و نیز استفاده از گلوکز می‌شود (Sahin *et al.*, 2002). مشابه نتایج مطالعه حاضر، ساهین و همکاران (Sahin *et al.*, 2005) گزارش کردند که افزودن مکمل

کروم به جیره بلدرچین‌ها باعث کاهش گلوکز خون به‌صورت خطی شد. لین و همکاران (Lien *et al.*, 1996) گزارش کردند که جیره حاوی ۴۰۰ یا ۸۰۰ میکروگرم در کیلوگرم کروم باعث کاهش گلوکز خون در مرغ‌های تخم‌گذار شد. در مطالعه حاضر، استفاده از مکمل کروم آلی در جیره غذایی مرغ‌های تخم‌گذار در اواخر دوره تولید (۷۹ هفتگی) مشخص ساخت که غلظت مالون دی آلدهید سرم خون با افزودن ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در جیره غذایی در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت. مالون دی‌آلدهید یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها است و مسئول آسیب غشای سلولی است. بیان شده است که کروم سه ظرفیتی رادیکال‌های هیدروکسیل را از پراکسید هیدروژن از طریق چرخه هابر- ویز (Haber-Weiss) تولید می‌کند که می‌تواند تولید آنتی‌اکسیدان را تحریک کند (Samanta *et al.*, 2008). مطابق با نتایج این تحقیق، پریوس و همکاران (Preuss *et al.*, 1997) گزارش کردند که تشکیل مالون دی‌آلدهید کبدی، نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی، در کبد با مکمل‌سازی کروم پیکولینات و کروم نیکوتینات در موش‌های صحرایی کاهش یافت و کروم به‌عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرد.

جدول ۵- اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون مرغ‌های تخم‌گذار از ۷۳ تا ۷۹ هفتگی

Table 5- Effects of dietary supplementation of chromium-methionine on biochemical factors of blood serum of layer hen from 73 to 79 weeks of age

فاکتورهای بیوشیمیایی Biochemical factors	سطح کروم- متیونین (میکروگرم در کیلوگرم) Chromium- methionine (µg/kg)						اشتباه استاندارد میانگین‌ها SEM	سطح معنی داری P-value
	0	400	800	1200	1600	2000		
تری‌گلیسرید Triglyceride (mg/dl)	2680.4[ab]	1562.8[b]	1844.4[ab]	2790.8[a]	2010.6[ab]	2917[a]	10.755	0.0036
کلسترول Cholesterol (mg/dl)	202.00[a]	175.60[ab]	145.00[b]	194.80[a]	191.00[a]	196.40[a]	1.992	0.0014
پروتئین کل Total protein (g/dl)	5.12	5.80	5.54	5.80	5.52	5.58	0.349	0.539
آلبومین Albumin (g/dl)	2.38	2.38	1.96	2.36	2.28	2.48	0.267	0.299
گلوبولین Globulin	2.73	3.42	3.58	3.44	3.24	3.10	0.336	0.244
اسیداوریک Uric acid (mg/dl)	4.04	3.32	2.94	4.10	2.76	4.36	0.503	0.260
آلانین آمینو ترانسفراز ALT[1] (U/L)	21.40	25.80	28.40	27.20	29.00	31.60	1.501	0.795
آسپارتات آمینوترانسفراز AST[2] (U/L)	180.20	193.60	175.80	188.80	220.20	208.00	2.539	0.268
گلوکز Glucose (mg/dl)	223.80[a]	169.20[b]	131.80[b]	166.60[b]	161.60[b]	173.60[b]	2.096	<0.0001
مالون دی آلدهید MDA[3] (U/L)	4.47[a]	3.44[ab]	3.71[ab]	3.10[ab]	2.84[b]	2.78[b]	0.385	0.012

[a, b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P < 0.05$).

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

[1] Alanine Aminotransferase

[2] Aspartate Aminotransferase

[3] Malondialdehyde

پاسخ سیستم ایمنی هومورال

نتایج اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر پاسخ سیستم ایمنی مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کروم- متیونین به جیره غذایی سبب افزایش تولید آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن SRBC گردیده است (P<۰/۰۵). بیشترین تیتر آنتی‌بادی کل (IgT) با افزودن ۱۶۰۰ میکروگرم کروم- متیونین به جیره غذایی (۸/۳۳) و کمترین آن از لحاظ عددی مربوط به شاهد و بدون افزودن کروم- متیونین (۵/۳۳) مشاهده شد. همچنین اثر افزودن سطوح مختلف کروم- متیونین به جیره غذایی بر تیتر ایمنوگلوبولین M (IgM) تولید شده بر علیه آنتی‌ژن SRBC، معنی‌دار بود و بیشترین تیتر IgM در پرندگان تغذیه شده با ۲۰۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم کروم- متیونین در مقایسه با

پرندگانی بود که ۴۰۰ میکروگرم کروم- متیونین و بدون را دریافت کردند. ایمنی هومورال با تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های B منعکس می‌شود، بنابراین، سلول‌های B سلول‌های اصلی مسئول ایمنی هومورال هستند. مطالعات حیوانی ثابت کرده‌اند که کروم اثرات قابل توجهی بر ایمنی هومورال دارد. مکمل کروم پروپیونات می‌تواند تیتر آنتی‌بادی سرم و محتوای ایمونوگلوبولین را در خوک‌های از شیر گرفته افزایش دهد (Lien et al., 2005). مکمل کروم سه ظرفیتی می‌تواند به‌طور قابل توجهی محتوای ایمونوگلوبولین‌ها را تحت شرایط استرس شدید افزایش دهد (Zhang et al., 2009).

جدول ٦- اثرات سطوح مختلف کروم- متیونین بر پاسخ سیستم ایمنی هومورال مرغ‌های تخم‌گذار در کل دوره آزمایش

Table 6- Effects of different levels of chromium-methionine on the response of the humoral immune system of laying hens during the entire experimental period

فاکتورهای بیوشیمیایی Biochemical factors	سطح کروم- متیونین (میکروگرم در کیلوگرم) Chromium- methionine (µg/kg)							P-value
	0	400	800	1200	1600	2000	SEM	
ایمونوگلوبولین کل IgT	5.33[d]	6.00[cd]	5.66[d]	6.83[bc]	8.33[a]	7.33[b]	0.336	0.0001
ایمونوگلوبولین G IgG	1.83	2.50	2.00	3.16	3.00	1.83	0.311	0.065
ایمونوگلوبولین M IgM	3.00[d]	4.50[c]	5.83[b]	6.16[b]	7.33[a]	6.83[ab]	0.345	0.0001

[a, b] میانگین‌های هر ردیف با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($P < 0.05$).

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

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، استفاده از کروم- متیونین به‌میزان ۱۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌تواند منجر به بهبود صفات عملکردی تولید از جمله ضریب تبدیل خوراک، درصد تولید تخم‌مرغ و گرم تخم‌مرغ تولیدی روزانه، صفات کیفیت تخم‌مرغ از قبیل واحد هاو و ارتفاع سفیده، کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید سرم و عملکرد سیستم ایمنی در مقایسه با گروه شاهد شد.

References

1. Habibian, M., Ghazi, S., & Moeini, M. M. (2013). Lack of effect of dietary chromium supplementation on growth performance and serum insulin, glucose, and lipoprotein levels in broilers reared under heat stress condition. *Biological Trace Element Research*, *153*(1), 205-211. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9663-2
2. Hayirli, A. (2005). Chromium nutrition of livestock species. In Nutrition Abstracts and Reviews. Series B. *Livestock Feeds and Feeding*, *75*(5). CAB International.
3. Hossain, S.M. (1998). Organic chromium in poultry: Metabolic responses, effects on broiler carcass composition, nutrient composition of eggs. In: Lyons, T. P. and K. A. Jacques (Eds.). Biotech in the Feed Industry. Nottingham University Press, Nottingham, UK 203-216.
4. Jahanian, R., & Mirfendereski, E. (2015). Effect of high stocking density on performance, egg quality, and plasma and yolk antioxidant capacity in laying hens supplemented with organic chromium and vitamin C. *Livestock Science*, *177*, 117-124. https://doi.org /10.1016/ j.livsci. 2015.04.022
5. Jeejeebhoy, K. N., Chu, R. C., Marliss, E. B., Greenberg, G. R., & Bruce-Robertson, A. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *30*(4), 531-538. https://doi.org/10.1093/ajcn/30.4.531
6. Karami, M., Torki, M., & Mohammadi, H. (2018). Effects of dietary supplemental chromium methionine, zinc oxide, and ascorbic acid on performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens subjected to heat stress. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1174-1184. https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1481411
7. Khan, R. U., Naz, S., Dhama, K., Saminathan, M., Tiwari, R., Jeon, G. J., Laudadio, V & Tufarelli, V. (2014). Modes of action and beneficial applications of chromium in poultry nutrition, production and health: A review. *International Journal of Pharmacology*, *10*(7), 357–367. https://doi.org/10.3923/ijp.2014.357.367.
8. Kim, Y. H., Han, I. K., Shin, I. S., Chae, B. J., & Kang, T. H. (1996). Effect of dietary excessive chromium picolinate on growth performance, nutrient utilizability and serum traits in broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *9*(3), 349-354. https://doi.org/10.5713/ajas.1996.349.

9. Kuehn, L. A., Price, S. E., Honaker, C. F., & Siegel, P. B. (2006). Antibody response of chickens to sheep red blood cells: crosses among divergently selected lines and relaxed sublines. *Poultry Science, 85*(8), 1338-41. https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1338.
10. Lien, T. F., Yang, K. H., Lin, K. J. (2005) Effects of chromium propionate supplementation on growth performance, serum traits and immune response in weaned pigs. *Asian-Aust Journal of Animal Science, 18*, 403-408. https://doi.org/10.5713/ajas.2005.403.
11. Lien, T. F., Wu, C. P., & Lu, J. J. (2003). Effects of cod liver oil and chromium picolinatesupplements on the serum traits, egg yolk fatty acids and cholesterol content in laying hens. *Asian-Aust. Journal of Animal Science, 16*, 1177–1181. https://doi.org/10.5713/ ajas.2003.1177.
12. Lien, T. F., Chen, S., Shiau, S., Froman, D., & Hu, C. (1996). Y. Chromium picolinate reduces laying hen serum and egg yolk cholesterol. Profess. *Animal Science, 12(*2), 77–80. https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)32493-1.
13. Luo, X., Guo, Y. L., Liu, B., Hao, Z. L., Chen, J. L., Gao, F. S., & Yu, S. X. (1999). Effect of dietary chromium on growth, serum biochemical traits and immune responses of broiler chicks during 0–3 weeks of age. *Acta Veterinary et Zootechnica Sinica, 30*, 481–489.
14. Ma, W., Gu, Y., Lu, J., Yuan, L., & Zhao, R. (2014). Effects of chromium propionate on egg production, egg quality, plasma biochemical parameters, and egg chromium deposition in late-phase laying hens. *Biological trace element research, 157*(2), 113–119. https://doi.org/ 10.1007/ s12011-013-9875-5.
15. Maysa, M. H. (2011). Influence of adding organic chromium in diet on productive traits, serum constituents and immune status of Bandarah laying hens and semen physical properties for cocks in winter season. *Egyptian Poultry Science Journal*, *31*(2), 203-216.
16. Mowat, D. N. (1997). Organic chromium in animal nutrition. Chromium Books 6 Mayfield Avenue Guelph, ON N1G 2L8 Canada.
17. Nasiroleslami, M., & Torki, M. (2011). Egg quality characteristics and productive performance of laying hens fed diets supplemented by *Echinacea purpurea* extract, immunizing and vitamin E. *Glob. Veterin*, 7(3), 270-275.
18. Nattapon, S., Jin-Jenn, L., Alex, T., & Tu-Fa Lien, T. (2012). Effect of different level of nanoparticles of Cr picolinate supplementation on performance, egg quality, retention and tissue mineral accumulation in layers. *Journal of Agricultural Science*, 5(2), 150-159. https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p150.
19. Onderci, M., Sahin, N., Sahin, K., & Kilic, N. (2003). Antioxidant properties of chromium and zinc: *In vivo* effects on digestibility, lipid peroxidation, antioxidant vitamins, and some minerals under a Low ambient temperature. *Biological trace element research, 92*(2), 139–150. https://doi.org/10.1385/BTER:92:2:139.
20. Palvik, A., Pokludova, M., Zapletal, D., & Jelinek, P. (2007). Effect of housing systems on biochemical indicators of blood plasma in laying hens. *Acta Veterinary*, *76*(3), 339-347. https://doi.org/10.2754/avb200776030339.
21. Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: A review. *Veterinary Medicine*, 52(1), 1-18. doi: 10.17221/2010-VETMED.
22. Preuss, H. G., Grojec, P. L., Lieberman, S., & Anderson, R. A. (1997). Effects of different chromium compounds on blood pressure and lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Nephrology*, *47*(5), 325–330.
23. Sahin, K., Ozbey, O., Onderci, M., Cikim, G., & Aysondu, M. H. (2002). Chromium supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality and some serum metabolites of laying Japanese quail. *The Journal of nutrition, 132*(6), 1265–1268. https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1265.
24. Sahin, N., Sahin, K., Onderci, M., Gursu, M. F., Cikim, G., Vijaya, J., Kucuk, O. (2005). Chromium picolinate, rather than biotin, alleviates performance and metabolic parameters in heat stressed quail. *British Poultry Science, 46*(4), 457-463. https://doi.org/10.1080/00071660500190918
25. Samanta, S., Haldar, S., Bahadur, V., & Ghosh, T. K. (2008). Chromium picolinate can ameliorate the negative effects of heat stress and enhance performance, carcass and meat traits in broiler chickens by reducing the circulatory cortisol level. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 88*(5), 787–796. https://doi.org/10.1002/jsfa.3146.
26. SAS. 2004. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC.
27. Sirirat, N., Lu, J., Alex, J., Hung, T. Y., & Lien, T. F. (2013). Effect of different levels of nanoparticles chromium picolinate supplementation on performance, egg quality, mineral retention, and tissues minerals accumulation in layer chickens. *Journal of Agricultural Science*, *5*(2), 150-159. https://doi.org/10.5539/jas.v5n2p150.
28. Subiyatno, A., Mowat, D. N., & Yang, W. Z. (1996). Plasma metabolite response toglucose infusion in dairy cows supplemented with chelated chromium. *Journal of Dairy Science, 79*, 1436-1445. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76502-5.
29. Torki, M., Zangeneh, S., & Habibian, M. (2014). Performance, egg quality traits, and serum metabolite concentrations of laying hens affected by dietary supplemental chromium picolinate and vitamin C under a heat-stress condition. *Biological Trace Element Research*, *157*(2), 120–129. https://doi.org/10.1007/s12011-013-9872-8.
30. Uyanik, F., Kaya, S., Kolsuz, A. H., Eren, M., & Sahin, N. (2002). The effect of chromium supplementation on egg production, egg quality and some serum parameters in laying hens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal*

Sciences, *26*(2), 379-387.
31. Valera, M.; Gutiérrez, O., & Elías, A. (2019). Organic products based on chromium for poultry production. Main advances in the last years. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *53*(3), 219-230.
32. Zhang, C. H., Jiang, J. Y., Ren, H. Y., Zhu, F. H., Li, L. W. (2009) Effects of chromium yeast on immune function and carcass quality in heat stressed broilers. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, *5*, 56-61.
33. Zhang, S., Sun, X., Liao, X., Lu, L., Zhang, L., Ma, Q., & Luo, X. (2018). Dietary supplementation with chromium picolinate influences serum glucose and immune response of brown-egg laying hens. *Biological Trace Element Research*, *185*(2), 448-455. http://doi.org/10.1007/s12011-017-1232-7.

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 187-202

Effects of *Spirulina platensis* on Growth Performance, Carcass Traits, Cecal Microflora and Immune Response of Broiler Chickens Under Heat Stress and Comparing It with Vitamin E

Farrokh Nazmi[1], Seyed Ali Mirghelenj[2*], Mohsen Daneshyar[3], Mohammad Amir Karimi Torshizi[4], Sina Peyvastegan[5], Hosna Hajati[6]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, International Pardis of Urmia University, Urmia, Iran
2, 3 and 5- Associate Professor, Professor and Assisstant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.
4- Associate Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
6- Assisstant Professor, Animal Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources, Research and Education Center, AREEO, Tabriz, Iran.
*Corresponding Author's Email: a_mirghelenj@yahoo.com

Received: 19-06-2023
Revised: 23-12-2023
Accepted: 08-01-2024
Available Online: 0۴-0۸-202۴

How to cite this article:
Nazmi, F., Mirghelenj, S. A., Daneshyar, M., Karimi Torshizi, M. A., Peyvastegan, S., & Hajati, H. (2023). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance, carcass traits, cecal microflora and immune response of broiler chickens under heat stress and comparing it with vitamin E. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 187-202. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83033.1154

Introduction: Due to genetic selection, today's strains exhibit higher metabolic activity, resulting in increased heat production and reduced heat resistance. This can negatively impact their immune system and production performance (Havenstein et al. 1994).Thaxton *et al*. (1968) showed that high ambient temperature can have a negative effect on the immune responses of broiler chickens. In recent years, in order to improve the health of chicken meat consumers, the production of broiler chickens without the use of antibiotics has been proposed, and the ban on the use of antibiotics has been issued by the European Union in 1999 (Youssef *et al*., 2016). For this reason, today there is a tendency to use alternative sources. Algae and microalgae are of the natural substances whose beneficial effects have received much attention in recent years. *Spirulina platensis* (SP) is a filamentous blue-green microalgae (cyanobacteria) generally regarded as prebiotic and source of high quality protein, minerals, essential fatty acids, essential amino acids, pigments and phenolic acids. Many studies have shown that *Spirulina* has antioxidant, immunomodulatory, anti-inflammatory, antiviral, and antimicrobial activity in various experimental animals (Hajati and Zaghari 2019).

Materials and Methods: A total of 360 one-day old male broiler chickens (Ross 308 strain) were allocated to 6 treatments, 6 replicates and 10 birds each replicate in a completely randomized design. The experimental treatments included different levels of *Spirulina platensis* microalgae powder: 0 (Control), 0.25, 0.50, 0.75, and 1.0 percent *Spirulina platensis* powder, and one treatment included Vitamin E at the level of 150 g/ton feed. The basal diet was based on corn0soybean meal and all the diets were isocaloric and isonitrogenous and used for 42 days in diets. During the experiment, the feed consumption and weight gain of the chickens were measured weekly and the feed conversion ratio was calculated for each week and period.

On 42 d of experiment, 2 birds from each replicate were randomly selected, humoral immune response was evaluated and then killed after weighing, carcass components and internal organs were weighed and their weight was calculated as a percentage of live weight. In order to evaluate the humoral immune system, the antibody titer produced against SRBC was measured using the hemagglutination method. In the end of experiment, the microbial population of the cecum was counted. All the data were analyzed in the form of a completely random

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83033.1154

design by SAS software and with the GLM procedure, and the comparison of means was done with Tukey's test.

Results and Discussion: Results showed that the use of different levels of SP had no significant effect on the amount of feed intake during the whole period (P<0.05), but in finisher period, using %1 SP could improve body weight gain and feed efficiency of the broilers compared to control group (P<0.05). Breast yield of the chickens was affected by the level of dietary *Spirulina*, and it improved at the levels of 0.5, 0.75, and 1.0 percent SP usage compared to control and vitamin E groups (P<0.01). The relative weight of abdominal fat decreased in the birds fed with SP at the levels of 0.75 and 1.0 percent compared to control group (P<0.01). There was no difference among total count, ceca Lactobacillus and *E. Coli* in the chickens of different experimental groups (P>0.05). The response of humoral immune system was higher in all four levels of SP and also vitamin E compared to control treatment. Chickens which consumed *Spirulina* at the level of 1 percent had the highest level of antibody titer. Mustafa *et al*. (2021) by achieving a growth performance similar to the present research, stated that the effect of SP on the intestinal microbial population, such as the increase of *Lactobacillus* and the decrease of *Escherichia coli*, has improved the performance of the birds under heat stress conditions. According to the reports on the effects of heat stress on digestive enzymes (Sahin *et al*., 2002) and the efforts of previous researchers to overcome the adverse effects of heat stress on digestive enzymes by using phytogenic compounds (Khosravinia *et al*., 2016), the researchers of the present study believe that the improvement of the mucous tissue and intestinal immune system and perhaps the increase in the secretion of digestive enzymes are the most important factors for improving the performance of birds in heat stress conditions.

Conclusion: Under heat stress condition, using 1 percent *Spirulina platensis* microalgae in broiler chickens' diet could improve both humoral immune system and growth performance.

Keywords: Antibiotic, Antioxidant, Prebiotic effects, Small intestine, Weight gain

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۰۲-۱۸۷

تأثیر سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Arthrospira platensis*) بر عملکرد رشد، خصوصیات لاشه، جمعیت میکروبی روده و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی و مقایسه آن با مکمل ویتامین E

فرخ نظمی[۱]، سیدعلی میرقلنج[۲*]، محسن دانشیار[۳]، محمدامیر کریمی ترشیزی[۴]، سینا پیوستگان[۵]، حسنا حاجاتی[۶]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸

چکیده

ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌عنوان یک ماده خوراکی طبیعی و عمل‌گرا، به‌دلیل اثرات پری‌بیوتیکی، پاداکسندگی و تقویت‌کنندگی پاسخ ایمنی، ممکن است بتواند کاهش عملکرد مرغ‌های گوشتی تحت تنش گرمایی را تخفیف دهد. این تحقیق به‌منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر عملکرد، خصوصیات لاشه، ترکیب جمعیت میکروبی روده کور و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی طراحی شد. تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه نر سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به شش تیمار آزمایشی با شش تکرار ۱۰ قطعه‌ای اختصاص داده شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف پودر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*: صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۱ و یک تیمار حاوی ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E بود. جیره پایه بر اساس دانه ذرت- کنجاله سویا بوده و همه جیره‌ها نیز بر اساس انرژی و پروتئین یکسان فرموله و به‌مدت ۴۲ روز در جیره‌های غذایی استفاده شدند. در دوره پایانی پرورش، استفاده از یک درصد اسپیرولینا توانست افزایش وزن جوجه ها و بازده مصرف خوراک جوجه‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود دهد (P<۰/۰۵). بازده سینه جوجه‌ها در سطوح ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد، نسبت به گروه شاهد و ویتامین E بهبود یافت (P<۰/۰۱). وزن نسبی چربی محوطه بطنی در پرندگان تغذیه شده با سطوح ۰/۷۵ و یک درصد اسپیرولینا، نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۱). شمار جمعیت کل، لاکتوباسیل و اشریشیاکولی روده کور در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵). پاسخ سامانه ایمنی هومورال در هر چهار سطح اسپیرولینا و نیز ویتامین E به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد بالا بوده است. جوجه‌هایی که سطح یک درصد اسپیرولینا دریافت کرده بودند بالاترین مقدار عیار پادتن را داشتند، بنابراین تحت شرایط تنش گرمایی، استفاده از یک درصد ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جیره جوجه گوشتی، باعث بهبود پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌های گوشتی و عملکرد رشد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اثرات پری‌بیوتیکی، افزایش وزن، پاداکسندگی، پادزیست، روده باریک

مقدمه

سرعت رشد جوجه‌های گوشتی امروزی، نسبت به سه دهه قبل، افزایش قابل توجهی پیدا کرده است، به‌طوری‌که جوجه‌های گوشتی امروزه سه برابر سریع‌تر از جوجه‌های گوشتی قدیمی رشد می‌کنند. انتخاب ژنتیکی انجام شده بر روی طیور باعث شده است که سویه های امروزی فعالیت متابولیکی بیشتری نیز داشته باشند که این امر باعث تولید بیشتر گرمای بدن آن‌ها شده است که می‌تواند با تحت تأثیر قرار دادن پاسخ ایمنی یا تأثیرات منفی بر خصوصیات فیزیولوژیکی پرنده، عملکرد تولید آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Havenstein *et al.*, 1994). برخی محققان نشان دادند که دمای بالای محیط می‌تواند بر پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی تأثیر منفی

۱- دانشجوی دکترای تخصصی تغذیه طیور، گروه علوم دامی، پردیس بین المللی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲، ۳ و ۵- به‌ترتیب دانشیار، استاد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۴- دانشیار گروه پرورش و مدیریت تولید طیور، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۶- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: a_mirghelenj@yahoo.com)

http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83033.1154

داشته باشد. یکی از این اثرات، سرکوب گلبول‌های سفید است (Thaxton *et al*., 1968). نشان داده شده که تنش گرمایی باعث کاهش عیار پادتن بر ضد گلبول قرمز گوسفند، تعداد لنفوسیت‌ها و وزن اندام‌های لنفاوی و افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در جوجه‌های گوشتی می‌شود (Olfati *et al*., 2018). با توجه به اثرات منفی ذکر شده، باید به‌دنبال راه‌هایی برای کاهش این اثرات منفی بود. به غیر از اثرات منفی تنش گرمایی بر پاسخ ایمنی جوجه‌ها، احتمال تغییر در جمعیت میکروبی روده جوجه‌ها نیز وجود دارد. ترکیب جمعیت میکروبی روده پرندگان رابطه مستقیمی با هضم و جذب مواد مغذی و در نتیجه، رشد و افزایش وزن بدن جوجه‌ها دارد. مطالعات پیشین تأثیر منفی تنش حرارتی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و به‌ویژه آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین در دستگاه گوارش پرندگان را ثابت کرده‌اند (Sahin *et al*., 2002). برخی دیگر از محققان بیان کردند که نفوذپذیری سلول‌های روده به سموم باکتریایی در اثر تنش گرمایی باعث عملکرد منفی بر افزایش وزن در جوجه‌های گوشتی می گردد (Tabler *et al*., 2020 ; Nanto Hara *et al*., 2019). برخی نیز با تأیید این مسئله اظهار داشتند که آسیب به بافت روده در اثر تغییر جمعیت میکروبی روده و همین‌طور آسیب به بافت کبد تحت تأثیر تنش حرارتی از اصلی‌ترین دلایل کاهش عملکرد رشد پرنده است (Liu *et al*., 2020). در سالیان اخیر، به‌منظور تأمین رفاه و ارتقاء سطح سلامت مصرف‌کننده، پرورش جوجه‌های گوشتی بدون استفاده از ترکیبات پادزیست محرک رشد (آنتی‌بیوتیک) مطرح شده و دستور منع استفاده از این ترکیبات در سال ۱۹۹۹ توسط اتحادیه اروپا صادر شده است (Yusuf *et al*., 2016). به همین دلیل، امروزه تمایل به استفاده از منابع جایگزین وجود دارد. یکی از مواد طبیعی که اثرات سودمند آن‌ها در سالیان اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، جلبک‌ها و ریزجلبک‌ها می‌باشند. بیشتر ریزجلبک‌ها علاوه‌بر اینکه دارای خصوصیات پاداکسندگی و تقویت‌کنندگی سامانه ایمنی هستند، دارای خصوصیات پری‌بیوتیکی مؤثری نیز می‌باشند (Rawshon *et al*., 2015).

از مهم‌ترین ریز جلبک‌هایی که راندمان تولید بالایی داشته و کشت آن نیز در کشور ما رو به توسعه است، ریزجلبک *اسپیرولینا* است. *اسپیرولینا پلاتنسیس* دارای تیپ سلولی پروکاریوتیک است،این جلبک گاهی سیانوباکتری نامیده می‌شود و از قلمرو متعلق به Monera، کلاس Cyanophyceae، رده Nostocales و خانواده Oscillatoriaceae است و در سه گونه مهم *اسپیرولینا پلاتنسیس*، *اسپیرولینا ماگزیما* و *اسپیرولینا فوسیفورمیس* طبقه‌بندی می‌شود (Hajati and Zaghari, 2019). فعالیت ضد میکروبی *اسپیرولینا* می‌تواند ناشی از وجود اسید گاما لینولنیک، اسیدهای چرب فعال و اثرات همکوشی بین اسید لوریک و پالمیتولئیک باشد (Hajati and Zaghari, 2019). برخی محققان اثرات کاهش تعداد کلی‌فرم‌ها را با افزودن جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی گزارش کردند (Ansari *et al*., 2018) ایمولینا، پلی-ساکاریدی با وزن مولکولی بالا در عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا* است که می‌تواند باعث افزایش ایمنی اختصاصی گردد (Lobner *et al*., 2008). برخی محققان گزارش کردند که تغذیه جوجه‌های گوشتی با *اسپیرولینا* باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی و رشد و توسعه اندام‌های لنفوئیدی می‌شود (Al-Batshan *et al*., 2001; Qureshi *et al*., 1996; Raju *et al*., 2004). گزارش شده است که استفاده از *اسپیرولینا* در جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند باعث افزایش تیتر ایمونوگلوبولین G در جوجه‌های گوشتی شود (Zeweil *et al*., 2016) . برخی از محققان دیگر نشان دادند که استفاده از *اسپیرولینا* در جیره جوجه‌های گوشتی، باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید و کاهش درصد تلفات در جوجه‌های گوشتی گردید (Lokapirnasaria *et al*., 2016). در شرایط تنش گرمایی اثر سطوح ۰/۵ و یک درصد *اسپیرولینا* به همراه ۰/۷۵درصد ویتامین E بررسی شد و نشان داده شد که در شرایط تنش گرمایی، *اسپیرولینا* می‌تواند هم عملکرد و هم پاسخ ایمنی جوجه‌ها را نسبت به ویتامین E بهبود دهد (Zeweil *et al*., 2016). در تحقیق دیگری، نشان داده شد که برخی از ترکیبات *اسپیرولینا* همانند فیکوسیانین می‌تواند باعث بهبود پاسخ ایمنی با تخریب میکروب‌ها یا حذف سموم و همچنین باعث افزایش سلول‌های T و بهبود فعالیت تیموس شود (Belay and Teeter, 1993;Baojiang 1994). *اسپیرولینا* همچنین می‌تواند با افزایش فعالیت غده تیموس، تولید سلول‌های T در جوجه‌های گوشتی را بهبود دهد(Qureshi *et al*., 1996) . طبق تحقیقات کائود (Kaoud 2012) با تغذیه اسپیرولینا، وزن‌های نسبی و مطلق بورس و تیموس در همه پرندگان در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. با توجه به افزایش دمای هوای کره زمین در سالیان اخیر، مدیریت گرمای سالن‌های مرغداری دچار چالش اساسی شده و این تنش گرمایی می‌تواند با تأثیر منفی بر آنزیم‌های گوارشی پرنده، وضعیت پاداکسندگی، جمعیت میکروبی روده و ایمنی، عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی را تحت تأثیر قرار دهد. از طرفی دیگر، یکی از مواد طبیعی که اثرات سودمند پاداکسندگی و تقویت‌کنندگی سامانه ایمنی شان بسیار مورد توجه قرار گرفته است، جلبک‌ها و ریزجلبک‌ها می‌باشند. تکثیر ریزجلبک‌هایی مانند *اسپیرولینا* در سالیان اخیر، رو به گسترش است و در صورت تأثیر مثبت بر عملکرد پرنده در شرایط تنش گرمایی، پتانسیل بالایی در این شرایط برای استفاده در جیره غذایی طیور به‌عنوان مکمل افزودنی دارد. بنابراین، هدف از آزمایش حاضر، بررسی اثرات سطوح مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس* تولید داخل،

بر عملکرد رشد، خصوصیات لاشه، جمعیت میکربی روده کور و پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی و مقایسه آن با ویتامین E به‌عنوان یک پاداکسنده عمومی است.

مواد و روش‌ها

ریزجلبک *اسپیرولینای* مورد استفاده در این آزمایش، از شرکت جلبک پارس تهیه و پس از تجزیه شیمیایی مواد مغذی در آزمایشگاه، در جیره‌های آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. میزان انرژی قابل متابولیسم این ریزجلبک ۱/۵۱ کیلوکالری بر گرم و درصد پروتئین خام، کلسیم، فسفر، لایزین و متیونین به‌ترتیب ۵۵، ۱/۵، ۰/۱، ۳ و ۱/۵ درصد بود. در آزمایش مزرعه‌ای، تعداد۳۶۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه نر سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به شش تیمار آزمایشی با شش تکرار ۱۰ قطعه‌ای اختصاص داده شد. تیمارهای آزمایشی ۱ تا ۵ شامل جیره‌های حاوی سطوح مختلف: صفر (شاهد)، ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۷۵و یک درصد پودر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بوده و در تیمار ۶، از ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E استفاده شد. تمام جیره‌های آزمایشی بر طبق نیازهای تغذیه‌ای راهنمای جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سه دوره آغازین (۱۰- ۰ روزگی)، رشد (۲۵-۱۱ روزگی) و پایانی (۲۶-۴۲ روزگی) و بر اساس مواد مغذی یکسان با نرم‌افزار UFFDA تنظیم و برای تغذیه استفاده شدند. اقلام خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره‌های غذایی در دوره‌های آغازین، رشد و پایانی به‌ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. برنامه نوری دوره پرورش از ابتدا تا انتهای آزمایش به‌صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی اعمال گردید. برای اعمال تنش گرمایی، از هفته چهارم تا انتهای دوره، از نه صبح تا پنج بعدازظهر، دمای حدود ۳۲ درجه سانتی‌گراد در سالن اعمال شد. خوراک مصرفی جوجه‌ها در پایان هر دوره، به‌صورت میانگین مصرف جوجه‌های موجود در هر پن محاسبه شد. به‌طوری‌که مصرف خوراک برای هر دوره، پس از توزین مقدار خوراک باقی‌مانده در داخل دانخوری‌های هر پن به‌علاوه وزن دان پرت شده و تفاضل مقدار فوق از وزن اولیه خوراک توزین شده برای هر پن به‌صورت جوجه روز محاسبه شد. جهت اندازه‌گیری افزایش وزن جوجه‌ها نیز، پایان هر دوره، جوجه‌ها به‌صورت گروهی توسط ترازو وزن‌کشی شده و میزان افزایش وزن پرنده‌های هر پن در هر هفته، با استفاده از تفاضل وزن جوجه‌ها در ابتدا و انتهای هر دوره بر اساس روز جوجه اندازه‌گیری گردید. ضریب تبدیل خوراک نیز از تقسیم مقدار خوراک مصرفی هر پن آزمایشی بر افزایش وزن همان پن محاسبه گردید. در پایان دوره آزمایش (۴۲ روزگی)، دو پرنده از هر تکرار با میانگین وزن پن، انتخاب و توزین گردید. پس از کشتار، وزن پانکراس، کبد، چربی محوطه بطنی، ران، سینه و وزن لاشه اندازه‌گیری و بر اساس درصدی از وزن زنده پرنده گزارش شدند.

برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی همورال علیه گلبول قرمز گوسفند از یک رأس گوسفند نر، ۱۰ سی‌سی خون اخذ و در شیشه حاوی سیترات سدیم ریخته شد. سپس توسط سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه) گلبول‌های قرمز از سرم خون و گلبول‌های سفید جدا شده و سه بار با بافر فسفات سالین شسته شد. در نهایت، محلول پنج درصد از گلبول قرمز در بافر فسفات سالین تهیه گردیده و برای بررسی ایمنی هومورال و اندازه‌گیری پاسخ ایمنی علیه گلبول قرمز گوسفند در روز ۲۸ و ۳۵ آزمایش به دو جوجه شماره‌گذاری شده از هر پن ۰/۵ سی‌سی از محلول فوق در ماهیچه سینه تزریق شد. برای اندازه‌گیری پاسخ ایمنی علیه گلبول قرمز گوسفند، در روز۳۵ و ۴۲ آزمایش، دو میلی‌لیتر خون از ورید بالی جوجه‌ها اخذ و بعد از سانتریفیوژ، سرم‌ها جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید، عیار پادتن تولید شده علیه SRBC با استفاده از روش هماگلوتیناسیون[1](HA) اندازه‌گیری شد. برای بررسی جمعیت میکروبی روده کور، محتویات روده کور هر پرنده در ظروف استریل شده درب بسته ریخته شده و بلافاصله به‌منظور انجماد سریع، در نیتروژن مایع قرار داده شد و پس از اتمام نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر ^{o}C ۸۰- تا زمان انجام شمارش باکتریایی نگهداری شدند. برای شروع آزمایش، نمونه‌ها همگن شدند. برای همگن کردن، با یک میله شیشه‌ای استریل به هم زده شدند و سپس آماده‌سازی رقت‌ها صورت گرفت. یک گرم از نمونه روده کور در کپسول چینی ریخته و نه میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژیکی استریل روی آن اضافه و به هم زده شد تا پس از همگن شدن رقت 10^{-1} به‌دست آید، سپس از این رقت یک میلی‌لیتر برداشته و به لوله دوم (که حاوی نه میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیکی بود) اضافه شد تا رقت 10^{-2} به‌دست آمد و این کار تا رقت 10^{-10} ادامه یافت. از رقت‌های به‌دست‌آمده فوق بعد از تکان دادن لوله‌ها از رقت 10^{-1} در سه تکرار در محیط‌های کشت توتال کانت (Que-lab) و EMB آگار (Merck) و MRS آگار (Que-lab) اسیدی کشت داده شد. محیط کشت توتال‌کانت، برای شمارش کلی جمعیت باکتری، EMB برای *اشریشیاکلی* و MRS آگار برای لاکتوباسیل‌ها استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط‌های مربوطه ریخته و به‌صورت سطحی با کمک میله L شکل کشت داده شد و برای شمارش جمعیت میکروبی کل از محیط کشت مک کانکی آگار دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور در شرایط بی‌هوازی و پنج درصد CO_2 قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه کلنی کانتر (Sana Sl 902, Iran)، کلنی‌های قابل شمارش بین محدوده ۲۵۰-۲۵ مورد شمارش

1- HemagglutinationAssay (HA)

قرار گرفته و میانگین و لگاریتم کلنی‌های شمارش شده محاسبه شد. در نهایت، پس از انجام تست نرمالیته، داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از رویه GLM برای یک طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزار SAS (۹/۴) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه تفاوت بین میانگین‌ها از آزمون توکی کرامر در سطح معنی‌داری پنج درصد استفاده گردید. مدل آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌صورت زیر است:

معادله (۱)
$$Y_{ij}= \mu + T_i + e_{ij}$$

که در آن، Y_{ij}: تیمارهای آزمایش، μ: میانگین کل آزمایش و e_{ij}: اشتباه آزمایشی مربوط به مشاهده می‌باشد.

جدول ۱- اقلام و ترکیب شیمیایی جیره در دوره آغازین (۰-۱۰ روزگی)

Table 1- Ingredients and chemical composition of diets in starter period (0-10 days)

	(%) درصد				
اقلام خوراکی Feed ingredients	جیره شاهد Control diet	0.25% *Spirulina*	0.5 % *Spirulina*	0.75% *Spirulina*	1% *Spirulina*
دانه ذرت Corn grain	53.00	53.05	53.11	53.16	53.21
کنجاله سویا Soybean meal	39.26	38.93	38.57	38.32	38.00
اسپیرولینا *Spirulina*	0	0.25	0.50	0.75	1
روغن سویا Soybean oil	2.82	2.84	2.86	2.88	2.90
دی‌کلسیم‌فسفات DCP	2.01	2.02	2.05	2.02	2.05
پوسته صدف Oyster shell	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27
نمک طعام Common salt	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
کربنات سدیم $NaHCO_3$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
دی‌ال-متیونین DL-methionine	0.30	0.30	0.30	0.29	0.28
ال- لیزین هیدروکلرید L-lysine HCL	0.28	0.28	0.28	0.27	0.26
ال- ترئونین L-threonine	0.09	0.09	0.09	0.07	0.06
پری‌میکس ویتامینی[1] Vitamin premix[1]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
پری‌میکس معدنی[1] Mineral premix[1]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
کوکسیدیواستات Coccidiostate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
جمع کل Total	100	100	100	100	100
Calculated chemical composition (%)					
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/ کیلوگرم) AME (kcal/kg)	2950	2950	2950	2950	2950
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	21.9	21.9	21.9	21.9	21.9
کلسیم (درصد) Calcium (%)	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
فسفر قابل‌دسترس (درصد) Available phosphorus (%)(	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
سدیم (درصد)					

Table 1 Continue **ادامه جدول ۱**

Na (%) متیونین (درصد)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Methionine (%) متیونین +سیستین (درصد)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Methionine+cysteine (%) لیزین (درصد)	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Lysine (%) ترئونین (درصد)	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36
Threonine (%) تریپتوفان (درصد)	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
Tryptophan (%) تعادل آنیون کاتیون جیره (میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Dietary anion cation balance (meq/kg)	243	243	243	243	243

[1] ویتامینها و مواد معدنی تامین شده در هر کیلوگرم جیره: ویتامین A: ۱۰۰۰واحد بین المللی، ویتامینD_3: ۲۵۰۰ واحد بین المللی، ویتامینE: ۱۰ واحد بین المللی، ویتامینB_1: ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_1: ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_2: ۴ میلی گرم، ویتامینB3: ۸ میلی گرم، ویتامینB6: ۲ میلی گرم، ویتامینB9: ۰/۵۶ میلی گرم، ویتامینB12: ۰/۰۱۵میلی گرم، ویتامینH2: ۰/۱۵میلی گرم، کولین کلراید: ۲۰۰ میلی گرم، آهن: ۵۰ میلی گرم، سولفات روی : ۶۰ میلی گرم، سولفات منگنز: ۱۶۰ میلی گرم، ید: ۱میلی گرم، سولفات مس: ۵ میلی گرم، سلنیوم: ۰/۱ میلی گرم.

[1]Provided vitamins and minerals premix per kilogram of diet: vitamin A: 10000 IU; vitamin D_3:2500 IU; vitamin E: 10 IU; vitamin B_1: 2.2 mg; vitamin B_2: 4 mg; vitamin B_3; 8 mg; vitamin B2:4 mg; vitamin B3: 8 mg; vitamin B6: 2mg; vitamin B9: 0.56 mg; vitamin B12: 0.015 mg; vitamin H2: 0.15 mg; cholin chloride: 200 mg; Fe: 50 mg; Zn-sulfate: 60 mg; Mn-sulfate: 160 mg; Iodine: 1 mg; Cu-sulfate: 5 mg; Selenium: 0.1 mg.

جدول ۲- اقلام و ترکیب شیمیایی جیره در دوره رشد (۱۱-۲۵ روزگی)

Table 2- Ingredients and chemical composition of diets in grower period (11-25 days)

	درصد (%)				
اقلام خوراکی Feed ingredients	جیره شاهد Control diet	0.25% *Spirulina*	0.5 % *Spirulina*	0.75% *Spirulina*	1% *Spirulina*
دانه ذرت Corn grain	56.50	56.56	56.61	56.66	56.72
کنجاله سویا Soybean meal	35.42	35.10	33.77	34.45	34.13
اسپیرولینا *Spirulina*	0	0.25	0.50	0.75	1
روغن سویا Soybean oil	3.61	3.62	3.64	3.66	3.68
دی‌کلسیم‌فسفات DCP	1.92	1.92	1.93	1.93	1.93
پوسته صدف Oyster shell	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
نمک طعام Common salt	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
کربنات سدیم $NaHCO_3$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
دی‌ال-متیونین DL-methionine	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
ال- لیزین هیدروکلرید L-lysine HCL	0.14	0.14	0.15	0.15	0.14
ال- ترئونین L-threonine	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01
پری‌میکس ویتامینی[1]					

Table 2 Continue **ادامه جدول ۲**

Vitamin premix[1] پری‌میکس معدنی[۱]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix[1] کوکسیدیواستات	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Coccidiostate جمع کل	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Total	100	100	100	100	100
Calculated chemical composition (%) انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/ کیلوگرم)					
AME (kcal/kg) پروتئین خام (درصد)	3050	3050	3050	3050	3050
Crude protein (%) کلسیم (درصد)	20.50	20.50	20.50	20.50	20.50
Calcium (%) فسفر قابل‌دسترس (درصد)	1	1	1	1	1
Available phosphorus (%) سدیم (درصد)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na (%) متیونین (درصد)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Methionine (%) متیونین +سیستین (درصد)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Methionine+cysteine(%) لیزین (درصد)	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95
Lysine (%) ترئونین (درصد)	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24
Threonine (%) تریپتوفان (درصد)	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Tryptophan (%) تعادل آنیون کاتیون جیره (میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Dietary anion cation balance (meq/kg)	226	226	226	226	226

[۱] ویتامینها و مواد معدنی تامین شده در هر کیلوگرم جیره: ویتامین A: ۱۰۰۰واحد بین المللی، ویتامینD_3 : ۲۵۰۰ واحد بین المللی، ویتامینE : ۱۰ واحد بین المللی، ویتامین B_1: ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_1 : ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_2 : ۴ میلی گرم، ویتامینB3 : ۸ میلی گرم، ویتامینB6 : ۲ میلی گرم، ویتامینB9 : ۰/۵۶ میلی گرم، ویتامین B12: ۰/۰۱۵میلی گرم، ویتامینH2 : ۰/۱۵میلی گرم، کولین کلراید: ۲۰۰ میلی گرم، آهن: ۵۰ میلی گرم، سولفات روی : ۶۰ میلی گرم، سولفات منگنز: ۱۶۰ میلی گرم، ید: ۱میلی گرم، سولفات مس: ۵ میلی گرم، سلنیوم: ۰/۱ میلی گرم.

[1]Provided vitamins and minerals premix per kilogram of diet: vitamin A: 10000 IU; vitamin D_3:2500 IU; vitamin E: 10 IU; vitamin B_1: 2.2 mg; vitamin B_2: 4 mg; vitamin B_3; 8 mg; vitamin B2:4 mg; vitamin B3: 8 mg; vitamin B6: 2mg; vitamin B9: 0.56 mg; vitamin B12: 0.015 mg; vitamin H2: 0.15 mg; cholin chloride: 200 mg; Fe: 50 mg; Zn-sulfate: 60 mg; Mn-sulfate: 160 mg; Iodine: 1 mg; Cu-sulfate: 5 mg; Selenium: 0.1 mg.

جدول ۳- اقلام و ترکیب شیمیایی جیره در دوره پایانی (۲۶-۴۲ روزگی)

Table 3- Ingredients and chemical composition of diets in finisher period (26-42 days)

		درصد(%)			
اقلام خوراکی Feed ingredients	جیره شاهد Control diet	0.25% *Spirulina*	0.5 % *Spirulina*	0.75% *Spirulina*	1% *Spirulina*
دانه ذرت Corn grain	59.27	59.33	59.39	59.44	59.50
کنجاله سویا Soybean meal	32.60	32.27	31.95	31.63	31.30
اسپیرولینا					

Table 3 Continue **ادامه جدول ۳**

Spirulina روغن سویا	0	0.25	0.50	0.75	1
Soybean oil دی‌کلسیم‌فسفات	4.17	4.19	4.21	4.23	4.25
DCP پوسته صدف	1.68	1.69	1.69	1.69	1.69
Oyster shell نمک طعام	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11
Common salt کربنات سدیم	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
$NaHCO_3$ دی‌ال-متیونین	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
DL-methionine ال- لیزین هیدروکلرید	0.23	0.23	0.22	0.22	0.21
L-lysine HCL ال- ترئونین	0	0	0	0	0
L-threonine پری‌میکس ویتامینی[۱]	0.01	0.01	0	0	0
Vitamin premix[1] پری‌میکس معدنی[۱]	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix[1] کوکسیدیواستات	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Coccidiostate جمع کل	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Total	100	100	100	100	100
Calculated chemical composition (%) انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/ کیلوگرم)					
AME (kcal/kg) پروتئین خام (درصد)	3110	3110	3110	3110	3110
Crude protein (%) کلسیم (درصد)	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8
Calcium (%) فسفر قابل‌دسترس (درصد)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Available phosphorus (%) سدیم (درصد)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Na (%) متیونین (درصد)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Methionine (%) متیونین +سیستین (درصد)	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
Methionine+Cysteine (%) لیزین (درصد)	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
Lysine (%) ترئونین (درصد)	1.02	1.02	1.02	1.02	1.02
Threonine (%) تریپتوفان (درصد)	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74
Tryptophan (%) تعادل آنیون کاتیون جیره (میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم)	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
Dietary anion cation balance (meq/kg)	214	214	214	214	214

[1]ویتامینها و مواد معدنی تامین شده در هر کیلوگرم جیره: ویتامین A: ۱۰۰۰واحد بین المللی، ویتامینD_3 : ۲۵۰۰ واحد بین المللی، ویتامینE : ۱۰ واحد بین المللی، ویتامینB_1 : ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_1 : ۲/۲ میلی گرم، ویتامینB_2 : ۴ میلی گرم، ویتامینB3 : ۸ میلی گرم، ویتامینB6 : ۲ میلی گرم، ویتامینB9 : ۰/۵۶ میلی گرم، ویتامینB12 : ۰/۰۱۵میلی گرم، ویتامینH2 : ۰/۱۵میلی گرم، کولین کلراید: ۲۰۰ میلی گرم، آهن: ۵۰ میلی گرم، سولفات روی : ۶۰ میلی گرم، سولفات منگنز: ۱۶۰ میلی گرم، ید: ۱میلی گرم، سولفات مس: ۵ میلی گرم، سلنیوم: ۰/۱ میلی گرم.

[1]Provided vitamins and minerals premix per kilogram of diet: vitamin A: 10000 IU; vitamin D_3:2500 IU; vitamin E: 10 IU; vitamin B_1: 2.2 mg; vitamin B_2: 4 mg; vitamin B_3: 8 mg; vitamin B2:4 mg; vitamin B3: 8 mg; vitamin B6: 2mg; vitamin B9: 0.56 mg; vitamin B12: 0.015 mg; vitamin H2: 0.15 mg; cholin chloride: 200 mg; Fe: 50 mg; Zn-sulfate: 60 mg; Mn-sulfate: 160 mg; Iodine: 1 mg; Cu-sulfate: 5 mg; Selenium: 0.1 mg.

نتایج و بحث

نتایج عملکرد تولید جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های آزمایشی مختلف در شرایط تنش گرمایی، در جداول ۴ الی ۸ ارائه شده است. نتایج جدول عملکرد (جدول ۴) نشان می‌دهد که استفاده از سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا* بر میزان مصرف خوراک در دوره‌های آغازین، میانی، پایانی و در کل دوره تأثیر معنی‌داری نداشته است (P>۰/۰۵). همچنین استفاده از ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E در جیره نیز نتوانست تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک جوجه‌ها داشته باشد. نتایج افزایش وزن جوجه‌ها نشان داد در دوره‌های آغازین (۱۰-۰ روزگی) و رشد (۲۵-۱۱ روزگی)، سطوح مختلف ریزجلبک تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن جوجه‌ها نداشته، ولی در دوره پایانی سطح یک درصد *اسپیرولینا* توانست افزایش وزن جوجه‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری دهد (P <۰/۰۵). استفاده از ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E در جیره نیز نتوانست تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن جوجه‌ها در کل دوره داشته باشد. همانند نتایج افزایش وزن، در دوره های ۱۴-۰ روزگی و ۲۸-۱۵ روزگی، سطوح مختلف ریزجلبک تأثیر معنی‌داری بر ضریب تبدیل خوراک جوجه‌ها نداشت، ولی در دوره پایانی (۴۲-۲۹ روزگی) سطح یک درصد *اسپیرولینا* توانست بازده مصرف خوراک جوجه‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری دهد (P <۰/۰۵). همچنین افزودن سطوح ۰/۵، ۰/۷۵ و یک درصد موجب بهبود بازده مصرف خوراک جوجه‌ها نسبت به گروه شاهد در کل دوره آزمایشی (۴۲-۰ روزگی) گردید (P<۰/۰۱). به‌علاوه استفاده از ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E در جیره نیز موجب کاهش ضریب تبدیل خوراک طی کل دوره در مقایسه با گروه شاهد گردید. در ارتباط با صفت ضریب تبدیل خوراک اگرچه اختلاف آماری معنی‌داری بین سطوح ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد ریزجلبک با ویتامین E مشاهده نگردید، امّا افزودن سطح یک درصد موجب کاهش ضریب تبدیل در مقایسه با جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ویتامین E گردید.

نتایج اثرات سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا* بر خصوصیات لاشه و برخی از اندام‌های داخلی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش گرمایی در جدول ۶ ارائه شده است. همان‌طوری که در این جدول مشاهده می‌شود، بازده لاشه و ران جوجه‌ها تحت تأثیر سطوح مختلف *اسپیرولینای* جیره قرار نگرفتند، ولی بازده سینه همانند شرایط دمای عادی تحت تأثیر سطوح *اسپیرولینای* جیره قرار گرفت و در سطوح ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد، نسبت به گروه شاهد و ویتامین E به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (P<۰/۰۱). وزن نسبی چربی محوطه بطنی نیز تحت تأثیر سطوح *اسپیرولینا* قرار گرفت و در پرندگان تغذیه شده با سطوح ۰/۷۵ و ۱ درصد، وزن نسبی چربی محوطه بطنی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (P<۰/۰۱). وزن نسبی کبد در پرندگان گروه شاهد نسبت به پرندگان تغذیه شده با سطوح ۰/۵۰، ۰/۷۵ و یک درصد *اسپیرولینا* و همچنین گروه تغذیه شده با ویتامین E به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). نتایج وزن نسبی پانکراس نیز نشان داد که در پرندگان تغذیه شده با سطوح بالای ۰/۲۵ درصد، وزن نسبی پانکراس کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد داشتند، ولی تفاوت با گروه ویتامین E معنی‌دار نبود.

نتایج اثرات سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا* بر ترکیب جمعیت میکروبی روده کور جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج بررسی جمعیت میکروبی روده کور نشان می‌دهد که شمار جمعیت کل، لاکتوباسیل و *اشرشیاکولی* در روده کور جوجه‌های گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵). نتایج اثرات سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جیره جوجه‌های گوشتی بر عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفندی تحت شرایط تنش گرمایی در جدول ۷ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که عیار پادتن بعد از تزریق اول و دوم در هر چهار سطح *اسپیرولینا* به همراه ویتامین E به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد بالا بوده است، اگرچه سطح یک درصد *اسپیرولینا* بالاترین عیار پادتن را در تزریق نوبت اول داشت (P<۰/۰۵).

همان‌گونه که قبلاً نیز اشاره شد، پتانسیل ژنتیکی بالای جوجه های گوشتی صنعتی باعث افزایش رشد روزافزون و در نتیجه، افزایش حساسیت این پرندگان به شرایط پرورش متراکم و تنش‌زا می‌گردد. حال اگر تنش اضافی مانند تنش گرمایی نیز به آن‌ها اضافه شود، مقاومت پرندگان نسبت به عوامل بیماری‌زا را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Havenstein *et al*., 1994). مرغ فاقد غدد عرقی بوده و شش‌ها و کیسه‌های هوایی آن به‌عنوان خنک‌کنندگان تبخیری عمل می‌کنند. به هنگام تنش گرمایی ابتدا مرغ از این سیستم

خنک‌کننده تبخیری استفاده می‌کند و همچنان که دمای محیط افزایش می‌یابد، مصرف خوراک خود را کاهش می‌دهد و از این طریق، بار حرارتی حاصل از متابولیسم مواد خوراکی را کاهش دهد (Altan *et al*., 2003). با افزایش مداوم دمای محیط بخشی از انرژی دریافتی این پرندگان صرف له‌له زدن شده و منجر به کمبود مواد مغذی و در نتیجه، کاهش عملکرد می‌شود. از طرفی، تنش گرمایی و در نتیجه، له‌له زدن و افزایش نرخ تنفس نیاز به فعالیت عضلانی را افزایش و در نتیجه، نیاز به انرژی بیشتر می‌شود. با مقایسه عددی داده‌های جدول‌های عملکرد رشد برای مصرف خوراک، می‌توان دریافت که با قرارگیری پرندگان در معرض تنش های حرارتی مصرف خوراک پرنده‌ها در تمام دوره‌های پرورشی کاهش یافته است اگرچه تفاوت معنی‌دار نبوده است. همین مسئله در رابطه با افزایش وزن پرندگان نیز رخ داده، با این تفاوت که در دوره های پایانی و کل دوره تفاوت قابل توجهی در افزایش وزن پرندگان تغذیه شده با ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در مقایسه با گروه شاهد مشاهده می‌شود، به‌طوری‌که پرندگان تغذیه شده با *اسپیرولینا پلاتنسیس* افزایش وزن بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. همین امر موجب شد تا ضریب تبدیل خوراک مطابق با تغییرات افزایش وزن، تغییر پیدا کرده و ضریب تبدیل خوراک در دوره پایانی و کل دوره، در گروه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی *اسپیرولینا پلاتنسیس* پائین‌تر از گروه شاهد گردد. مطالعات پیشین، تأثیر منفی تنش حرارتی را بر فعالیت آنزیم‌های هضمی دستگاه گوارش بلدرچین‌های ژاپنی گزارش کرده‌اند (Sahin *et al*., 2002). آن‌ها نشان دادند که با به‌وجود آمدن تنش گرمایی، فعالیت آنزیم‌های هضمی پرنده کاهش و حتی بدون توجه به تغییرات مصرف خوراک، قابلیت هضم و جذب مواد مغذی کاهش یافته و عملکرد رشد پرنده مختل می‌شود. حتی در تحقیقات دیگری، نشان داده شده که نفوذپذیری سلول‌های اپیتلیوم روده باریک به آندوتوکسین‌ها در شرایط تنش گرمایی افزایش یافته و این خود یکی از دلایل اصلی کاهش عملکرد رشد در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی است (Nanto Hara *et al*., 2019; Tabler *et al*.,2020; Liu *et al*., 2020;)

بر همین اساس، محققان موفق شدند که با افزودن ترکیبات فیتوژنیک به آب مصرفی پرندگان باعث بهبود عملکرد آنزیم‌های هضمی شده و با بهتر کردن هضم و جذب مواد مغذی، اثرات مخرب تنش حرارتی بر رشد جوجه‌های گوشتی را کاهش دهند (Khosravinia *et al*., 2016). برخی محققان با توجه به مطالعات پیشین توانستند تا با استفاده از ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌عنوان یکی از ترکیبات فیتوژنیک گیاهی اثرات منفی تنش حرارتی بر هضم و جذب مواد مغذی حیوان را کاهش داده و رشد آن را جبران کنند (Mirzaie *et al*., 2017).

در این آزمایش، ضریب تبدیل خوراک و افزایش وزن پرندگان در گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس*، خصوصاً سطوح ۰/۷۵ و یک درصد به‌طور قابل‌توجهی بهتر از گروه‌های دیگر بود. محققان دیگری با دستیابی به عملکرد رشد کاملاً مشابه با تحقیق حاضر بیان داشتند که تأثیر ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر جمعیت میکروبی روده مانند افزایش *لاکتوباسیلوس*ها و کاهش *اشرشیا کولی* موجب بهبود عملکرد پرنده در شرایط تنش حرارتی شده است(Mustafa *et al*., 2021) هم‌چنین حاجاتی و همکاران(Hajati *et al*., 2020) گزارش دادند که استفاده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* در سطح ۰/۵ درصد را می‌توان به‌عنوان جایگزین پروبیوتیک در جیره بلدرچین‌های تخم‌گذار تحت تنش گرمایی در نظر گرفت. ترکیب جمعیت میکروبی روده پرندگان رابطه مستقیمی با هضم و جذب مواد مغذی و در نتیجه، رشد و افزایش وزن بدن جوجه‌ها دارد، بنابراین افزایش *لاکتوباسیلوس*ها و کاهش *اشرشیا کولی* می‌تواند به‌طور غیرمستقیم راندمان هضم و جذب مواد مغذی را در روده بهبود دهد. اگرچه در آزمایش حاضر، شمار جمعیت کل، لاکتوباسیل و *اشرشیاکولی* در جوجه‌های گروه‌های مختلف تحت تنش تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، ولی شمار لاکتوباسیل‌ها در جوجه‌های تغذیه شده با ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* به‌طور عددی بیشتر از جوجه‌های گروه شاهد بود.

قبلاً اشاره گردید که تنش گرمایی، می‌تواند با تحت تأثیر قرار دادن پاسخ ایمنی یا تأثیرات منفی بر خصوصیات فیزیولوژیکی پرنده، عملکرد تولید آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (Havenstein *et al*., 1994). نشان داده شده که ایمولینا، پلی ساکاریدی با وزن مولکولی بالا در عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا* است که می‌تواند باعث افزایش ایمنی اختصاصی گردد (Lobner *et al*., 2008) و *اسپیرولینا* قادر است با افزایش فعالیت‌های سیستم فاگوسیتی، سیستم ایمنی را در جوجه‌ها بهبود دهد (Zeweil *et al*., 2016) گزارش کردند که استفاده از *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند باعث افزایش تیتر ایمنوگلوبولین G در جوجه‌های گوشتی شود. همچنین گزارش شد که استفاده از *اسپیرولینا* در جیره جوجه‌های گوشتی، باعث افزایش تعداد لوکوسیت‌ها و کاهش درصد تلفات در جوجه‌های گوشتی گردید(Lokapirnasaria *et al*., 2016). جهت ارزیابی تأثیر *اسپیرولینا* بر تنش گرمایی، اثر سطوح ۰/۵ و یک درصد *اسپیرولینا* به همراه ۰/۷۵درصد ویتامین E بررسی و گزارش شد که در شرایط تنش گرمایی، *اسپیرولینا* می‌تواند هم عملکرد و هم پاسخ ایمنی جوجه‌ها را نسبت به ویتامین E بهبود دهد (Zeweil *et al*., 2016).

با توجه به گزارش‌های مربوط به اثرات منفی تنش حرارتی بر آنزیم‌های گوارشی و سیستم ایمنی پرنده و تلاش محققان برای غلبه

بر این اثرات سوء با استفاده از ترکیبات فیتوژنیک (Khosravinia *et al.*, 2016) محققان مطالعه حاضر را به این نتیجه رسانده که احتمالاً بهبود بافت مخاطی و سیستم ایمنی روده و شاید افزایش ترشح آنزیم‌های گوارشی که در نهایت، می‌تواند منجر به افزایش قابلیت استفاده از مواد مغذی جیره گردد، از مهم‌ترین عوامل بهبود عملکرد پرندگان در شرایط تنش حرارتی باشند. از سوی دیگر، با توجه به اینکه ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* حاوی اسید آمینه‌ها و ترکیبات دیگر با خواص گوناگون است، این گمان نیز پیش می‌آید که احتمالاً برخی از ترکیبات آمینی غیر پروتئینی در محتویات *اسپیرولینا* وجود داشته باشند که بتوانند باعث افزایش رشد و تکثیر سلول‌های روده شده باشد. در این آزمایش، کاهش ضریب تبدیل خوراک در اثر افزایش وزن و ثبات مصرف خوراک احتمالا ناشی از بهبود قابلیت هضم و جذب مواد مغذی و افزایش بهره‌وری و استفاده پرندگان از این ترکیبات مصرف شده توسط خوراک شده است. به عبارت بهتر، پرندگان در دوره پایانی و با افزایش مصرف ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* در جیره از فواید ضد میکروبی و حتی سیستم ایمنی آن بهتر بهره‌مند شده و در کنار افزایش قدرت هضم، جذب و متابولیسم مواد مغذی توانسته‌اند تا بر اثرات منفی تنش حرارتی فائق آمده و بتوانند تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای را در شاخص‌های افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با شاهد نشان دهند. مکانیسم احتمالی دیگر در ارتباط با نقش مثبت *اسپیرولینا* بر عملکرد را می‌توان به تأمین انرژی سوخت و ساز، اسیدهای چرب ضروری، اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها و مواد معدنی که قابلیت گوارش بسیار بالایی داشته و در مقایسه با اغلب منابع پروتئین گیاهی از کمیت بالاتری برخوردار هستند، ارتباط داد (Abdel-Moneim *et al.*, 2022).

ارزیابی خصوصیات لاشه پرندگان تغذیه شده با ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* نشان داد که پرندگان مربوط به تیمارهای آزمایشی ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* نه‌تنها در مقایسه با گروه شاهد، بلکه در مقایسه با پرندگان تغذیه شده با ویتامین E نیز بازده سینه بیشتر و چربی محوطه بطنی کمتری را نشان داده‌اند. اگرچه نتایج بازده لاشه و بازده ران پرندگان تحت تنش حرارتی در مقایسه با شاهد و تیمار حاوی ویتامین E معنی‌دار نبود، امّا میانگین بازده هرکدام از این شاخص‌ها در گروه‌های تغذیه شده با ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* بیشتر از دو گروه مذکور بود. بنابراین، ریزجلبک *اسپیرولینا* و به عبارت بهتر، اثرات فیزیولوژیکی و شیمیایی ترکیبات موجود در این ماده غذایی ارزشمند موجب شد تا قابلیت استفاده از مواد مغذی موجود در خوراک حتی در شرایط تنش گرمایی نیز بهبود یافته و متعاقباً موجب بهبود برخی از پارامترهای عملکردی حیوان گردید. سوگیهارتو و همکاران (Sugiharto *et al.*, 2018) عدم تأثیر افزودن سطح یک درصد جلبک *اسپیرولینا* را بر صفات لاشه گزارش کردند.

جدول ٤- تأثیر سطوح مختلف *اسپیرولینا* پلاتنسیس بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی

Table 4- Effects of different levels of *Spirulina platensis* on growth performance of broiler chickens under heat stress

سطح *اسپیرولینا* (درصد) *Spirulina* level (%)	۱-۱۴ روزگی 1-14 days	۱۵-۲۸ روزگی 15-28 days	۲۹-۴۲ روزگی 29-42 days	۱-۴۲ روزگی 1-42 days
	مصرف خوراک (گرم/پرنده) Feed intake (g/bird)			
شاهد (۰) Control (0)	485.8	1539.1	2100.1	4125.0
0.25	482.0	1505.7	2093.3	4078.0
0.5	477.5	1515.9	2099.9	4093.3
0.75	477.0	1507.9	2083.1	4068.0
1	482.6	1534.5	2059.3	4076.4
Vit E	486.1	1519.1	2076.8	4082.0
SEM	2.83	16.23	23.2	26.69
P-value	0.135	0.617	0.143	0.21
	افزایش وزن بدن (گرم/پرنده) Weight gain (g/bird)			
شاهد (۰) Control (0)	318.5	946.6	1034.5[b]	2296.6[b]
0.25	315.8	954.5	1079.5[ab]	2349.8[ab]
0.5	323.5	956.8	1073.9[ab]	2354.2[a]
0.75	323.8	957.0	1073.7[ab]	2354.5[a]
1	331.3	962.1	1110.8[a]	2404.0[a]
Vit E	330.6	947.1	1069.0[ab]	2346.8[ab]
SEM	7.6	8.28	14.7	17.95
P-value	0.494	0.161	0.041	0.045

	ضریب تبدیل غذایی Feed conversion ratio			
شاهد (۰) Control (0)	1.52	1.62	2.03[a]	1.79[a]
0.25	1.52	1.58	1.94[ab]	1.74[b]
0.5	1.48	1.59	1.96[ab]	1.74[b]
0.75	1.47	1.58	1.94[ab]	1.73[b]
1	1.46	1.59	1.86[b]	1.70[c]
Vit E	1.47	1.60	1.94[ab]	1.74[b]
SEM	0.021	0.019	0.033	0.009
P-value	0.202	0.548	0.013	0.011

در هر ستون، میانگین اعدادی که حروف نامشابه دارند از نظر آماری با هم تفاوت معنی داری دارند(P<0.05)

In each column, mean of non-identical alphanumeric characters are statistically significant (P<0.05).

جدول ۵- تأثیر سطوح مختلف *اسپیرولینا* پلاتنسیس بر جمعیت میکروبی روده کور جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی

Table 5- Effects of different levels of *Spirulina platensis* on cecal microflora of broiler chickens under heat stress

سطح اسپیرولینا *Spirulina* level (%)	جمعیت کل باکتری Total bacterial count CFU/ml	*لاکتوباسیلوس* (واحد تشکیل کلنی/میلی‌لیتر) *Lactobacillus* CFU/ml	*اشرشیاکولی* (واحد تشکیل کلنی/میلی‌لیتر) *E. Coli* CFU/ml
شاهد (۰) Control (0)	7.35	7.24	7.18
0.25	7.29	7.28	7.20
0.5	7.29	7.51	7.20
0.75	7.28	7.38	7.16
1	7.28	7.28	7.13
Vit E	7.27	7.30	7.18
SEM	0.029	0.094	0.039
P-value	0.387	0.49	0.770

در هر ستون، میانگین اعدادی که حروف نامشابه دارند از نظر آماری با هم تفاوت معنی داری دارند(P<0.05)

In each column, mean of non-identical alphanumeric characters are statistically significant (P<0.05).

جدول ٦- تأثیر سطوح مختلف *اسپیرولینا* پلاتنسیس بر خصوصیات لاشه جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی (بر اساس وزن بدن نسبی)

Table 6- Effects of different levels of *Spirulina platensis* on carcass characteristics of broiler chickens under heat stress (Based on relative body weight)

سطح *اسپیرولینا* (درصد) *Spirulina* level (%)	لاشه Carcass	ران Thigh	سینه Breast	کبد Liver	پانکراس Pancreas	چربی بطنی Abdominal fat
شاهد (۰) Control (0)	62.26	20.78	24.03[b]	2.11[a]	0.256[a]	1.70[a]
0.25	62.42	21.87	24.59[ab]	1.98[ab]	0.235[ab]	1.62[ab]
0.5	63.79	21.43	25.94[a]	1.84[b]	0.217[b]	1.47[ab]
0.75	63.66	21.12	25.59[a]	1.75[b]	0.220[b]	1.36[b]
1	64.31	21.36	26.08[a]	1.75[b]	0.205[b]	1.39[b]
Vit E	63.44	21.65	23.97[b]	1.80[b]	0.252[ab]	1.45[ab]
SEM	0.588	0.289	0.347	0.059	0.009	0.062
P-value	0.137	0.124	0.007	0.011	0.011	0.002

در هر ستون، میانگین اعدادی که حروف نامشابه دارند از نظر آماری با هم تفاوت معنی داری دارند(P<0.05)

In each column, mean of non-identical alphanumeric characters are statistically significant (P<0.05).

جدول ۷- تأثیر سطوح مختلف *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفندی در جوجه‌های گوشتی پرورش داده شده تحت تنش گرمایی

Table 7- Effects of different levels of *Spirulina platensis* on antibody titer against SRBC of broiler chickens reared under heat stress

سطح *اسپیرولینا* (درصد) *Spirulina* level (%)	بعد از تزریق اوّل After the first injection	بعد از تزریق دوّم After the second injection
شاهد (۰) Control (0)	2.83[c]	1.33[c]
0.25	3.83[b]	2.50[b]
0.5	3.83[b]	3.67[ab]
0.75	3.67[b]	4.00[a]
1	4.50[a]	3.92[a]
Vit E	3.67[b]	3.67[ab]
SEM	0.217	0.405
P-value	0.001	0.008

در هر ستون، میانگین اعدادی که حروف نامشابه دارند از نظر آماری با هم تفاوت معنی داری دارند(P<0.05)

In each column, mean of non-identical alphanumeric characters are statistically significant (P<0.05).

تویومیزو و همکاران(Toyomizu *et al*., 2001) اثر سه سطح صفر، ۴ و ۸ درصد *اسپیرولینا* را در جوجه‌های گوشتی نر ۲۱ روزه آزمایش کردند و عدم تغییر وزن بدن، کبد، چربی محوطه بطنی، کلیه و ماهیچه سینه را مشاهده کردند. پارک و همکاران (Park *et al*., 2018) نیز با بررسی صفات لاشه به این نتیجه رسیدند که وزن نسبی کبد، طحال، سنگدان، بورس فابریسیوس و چربی محوطه بطنی تحت تأثیر سطوح مختلف جلبک *اسپیرولینا* قرار نگرفت.

نتیجه‌گیری کلی

نتیجه‌گیری شد که در شرایط تنش گرمایی، سطوح مختلف ریزجلبک *اسپیرولینا* و ویتامین E، تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک کل دوره نداشته، ولی در این شرایط سه سطح ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱درصد توانستند افزایش وزن جوجه‌ها را نسبت به گروه شاهد بهبود معنی داری دهند. استفاده از ۱۵۰ گرم در تن ویتامین E نتوانست تأثیر معنی داری بر افزایش وزن جوجه‌ها در کل دوره داشته باشد، ولی همه سطوح *اسپیرولینا* توانستند ضریب تبدیل خوراک را نسبت به گروه شاهد کاهش دهند. بازده سینه پرندگان تغذیه شده با ۰/۷۵ و یک درصد *اسپیرولینا* نسبت به گروه شاهد بهبود معنی‌داری داشتند و همچنین با افزایش اسپیرولینا، وزن نسبی چربی محوطه بطنی جوجه ها به‌طور خطی کاهش یافت. همچنین پاسخ سیستم ایمنی هومورال در هر چهار سطح *اسپیرولینا* به همراه ویتامین E به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد بالا بوده است، اگرچه سطح یک درصد *اسپیرولینا* بالاترین عیارپادتن را داشت.

References

1. Abdel-Moneim, A. M. E.; Shehata, A. M.; Selim, D. A.; El-Saadony, M. T.; Mesalam, N. M., & Saleh, A. A. (2022). *Spirulina platensis* and biosynthesized selenium nanoparticles improve performance, antioxidant status, humoral immunity and dietary and ileal microbial populations of heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, *104*, 103195. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103195.
2. Altan, Ö. Z. G. E., Pabuçcuoğlu, A., Altan, A., Konyalioğlu, S., & Bayraktar, H. (2003). Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science*, *44*, 545-550. https://doi.org/10.1080/00071660310001618334.
3. Al-Batshan, H. A., Al-Mufarrej, S. I., Al-Homaidan, A. A., & Qureshi, M. A. (2001). Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *23*, 281-289. https://doi.org/10.1081/iph-100103866.
4. Ansari, M. S., Hajati, H., Gholizadeh, F., Soltani, N., Alavi, S. M. (2018). Effect of different levels of *spirulina platensis* on growth performance, intestinal morphology, gut microflora, carcass characteristics and some blood parameters in broiler chickens. *Journal of Phycological Research*, 2(2), 186-197.
5. Baojiang, G. (1994). Study on effect and mechanism of polysaccharides of *Spirulina platensis* on body immune functions improvement. Book of Abstracts. *In Second Asia Pacific Conference on Algal Biotechnology*, 24, 25-27.
6. Belay, T., & Teeter, R. G. (1993). Broiler water balance and thermobalance during thermoneutral and high ambient temperature exposure. *Poultry Science*, *72*, 116-124. https://doi.org/10.3382/ps.0720116.
7. Hajati, H., & Zaghari, M. (2019). *Spirulina platensis* in poultry nutrition. *Cambridge Scholars Publishing*, 108-129.
8. Hajati, H., & Zaghari, M. (2019). Effects of *Spirulina platensis* on growth performance, carcass characteristics, egg traits and immunity response of Japanese quails. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *9*, 347-357.
9. Hajati, H., Zaghari, M., & Oliveira, H. (2020). *Arthrospira (spirulina) platensis* can be considered as a probiotic

alternative to reduce heat stress in laying Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *22*(1), 1–8. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0977.

10. Havenstein, G. B., Ferket, P. R., Scheideler, S. E., & Larson, B. T. (1994). Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Science*, 73, 1785–1794. https://doi.org/10.3382/ps.0731785.
11. Kaoud, H. A. (2015). Effect of *Spirulina platensis* as a dietary supplement on broiler performance in comparison with prebiotics. *Scientific Journal of Applied Research*, *1*, 1-6.
12. Khosravinia, H. (2016). Mortality, production performance, water intake and organ weight of the heat stressed broiler chicken given savory (*Satureja khuzistanica*) essential oils through drinking water. *Journal of Applied Animal Research*, *44*, 273-280. https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1031781.
13. Lokapirnasari, W.P., Yulian, A.B., Legowoc, D., & Agustono. (2016). the effect of *Spirulina* as feed additive to myocardial necrosis and leukocyte of chicken with avian influenza (H_5N_1) virus. Infection. *Procedia Chemistry*, *18*(2016), 213–217. https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.033.
14. Liu, G., Zhu, H., Ma, T., Yan, Z., Zhang, Y., Geng, Y., & Shi, Y. (2020). Effect of chronic cyclic heat stress on the intestinal morphology, oxidative status and cecal bacterial communities in broilers. *Journal of Thermal Biology*, *91*, 10261. https://doi: 10.1016/j.jtherbio.2020.102619.
15. Lobner, M., Walsted, A., Larsen, R., Bendtzen, K., & Nielsen, C. H. (2008). Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal of Medicinal Food*, *11*, 2, 313-22. https://doi: 10.1089/jmf.2007.564.
16. Mirzaie, S., Zirak-Khattab, F., Hosseini, S. A., & Donyaei-Darian, H. (2018). Effects of dietary *Spirulina* on antioxidant status, lipid profile, immune response and performance characteristics of broiler chickens reared under high ambient temperature. *Asian-Australas Journal Animal Science*, *31*, 556-563. https://doi:10.5713/ajas.17.0483.
17. Moustaf, E., Walaa, F., Alsanie, A., Nancy, N., Kamel, A., Alaqil, A., & Ahmed, O. (2021). Blue-green algae (*Spirulina platensis*) alleviates the negative impact of heat stress on broiler production performance and redox status. *Animals*, *11*(1243), 1-13. https://doi:10.3390/ani11051243.
18. Nanto-Hara, F., Kikusato, M., Ohwada, S., & Toyomizu, M. (2019). Heat stress directly affects intestinal integrity in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 0190004. https://doi:10.2141/jpsa.0190004.
19. Olfati, A., Mojtahedin, A., Sadeghi, T., Akbari, M., & Martínez-Pastor, F. (2018). Comparison of growth performance and immune responses of broiler chicks reared under heat stress, cold stress and thermoneutral conditions. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(2). https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-12753.
20. Park, J. H., Lee, S. I., & Kim, I. H., (2018). Effect of dietary *Spirulina platensis* on the growth performance, antioxidant enzyme activity, nutrient digestibility, cecal microflora, excreta noxious gas emission, and breast meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 0, 1-9. https://doi:10.3382/ps/pey093.
21. Qureshi, M. A., Garlich, J. D., & Kidd, M. T. (1996). Dietary *spirulina platensis* enhances humoral and cell mediated immune functions in chickens. *Immunopharmacology and Immunological*, *18*, 465-47. https://doi.org/10.3109/08923979609052748.
22. Rawshon J.A.B.M., Rashedunnabi, A., Mahfujur, R., Anwar, H., & Siddiqul, I. (2015). Prebiotic competence of *Spirulina* on the production performance of broiler chickens. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *2*, 304-309. https://doi: 10.5455/javar.2015.b94.
23. Raju, M.V.L.N., Rama, R.S.V., Radhika, K., & Chawak, M.M. (2004). Effects of *Spirulina platensis* or furazolidone on the performance and immune response of broiler chickens fed with aflatoxin contaminated diet. *Indian Journal of Animal Nutrition*, *21*, 40–44.
24. Sahin, K., Kucuk, O., Sahin, N., & Gursu, M. F. (2002). Optimal dietary concentration of vitamin E for alleviating the effect of heat stress on performance, thyroid status, ACTH and some serum metabolite and mineral concentrations in broilers. *Veterinary Medicine*, 110–116. https://doi.org/ 10.17221/5813-Vet Med.
25. Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., & Widiastuti, E. (2018). Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks. *South African Journal of Animal Science*, *48*, 98-107.http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v48i1.12.
26. Tabler, T. W., Greene, E. S., Orlowski, S. K., Hiltz, J. Z., Anthony, N. B., & Dridi, S. (2020). Intestinal barrier integrity in heat-stressed modern broilers and their ancestor wild jungle fowl. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 249. https://doi.org/ 10.3389/fvets.2020.00249
27. Thaxton, P., Sadler, C. R., & Glick, B. (1968). Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. *Poultry Science*, 47, 264-266. https://doi.org/10.3382/ps.0470264.
28. Toyomizu M, Sato, Taroda H, Kato T & Akiba Y. (2001). Effects of dietary *Spirulina* on meat colour in muscle of broiler chickens. *British Poultry Science*, *42*, 197-202. https://doi.org/10.1080/00071660120048447.
29. Yusuf, Mohamed S., Marwa A. Hassan, Mohamed M. Abdel-Daim, Adel S. El Nabtiti, Ali Meawad Ahmed, Sherief A. Moawed7, Ahmed Kamel El-Sayed8 & Hengmi Cui. (2016). Value added by *Spirulina platensis* in two different diets on growth performance, gut microbiota, and meat quality of Japanese quails. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1287-1293.

30. Zeweil H.; Abaza, I. M.; Zahran, S. M.; Ahmed, M. H., Haiam M. Aboul_Ela & Asmaa, A. S. (2016). Effect of *Spirulina platensis* as dietary supplement on some biological traits for chickens under heat stress condition. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, 6,* 2016, 08-12.

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 203-220

Determining the Bioavailability Percentage of Bone Ash Phosphorus Compared to Monocalcium Phosphate and Its Effect on Performance, Bone Quality and Phosphorus Digestibility in Broilers

Mohammad Sedghi [1*], Zahra Sarrami [2], Razieh Ghasemi [2] and Mehdi Zanghae [3]

1 and 2- Associate Professor and M.Sc., Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, respectively.
3- Phd Student., Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author's Email: mo.sedghi@iut.ac.ir

Received: 03-01-2023
Revised: 28-02-2023
Accepted: 01-03-2023
Available Online: 01-03-2023

How to cite this article:
Sedghi, M., Sarrami, Z., Ghasemi, R., & Zanghae, M. (2023). Determining the bioavailability percentage of bone ash phosphorus compared to monocalcium phosphate and its effect on performance, bone quality and phosphorus digestibility in broilers. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 203-220. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83152.1156

Introduction: Phosphorus (P) and calcium (Ca) are macro-minerals for normal growth and development. Phosphorus plays a vital role in muscle function, enzyme activity, lipid metabolism, bone mineralization, maintaining osmotic and acid-base balance, energy metabolism, amino acid metabolism, and protein synthesis. In addition, in layers, P is required to replace tissue metabolites such as nucleotides and phospholipids, maintain skeletal integrity, and produce the egg. Also, Ca is essential for eggshell formation, coagulation, muscle, and nerve function. Bone is a rich source of P and Ca, which can be converted into bone ash (BA) as an organic source to supply P and Ca. Today, BA has been introduced as a suitable alternative for mineral sources of P and Ca in the poultry industry. Barshan *et al* reported in 2019 that the use of BA compared to dicalcium phosphate caused a significant increase in weight in broilers. The purpose of this study was to use bone ash as a dietary P source and to investigate the P bioavailability in it compared to monocalcium phosphate (MCP) as a standard source.

Materials and Methods: 350 one-day-old broilers were used in a completely randomized design with 7 treatments and 5 repetitions. The dietary treatments were: 1) basic diet containing 0.11% of available P; 2, 4, 3) supplementing the basic diet with 0.05, 0.1, and 0.15% P from MCP source; 5, 6, 7) supplementing the basic diet with 0.05, 0.1, and 0.15% P from BA source. All experimental diets contained 0.78% Ca. At the end of the experiment, the P bioavailability in the BA was obtained based on the P consumed in relation to the daily weight gain and tibia bone ash by the slope-ratio method. Also, the investigated parameters such as digestibility and antibody titer against sheep red blood cells (SRBC) were analyzed in a factorial design.

Results and Discussion: The results showed that based on the weight gain in the grower (10 to 25 days) and finisher (26 to 35 days) periods, the bioavailability of P in BA was 82.37% and 93.24%, respectively. Therefore, it can be concluded that with the increase in the consumption time of BA, its P bioavailability has also increased and it has been able to compensate for the lack of growth well and almost similar to monocalcium phosphate. Also, based on the percentage of ash and P of tibia bone, the P bioavailability was 92.86% and 96.39%, respectively.

The factorial analysis of digestibility results also showed that by increasing the level of P in diet and using MCP, the percentage of dry matter digestibility increases significantly ($P<0.05$). Also, the percentage of P digestibility increased numerically with the increase in diet P and the use of BA. Also, factorial analysis of the data related to the production of antibody titer against sheep red blood cells, we observed that the only significant difference in the main effects was for the total antibody titer and IgG in the secondary response; So

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83152.1156

that the antibody titer produced in the secondary response was significantly higher in chickens fed with monocalcium phosphate than in chickens fed with bone ash (P<0.05). The results of the bone quality test showed that the shear and tensile stress for the tibia was significantly higher in chickens fed with 0.26% P (P<0.05); but there was no significant difference between chickens fed with MCP and BA. An increase in tensile and shear stress means that more force is required to break these bones, which indicates the greater strength of these bones. Measuring the percentage of ash and phosphorus (P) in tibia bones showed that as the dietary phosphorus level increased, the percentage of ash and phosphorus in the tibia also increased significantly (P<0.05). Additionally, using monocalcium phosphate (MCP) in the diet resulted in a significant increase in tibia phosphorus (P<0.05); however, there was no significant difference in the percentage of tibia bone ash. Given the limited availability and high cost of phosphorus and calcium mineral resources, it is essential to find suitable alternatives. Bone ash (BA) is a rich source of phosphorus and calcium, which can be used as an organic source to supply these minerals in industrial poultry diets. Consistent with our results, Van Haren et al. reported that BA can compensate for growth deficits in broiler chickens, similar to diets supplemented with dicalcium phosphate (DCP) and MCP, compared to diets without a phosphorus source.

Conclusion: In general, according to the results, it can be concluded that the bioavailability of P in BA is 92 to 96% compared to MCP. This result shows the good ability of BA to replace mineral sources of P. Also, since the absorbability of MCP is higher than dicalcium phosphate (DCP), it can be concluded that BA can have the same efficiency as DCP and be introduced as a substitute in the poultry industry.

Keywords: Bioavailability, Bone ash, Bone quality, Digestibility, Phosphorus

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۲۰-۲۰۳

تعیین درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم فسفات و تأثیر آن بر عملکرد، کیفیت استخوان و قابلیت هضم فسفر در جوجه‌های گوشتی سویه آرین

محمد صدقی[1*]، زهرا صرّامی[2]، راضیه قاسمی[2] و مهدی زنقایی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۵

چکیده

استخوان منبع سرشار از فسفر و کلسیم است که میتوان طی فرآیندهایی آن را به خاکستر استخوان تبدیل کرد. هدف از این مطالعه استفاده از خاکستر استخوان به‌عنوان منبع فسفر و بررسی درصد زیست‌فراهمی فسفر موجود در آن بود. برای این منظور، از ۳۵۰ قطعه جوجه‌گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و پنج تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) جیره پایه حاوی ۰/۱۱ درصد فسفر قابل دسترس؛ ۲، ۳ و ۴) مکمل کردن جیره پایه با ۰/۰۵ و ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد فسفر از منبع مونوکلسیم فسفات؛ ۵، ۶ و ۷) مکمل کردن جیره پایه با ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۱۵ درصد فسفر از منبع خاکستر استخوان. درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان براساس فسفر مصرفی نسبت به افزایش وزن روزانه و خاکستر استخوان با روش نسبت شیب خط به‌دست آمد. نتایج نشان داد که براساس افزایش وزن پرنده، فسفر خاکستر استخوان در دوره رشد و در دوره پایانی به‌ترتیب ۸۲/۳۷ درصد و ۹۳/۲۴ درصد اثربخشی زیستی داشته است. براساس نتایج حاصل از عملکرد و افزایش درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان در دوره پایانی، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان مصرف خاکستر استخوان، زیست‌فراهمی فسفر آن نیز افزایش یافته و توانسته است کمبود رشد اولیه را جبران کند. همچنین، براساس درصد خاکستر و فسفر استخوان درشت‌نی، قابلیت زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم‌فسفات به‌ترتیب ۹۲/۸۶ و ۹۶/۳۹ درصد بود. آنالیز فاکتوریل نتایج قابلیت هضم نشان داد که با افزایش سطح فسفر خوراک و استفاده از مونوکلسیم‌فسفات، درصد قابلیت هضم ماده خشک خوراک به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که قابلیت زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم فسفات ۹۲ تا ۹۶ درصد است. این نتیجه بیانگر قابلیت خوب خاکستر استخوان برای استفاده به‌عنوان منبع معدنی فسفر و کلسیم است.

واژه‌های کلیدی: خاکستر استخوان، فسفر، قابلیت زیست‌فراهمی، قابلیت هضم، کیفیت استخوان

مقدمه

فسفر دومین عنصر معدنی مورد نیاز در بدن پرندگان و یکی از اجزای ضروری در جیره‌های طیور تجاری به حساب می‌آید. این عنصر در فرآیندهای زیادی مانند حرکت ماهیچه‌ها، عملکرد آنزیم‌ها، متابولیسم چربی‌ها، استحکام استخوان، حفظ فشار اسمزی بدن و متابولیسم انرژی شرکت می‌کند (Suttle, 2010). علاوه‌براین، فسفر در پرندگان برای جایگزینی متابولیت‌های بافتی مانند نوکلئوتیدها و فسفولیپیدها، حفظ یکپارچگی اسکلتی و تولید تخم مورد نیاز است (Li *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). تقریباً ۷۰ درصد فسفر موجود در غلات به‌شکل فیتات است (Haug *et al.*, 1983). اسید فایتیک موجود در غلات جیره‌ها باعث ایجاد محدودیت در زیست‌فراهمی عناصر معدنی می‌شود؛ زیرا فیتات عناصری مانند فسفر و کلسیم را باند می‌کند و آن‌ها را از دسترس پرنده خارج می‌کند (Cowieson *et al.*, 2004) و این امر باعث افت تولید و کاهش عملکرد می‌شود (Cowieson *et al.*, 2004). امروزه برای جبران این کمبود دو راهکار دنبال می‌شود: ۱) استفاده از آنزیم فیتاز در جیره؛ ۲) افزودن منابع معدنی فسفر و کلسیم مثل دی‌کلسیم فسفات و کربنات. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که منابع معدنی فسفات که در دنیا وجود دارند، رو به اتمام است و از طرف دیگر، حدود ۵۰ درصد از

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mo.sedghi@iut.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83152.1156

فسفات مصرفی در بخش خوراک دام و طیور، مربوط به بخش طیور است. به همین دلیل، ما نیاز به جایگزین کردن منابع فسفر داریم. استخوان یکی از منابع سرشار از فسفر و کلسیم است که می‌توان طی فرآیندهایی مانند چربی و ژلاتین‌زدایی و خاکستر کردن، آن‌ها را به خاکستر استخوان به‌عنوان یک منبع آلی برای تأمین فسفر و کلسیم جیره، تبدیل کرد. امروزه، خاکستر استخوان به‌عنوان جایگزینی مناسبی برای منابع معدنی فسفر و کلسیم در صنعت طیور معرفی شده است.

بارشان و همکاران (Barshan *et al.*, 2019) در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که استفاده از خاکستر استخوان نسبت به دی‌کلسیم فسفات در جوجه‌های گوشتی باعث افزایش معنادار وزن در دوره آغازین شد و همچنین در کل دوره نیز وزن در جوجه‌های تغذیه شده با خاکستر استخوان به‌صورت عددی افزایش یافت. این امر نشان می‌دهد که خاکستر استخوان می‌تواند جایگزین مناسبی برای منابع معدنی فسفر و کلسیم باشد. نکته حائز اهمیت این است که در محتوای فسفر و قابلیت هضم خاکستر استخوان، تنوع قابل توجهی وجود دارد که به شرایط شیمیایی و ترموفیزیکی اعمال شده در طول فرآیند بستگی دارد (Barshan *et al.*, 2019). ون‌هارن و همکاران (Van Harn *et al.*, 2017) در سال ۲۰۱۷ اشاره کردند که قابلیت هضم فسفر خاکستر استخوان کمتر از فسفر فسفات معدنی است ؛ امّا با این وجود، احتمال افزایش قابلیت هضم فسفر را در طی فرآیند ژلاتین‌زدایی پیشنهاد کردند؛ به همین دلیل می‌توان گفت که درصد زیست‌فراهمی فسفر موجود در خاکستر استخوان هنوز در هاله‌ایی از ابهام است. بنابراین، هدف از این مطالعه استفاده از خاکستر استخوان چربی و ژلاتین‌زدایی شده به‌عنوان منبع فسفر جیره و بررسی درصد زیست‌فراهمی فسفر موجود در آن در برابر مونوکلسیم‌فسفات است.

مواد و روش‌ها

۱. پرندگان و تیمارهای‌آزمایشی

به‌منظور انجام این آزمایش از ۳۵۰ قطعه جوجه‌گوشتی یک روزه نژاد آرین در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و پنج تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار با میانگین وزنی ۳۸/۸ گرم استفاده شد. پرندگان جیره‌های آزمایشی را طی دو دوره رشد (۱۰ تا ۲۵ روز) و پایانی (۲۶ تا ۳۵ روز) مصرف کردند. جیره‌های استفاده شده تأمین‌کننده احتیاجات مواد مغذی پرنده (به غیر از فسفر) بر مبنای توصیه کاتالوگ جوجه گوشتی آرین بود (جداول ۱ و ۲). به منظور فرموله کردن جیره‌ها، ابتدا مواد خوراکی به‌منظور تعیین درصد فسفر کل آنالیز شدند و جیره‌ها فرموله شدند. فسفر مواد خوراکی نیز تعیین و در جدول ۱ گزارش شد. میزان مواد مغذی (آسیدهای آمینه) جیره‌های پایانی (جدول ۲) براساس نیاز جوجه گوشتی آرین در سن ۲۶ روزگی تغییر کرد؛ امّا درصد فسفر و کلسیم ثابت ماند (درصد کلسیم و فسفر در جیره‌های رشد و پایانی مشابه بود). درصد کلسیم در تمامی تیمارهای آزمایشی یکسان و به‌میزان ۰/۷۸ درصد بود. تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بودند:

۱. جیره پایه داری کمبود فسفر و فاقد منبع فسفاته (۰/۱۱ درصد فسفر قابل دسترس)
۲. جیره پایه + ۰/۰۵ درصد فسفر از منبع مونوکلسیم‌فسفات (۰/۱۶ درصد فسفر قابل دسترس)
۳. جیره پایه + ۰/۱ درصد فسفر از منبع مونوکلسیم فسفات (۰/۲۱ درصد فسفر قابل دسترس)
۴. جیره پایه + ۰/۱۵ درصد فسفر از منبع مونوکلسیم فسفات (۰/۲۶ درصد فسفر قابل دسترس)
۵. جیره پایه + ۰/۰۵ درصد فسفر از منبع خاکستر استخوان (۰/۱۶ درصد فسفر قابل دسترس)
۶. جیره پایه + ۰/۱ درصد فسفر از منبع خاکستر استخوان (۰/۲۱ درصد فسفر قابل دسترس)
۷. جیره پایه + ۰/۱۵ درصد فسفر از منبع خاکستر استخوان (۰/۲۶ درصد فسفر قابل دسترس)

مونوکلسیم فسفات استفاده شده در این طرح از شرکت ایران فسفات تهیه شد و قابلیت زیست‌فراهمی آن براساس ادعای شرکت تولیدکننده در نظر گرفته شد (۲۲ درصد فسفر و ۱۷ درصد کلسیم). همچنین خاکستر استخوان استفاده شده در این مطالعه از شرکت الماس نوین شرق تهیه شد. در این شرکت، خاکستر استخوان از ضایعات کشتارگاهی و مراکز بسته‌بندی گوشت تهیه می‌شود. برای این منظور، ضایعات استخوانی جمع‌آوری شده و به کارخانه منتقل می‌شود؛ سپس استخوان‌ها طی دو مرحله پخت، چربی زدایی و ژلاتین‌زدایی می‌شوند و برای از دست دادن رطوبت به اتاقک‌های خشک‌کن منتقل می‌شوند. پس از خشک شدن به داخل کوره منتقل شده تا در دمای بالا عملیات سوخن صورت گیرد. پس از سوختن و خنک شدن استخوان‌ها خاکستر شده، آسیاب و بسته بندی می‌شوند. براساس آنالیز آزمایشگاهی خاکستر استخوان حاوی ۳۶ درصد کلسیم و ۱۷ درصد فسفر است.

مدت زمان آزمایش از ۱۰ تا ۳۵ روزگی بود و جیره‌های آزمایشی طی دو دوره ۱۰ تا ۲۵ و ۲۶ تا ۳۵ روزگی به‌صورت دسترسی آزاد در اختیار پرندگان قرار گرفت. لازم به ذکر است که پرندگان از سن یک تا نه روزگی با جیره استاندارد تغذیه شدند. پرندگان در سن ۱۰، ۲۵ و ۳۵ روز به‌صورت انفرادی وزن شدند و میانگین افزایش وزن روزانه، میانگین خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک برای هر دوره پرورشی محاسبه شد. همچنین، تعداد تلفات در هر دوره ثبت شد و ضریب تبدیل خوراک براساس تلفات تصحیح شد؛ امّا از آنجایی که تعداد تلفات کم بود، آنالیز آماری برای آن صورت نگرفت.

جدول ۱- مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی از ۱۰ تا ۲۵ روزگی (گرم/کیلوگرم جیره)

Table 1- Food ingredients and nutrients of experimental diets from 10 to 25 days (g/kg)

ترکیب جیره Diet composition	تیمار ۱ T1	تیمار ۲ T2	تیمار ۳ T3	تیمار ۴ T4	تیمار ۵ T5	تیمار ۶ T6	تیمار ۷ T7
ذرت Corn (CP= 7.6%)	625.7	623.0	620.9	617.8	625.9	625.6	624.8
سویا Soybean meal (CP= 43.0%)	326.5	327.0	327.0	328.0	326.0	326.0	326.5
روغن سویا Soy oil	14.2	15	15.8	16.8	14.3	14.4	14.5
خاکستر استخوان Bone ash (P=17%, Ca=36%)	0.0	0.0	0.0	0.0	3.1	6	9
مونوکلسیم فسفات MCP (P=22%, Ca=17%)	0.0	2.4	4.7	6.9	0.0	0.0	0.0
کربنات کلسیم Limestone	17.4	16.4	15.4	14.3	14.5	11.8	9.0
جوش‌شیرین $NaHCO_3$	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
نمک طعام Common salt	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
DL-متیونین DL-methionine	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
لیزین هیدروکلراید L-lysine-HCl	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
L-ترئونین L-threonine	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
کولین کلراید Choline chloride	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
مکمل ویتامینی [۱] Vitamins premix [1]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
مکمل معدنی [۲] Mineral premix [2]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
آنالیز مواد مغذی Nutrient analysis							
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم) ME (kcal/kg)	2950	2950	2950	2950	2950	2950	2950
پروتئین خام (٪) Crude protein (%)	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08	20.08
لیزین قابل هضم (٪) Digestible lysine (%)	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07
متیونین قابل هضم (٪) Digestible Methionine (%)	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
متیونین+سیستئین قابل هضم (٪) Digestible Met+Cys (%)	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
ترئونین قابل هضم (٪) Digestible threonine (%)	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72	0.72
کلسیم (٪) Calcium (%)	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
فسفر کل آنالیز شده (٪) Total phosphorus analyzed (%)	0.25	0.30	0.35	0.40	0.31	0.36	0.41
فسفر قابل دسترس (٪) Available phosphorus (%)	0.11	0.16	0.21	0.26	0.16	0.21	0.26

[۲] مکمل ویتامینی تأمین‌کننده مقادیر زیر در هر کیلوگرم جیره بود: ویتامین A 12000 IU، ویتامین D_3 5000 IU، ویتامین E 80 IU، ویتامین K 3.2 mg، ویتامین B1 3.2 mg، ویتامین B2 8.6 mg، نیاسین 65 mg، ویتامین B5 20 mg، ویتامین B6 4.3 mg، بیوتین 0.22 mg، اسیدفولیک 2.2 mg، ویتامین B12 0.017 mg

[۳] مکمل معدنی تأمین‌کننده مقادیر زیر در هر کیلوگرم جیره بود: مس 16 mg، ید 1.25 mg، آهن 20 mg، منگنز 120 mg، سلنیوم 0.3 mg، روی 110 mg

Supplied per kg of diet: 12000 IU Vit A, 5000 IU Vit D3, 80 IU Vit E, 3.2mg Vit K, 3.2 mg Vit B1, 8.6 mg Vit [1] B2, 65 mg niacin, 20 mg pantothenic acid, 4.3 mg Vit B6, 0.22 mg biotin, 2.2 mg folic acid and 0.017 mg VitB12.

[2] Supplied per kg of diet: 16 mg copper, 1.25 mg iodine, 20 mg iron, 120 mg manganese, 0.3 mg selenium and 110 mg zinc.

جدول ۲- مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی از ۲۶ تا ۳۵ روزگی (گرم/کیلوگرم جیره)

Table 2- Food ingredients and nutrients of experimental diets from 26 to 35 days (g/kg)

ترکیب جیره Diet composition	تیمار ۱ T1	تیمار ۲ T2	تیمار ۳ T3	تیمار ۴ T4	تیمار ۵ T5	تیمار ۶ T6	تیمار ۷ T7
ذرت (CP= 7.6%) Corn	657.0	654.3	652.0	649.8	656.6	656.3	656.0
سویا (CP= 43.0%) Soybean meal	288.2	288.6	288.8	289.1	288.4	288.4	288.5
روغن سویا Soy oil	21.3	22.2	23	23.7	21.4	21.5	21.6
خاکستر استخوان (P=17%, Ca=36%) Bone ash	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	6.3	9.3
مونوکلسیم فسفات (P=22%, Ca=17%) MCP	0.0	2.6	4.9	7.2	0.0	0.0	0.0
کربنات کلسیم Limestone	17.8	16.6	15.6	14.5	14.5	11.8	9.0
جوش‌شیرین $NaHCO_3$	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
نمک طعام Common salt	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
متیونین-DL DL-methionine	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
لیزین هیدروکلراید L-lysine-HCl	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
ترئونین-L L-threonine	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
کولین کلراید Choline chloride	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
مکمل ویتامینی [۱] Vitamins premix [1]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
مکمل معدنی [۲] Mineral premix [2]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
آنالیز مواد مغذی Nutrient analysis							
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم ME (Kcal/kg)	3025	3025	3025	3025	3025	3025	3025
پروتئین خام (٪) Crude protein (%)	18.56	18.55	18.54	18.56	18.56	18.56	18.56
لیزین قابل هضم (٪) Digestible lysine (%)	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
متیونین قابل هضم (٪) Digestible methionine (%)	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43
متیونین+سیستئین قابل هضم (٪) Digestible met+cys (%)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
ترئونین قابل هضم (٪) Digestible threonine (%)	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66
کلسیم (٪) Calcium (%)	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
فسفر کل آنالیز شده (٪) Total phosphorus analyzed (%)	0.25	0.30	0.35	0.40	0.31	0.36	0.41
فسفر قابل دسترس (٪) Available phosphorus (%)	0.11	0.16	0.21	0.26	0.16	0.21	0.26

[۲] مکمل ویتامینی تأمین‌کننده مقادیر زیر در هر کیلوگرم جیره بود: ویتامین A 12000 IU، ویتامین D_3 5000 IU، ویتامین E 80 IU، ویتامین K 3.2 mg، ویتامین B1 3.2 mg، ویتامین B2 8.6 mg، نیاسین 65 mg، ویتامین B5 20 mg، ویتامین B6 4.3 mg، بیوتین 0.22 mg، اسیدفولیک 2.2 mg، ویتامین B12 0.017 mg

[۳] مکمل معدنی تأمین‌کننده مقادیر زیر در هر کیلوگرم جیره بود: مس 16 mg، ید 1.25 mg، آهن 20 mg، منگنز 120 mg، سلنیوم 0.3 mg، روی 110 mg

[1] B2, 65 mg niacin, 20 mg B1, 8.6 mg Vit K, 3.2 mg Vit E, 3.2mg Vit D3, 80 IU Vit A, 5000 IU Vit Supplied per kg of diet: 12000 IU Vit B6, 0.22 mg biotin, 2.2 mg folic acid and 0.017 mg VitB12. pantothenic acid, 4.3 mg Vit

[2] Supplied per kg of diet: 16 mg copper, 1.25 mg iodine, 20 mg iron, 120 mg manganese, 0.3 mg selenium and 110 mg zinc.

۲. تیتر آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز گوسفندی

به‌منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفندی، در سن ۲۱ و ۲۸ روزگی سوسپانسیون پنج درصد گلبول قرمز گوسفندی در سرم فیزیولوژی تهیه شد و به یک پرنده از هر تکرار تزریق شد. سپس ۷ و ۱۴ روز پس از تزریق اول از همان پرنده خونگیری شد و سرم آن‌ها جدا شد. تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفندی به‌روش سنجش هماگلوتیناسیون براساس توضیحات اخلاقی و همکاران (Akhlaghi *et al.*, 2013) در سال ۲۰۱۳ اندازه‌گیری شد.

۳. قابلیت هضم

به‌منظور برآورد قابلیت هضم فسفر از سن ۱۹ تا ۲۵ روزگی، اکسید کروم به‌عنوان نشانگر به خوراک اضافه شد و سپس در سن ۲۵ روزگی یک جوجه از هر تکرار به‌صورت تصادفی انتخاب و کشتار شد. سپس محتویات روده از قسمت ایلئوم جهت بررسی قابلیت هضم فسفر نمونه‌گیری شد. جهت برآورد درصد قابلیت هضم ماده خشک و فسفر از معادله‌های زیر استفاده شد (Liu *et al.*, 2013).

معادله (۱)

$$\text{درصد قابلیت هضم مادهٔ مغذی} = 100 - \left[\left(\frac{\text{درصد اکسید کروم در خوراک}}{\text{درصد اکسید کروم در محتویات روده}}\right) \times \left(\frac{\text{درصد مادهٔ مغذی در خوراک}}{\text{درصد مادهٔ مغذی در محتویات روده}}\right) \times 100\right]$$

معادله (۲)

$$\text{درصد قابلیت هضم ماده خشک} = 100 - \left[\left(\frac{\text{درصد اکسید کروم در خوراک}}{\text{درصد اکسید کروم در محتویات روده}}\right) \times 100\right]$$

برای اندازه‌گیری میزان اکسید کروم در محتویات روده و خوراک از روش فنتون و فنتون (Fenton and Fenton, 1979) استفاده شد. همچنین، به‌منظور اندازه‌گیری درصد فسفر محتویات روده و خوراک از روش توضیح داده شده در AOAC 2016 استفاده شد.

۴. کیفیت استخوان

در پایان دوره آزمایشی، یک پرنده از هر تکرار به‌طور تصادفی انتخاب و کشتار شد و استخوان درشت‌نی از پای چپ جهت اندازه گیری خاکستر و فسفر و تعیین پارامترهای کیفیت استخوان جدا شد. برای این منظور، ابتدا استخوان‌ها به‌طور کامل تمیز شدند و سپس جهت جداسازی کلاهک غضروفی به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفتند (Kocabagli, 2001). طول و عرض استخوان توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و سپس جهت به‌دست آوردن وزن خشک، استخوان‌ها در آون با دمای ۱۶۰درجه قرار گرفتند (Imari *et al.*, 2020). به‌منظور بررسی استحکام استخوان و اندازه‌گیری تنش برشی و خمشی از دستگاه اینسترون (Santam, STM 20, Iran) براساس توضیحات کوکاباگلی (Kocabagli, 2001) در سال ۲۰۰۱ استفاده شد. پس از شکستن استخوان ضخامت دیواره داخلی با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد و جهت برآورد درصد فسفر و خاکستر، استخوان‌ها به‌مدت هشت ساعت در کوره با دمای ۶۰۰ درجه قرار گرفتند (Efranji *et al.*, 2022). در نهایت، شاخص‌های تیبیوتارسال و ربوستیسیتی براساس معادله‌های زیر محاسبه شدند (Barnett *et al.*, 1960; Riesenfeld, 1972).

معادلـــــــــه (۳ و ۴)

$$\text{شاخص ربوستیسیتی} = \frac{\text{طول استخوان}}{\sqrt[3]{\text{وزن استخوان}}}$$

$$\text{شاخص تیبیوتارسال} = \frac{\text{قطر کانال مدولاری} - \text{قطر دیافیز}}{\text{قطر دیافیز}} \times 100$$

۵. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به عملکرد، کیفیت استخوان و SRBC به‌صورت یک طرح فاکتوریل ۲×۳ همراه با یک فاکتور اضافه با دو نوع منبع فسفات و سه سطح از هر منبع (هفت تیمار) توسط نرم‌افزار SAS 9.4 آنالیز شدند و مقایسه میانگین توکی در سطح معناداری $P<0.05$ صورت گرفت. همچنین به‌منظور محاسبهٔ درصد زیست‌فراهمی نسبی فسفر، داده‌های حاصل از بررسی افزایش وزن روزانه، قابلیت هضم و پارامترهای کیفیت استخوان نسبت به فسفر مصرف شده توسط پرنده در یک مدل رگرسیون خطی برازش شدند. سپس درصد زیست‌فراهمی نسبی فسفر موجود در خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم‌فسفات، به‌عنوان یک منبع استاندارد، با روش نسبت شیب خط محاسبه شد (Matin *et al.*, 2021). در این روش، ارزش زیست‌فراهمی فسفر براساس تقسیم ضریب رگرسیون معادله سطوح مختلف خاکستر استخوان نسبت به ضریب رگرسیون معادله سطوح مختلف مونوکلسیم‌فسفات محاسبه شد (Cuevas *et al.*, 2019).

معادله (۵): رگرسیون منبع استاندارد (مونوکلسیم‌فسفات) $Y=a+bx$

معادله (۶): رگرسیون خاکستر استخوان: $Y=a+bx$

معادله (۷): درصد زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان

$$\left(\frac{\text{ضریب رگرسیون معادلهٔ خاکستر استخوان}}{\text{ضریب رگرسیون معادلهٔ مونو کلسیم فسفات}}\right) \times 100$$

نتایج و بحث

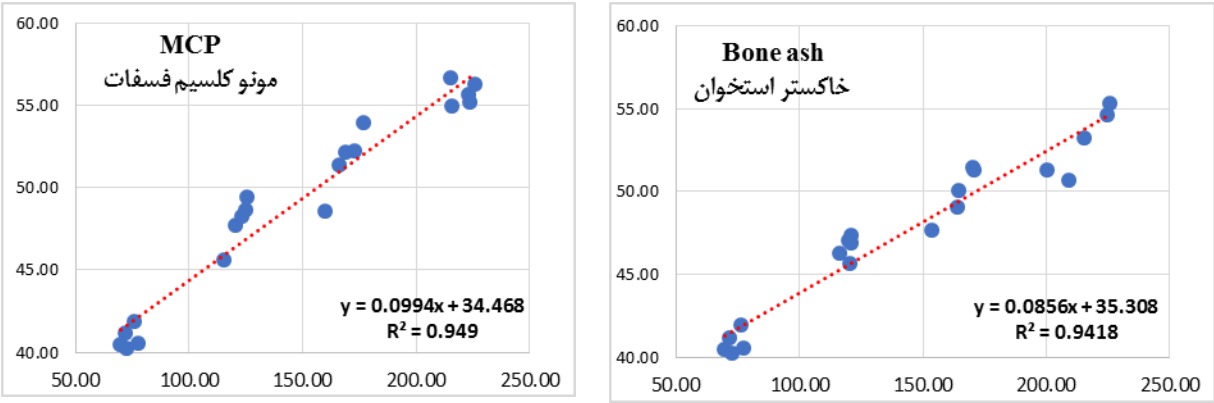
۱. عملکرد پرنده

نتایج حاصل از عملکرد و برآورد ارزش زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان براساس افزایش وزن روزانه نسبت به فسفر مصرفی در جدول ۳ و شکل ۱ گزارش داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، فسفر خاکستر استخوان در دوره رشد (۱۰ تا ۲۵ روز) و در دوره پایانی (۲۶ تا ۳۵ روز) به‌ترتیب ۸۲/۳۷ درصد و ۹۳/۲۴ درصد زیست‌فراهمی داشته است. نتایج حاصل از عملکرد به‌صورت یک طرح فاکتوریل با یک فاکتور اضافه نیز آنالیز شد که در جدول ۴ گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، با توجه به اثرات اصلی، در هر دو دوره رشد و پایانی بیشترین افزایش وزن روزانه و مصرف خوراک و کمترین ضریب تبدیل مربوط به تیمارهایی بود که بالاترین سطح فسفر (۰/۲۶ درصد) را داشتند (P<0.05). همچنین در هر دو دوره آزمایشی، جوجه‌های تغذیه شده با مونوکلسیم‌فسفات افزایش وزن بیشتر و ضریب تبدیل کمتری نسبت به جوجه‌ها تغذیه شده با خاکستر استخوان داشتند (P<0.05). هیچ تفاوت معناداری در اثرات متقابل دیده نشد.

جدول ۳- تخمین زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان براساس میانگین افزایش وزن روزانه نسبت به فسفر مصرفی

Table 3- Estimation of bone ash phosphorus (P) bioavailability based on average daily weight gain compared to consumed phosphorus

	منبع فسفر P source	معادله‌ی رگرسیون Regression equation	ضریب تبین R-square	ارزش زیست‌فراهمی نسبی (٪) Bioavailability (%)
۱۰ تا ۲۵ روز 10 to 25 days	مونوکلسیم‌فسفات MCP	Y=0.0732 X+ 33.14	0.96	100
	خاکستر استخوان Bone ash	Y=0.0603X+ 33.94	0.92	82.37
۲۶ تا ۳۵ روز 26 to 35 days	مونوکلسیم‌فسفات MCP	Y=0.1199 X+ 37.04	0.90	100
	خاکستر استخوان Bone ash	Y=0.1118 X+ 37.19	0.91	93.24
۱۰ تا ۳۵ روز 10 to 35 days	مونوکلسیم‌فسفات MCP	Y=0.0994 X+ 34.46	0.94	100
	خاکستر استخوان Bone ash	Y=0.0856 X+ 35.30	0.94	86.11



شکل ۱- نمودار رگرسیون افزایش وزن روزانه نسبت به فسفر مصرفی در کل دوره آزمایشی (۱۰ تا ۳۵ روز)

Figure 1- Regression diagram of daily weight gain in relation to phosphorus consumed during the total experimental period (10 to 35 days)

محور عمودی نشان‌دهنده میانگین افزایش وزن روزانه (گرم) و محور افقی نشان‌دهنده میزان فسفر مصرفی در روز (میلی گرم) است.

The vertical axis shows the average daily weight gain (g) and the horizontal axis shows the amount of phosphorus consumed per day (mg).

مطالعات زیادی نشان می‌دهند که افزایش فسفر قابل دسترس جیره از طریق تغییر منبع فسفات جیره و یا افزودن فیتاز باعث بهبود عملکرد و افزایش بهره‌وری خوراک می‌شود (Dilger *et al*., 2004 ; Pieniazek *et al*., 2017Cowieson *et al*., 2006 ;). در این مطالعه نیز افزایش فسفر قابل دسترس خوراک باعث افزایش معنادار وزن و بهبود عملکرد شد. در توافق با نتایج ما، آکتر و همکاران (Akter *et al*., 2016) گزارش کردند که افزایش فسفر قابل دسترس جیره به‌طور معناداری باعث افزایش وزن و کاهش ضریب تبدیل خوراک می‌شود.

جدول ٤- تأثیر منبع و سطح فسفر بر عملکرد جوجه‌های گوشتی سویه آرین (گرم)

Table 4- The effect of the source and level of phosphorus (P) on the performance of Arian strain broilers (g)

منبع فسفر P source	سطح فسفر P level	۱۰ تا ۲۵ روز 10 to 25 days			۳۵ تا ۲۶ روز 26 to 35 days		
		ADWG [1]	ADFI [2]	FCR [3]	ADWG [1]	ADFI [2]	FCR [3]
فاقد منبع فسفر No phosphorus source	0.11 %	38.15 [e]	61.72 [c]	1.61 [a]	44.62 [e]	74.33 [e]	1.66
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	40.55 [d]	64.39 [bc]	1.59 [abc]	58.20 [d]	93.06 [bc]	1.59
	0.21 %	43.36 [bc]	65.25 [abc]	1.50 [d]	63.19 [bdc]	102.03 [ab]	1.50
	0.26 %	46.12 [a]	68.56 [a]	1.48 [d]	69.18 [a]	108.03 [a]	1.48
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	39.92 [de]	64.43 [bc]	1.61 [ab]	55.99 [d]	89.75 [c]	1.68
	0.21 %	42.61 [c]	65.82 [ab]	1.54 [bcd]	60.04 [bcd]	96.22 [bc]	1.54
	0.26 %	44.42 [ab]	68.13 [ab]	1.53 [cd]	65.93 [ab]	103.22 [ab]	1.55
مقدار احتمال P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.203
خطای استاندارد میانگین SEM		0.398	0.852	0.015	1.343	1.493	0.029
اثرات اصلی Main effects							
درصد فسفر P level	0.16 %	40.23 [c]	64.41 [b]	1.60 [a]	57.09 [c]	91.40 [c]	1.60
	0.21 %	42.99 [b]	65.53 [b]	1.52 [b]	61.62 [b]	99.13 [b]	1.61
	0.26 %	44.94 [a]	68.35 [a]	1.52 [b]	67.55 [a]	105.65 [a]	1.56
مقدار احتمال P-value		<0.0001	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.099
منبع فسفر P source	مونوکلسیم فسفات MCP	43.34 [a]	66.07	1.52 [b]	63.52 [a]	101.05 [a]	1.59
	خاکستر استخوان Bone ash	42.10 [b]	66.13	1.57 [a]	60.65 [b]	96.39 [b]	1.59
مقدار احتمال P-value		0.0026	0.927	0.0009	0.0215	0.034	0.971
اثرات متقابل [4] Intractional							
مقدار احتمال P-value منبع فسفر × سطح فسفر P source × P level		0.129	0.828	0.276	0.923	0.885	0.909

[۱] میانگین افزایش وزن روزانه؛ [۲] میانگین خوراک مصرفی روزانه؛ [۳] ضریب تبدیل خوراک.

[۴] به‌دلیل معنادار نبودن اثرات متقابل، مقایسات میانگین اثرات متقابل گزارش نشد.

[ab] اعداد در هر ستون با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنادار از لحاظ آماری هستند (تست توکی $P<0.05$).

[1] Average daily weight gain; [2] average daily feed intake; [3] feed conversion ratio

[4] Due to non-significance of interaction effects, mean comparisons of interaction effects were not reported.

[ab] Value in each column with different letters has statistically significant differences (Tukey's test $P<0.05$).

همچنین براساس نتایج حاصل از عملکرد در این مطالعه متوجه این نکته می‌شویم که با افزایش سطح فسفر جیره، پرندگانی که از منبع خاکستر استخوان استفاده کرده‌اند در مقایسه با پرندگانی که منبع مونوکلسیم‌فسفات را استفاده کرده‌اند، تفاوت وزن معناداری ندارند. به همین دلیل، می‌توانیم نتیجه بگیریم که خاکستر استخوان توانسته است کمبود رشد اولیه را به‌خوبی و تقریباً مشابه با مونوکلسیم‌فسفات جبران کند. در توافق با نتایج ما، ون‌هارن و همکاران (Van Harn *et al.*, 2017) گزارش کردند که خاکستر استخوان می‌تواند مشابه با دی و مونوکلسیم‌فسفات کمبود رشد را نسبت به جیره‌های بدون منبع فسفات در جوجه‌های گوشتی جبران کند. همچنین بارشان و همکاران (Barshan *et al.*, 2019) در سال ۲۰۱۹ گزارش کردند که استفاده از خاکستر استخوان ژلاتین‌زدایی شده در مقایسه با دی‌کلسیم‌فسفات باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی از ۱ تا ۲۸ روزگی می‌شود. بنابراین، به‌طور کلی، می‌توانیم نتیجه بگیریم که خاکستر استخوان می‌تواند جایگزین خوبی برای منابع معدنی فسفات باشد.

بررسی درصد زیست‌فراهمی فسفر براساس فسفر مصرفی نسبت به عملکرد نشان داد که زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان در مرحله پایانی نسبت به مرحله رشد افزایش یافته است. بر همین اساس، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش زمان مصرف خاکستر استخوان توسط پرنده، زیست‌فراهمی فسفر آن نیز افزایش می‌یابد. همچنین، در این مطالعه به‌دلیل بررسی اثرات رگرسیون، کمبود فسفر اعمال شد و سطح استاندارد فسفر بررسی نشد؛ امّا در مطالعه دیگری که انجام دادیم، مشاهده کردیم که زمانی که سطح فسفر قابل دسترس جیره در سطح استاندارد توصیه شده در کاتالوگ باشد (۰/۴۸ درصد استارتر، ۰/۴۳ درصد رشد و ۰/۳۹ درصد پایانی)؛ خاکستر استخوان می‌تواند حتی بهتر از دی‌کلسیم‌فسفات عمل کند؛ به‌طوری‌که در کل دوره پرورش افزایش وزن روزانه در پرندگان تغذیه شده با خاکستر استخوان ۴۷/۰۶ گرم و در پرندگان تغذیه شده با دی-کلسیم‌فسفات ۴۵/۷۷ گرم بود (Sedghi *et al.*, 2023). بنابراین، این احتمال وجود دارد که با افزایش زمان مصرف خوارک و تأمین فسفر و کلسیم در سطح استاندارد توصیه شده، خاکستر استخوان بتواند بهتر از منابع معدنی فسفات نیز عمل کند.

۲. تیترآنتی بادی علیه SRBC

تأثیر سطح و منبع فسفر بر تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفندی در جدول ۵ گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، تنها تفاوت معنادار در اثرات اصلی برای تیترآنتی‌بادی کل و IgG در پاسخ ثانویه مشاهده شده است؛ به نحوی که تیتر آنتی‌بادی تولید شده در پاسخ ثانویه، در جوجه‌های تغذیه شده با مونوکلسیم-فسفات به‌طور معناداری بیشتر از جوجه‌های تغذیه شده با خاکستر استخوان بوده است ($P<0.05$). برای سایر میانگین‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش سطح فسفر جیره باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی می‌شود که می‌تواند نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی باشد. در توافق با نتایج ما، ناری و همکاران (Nari *et al.*, 2020) در مطالعه خود گزارش کردند که کاهش سطح فسفر جیره باعث کاهش وزن اندام‌های لنفاوی می‌شود که نشان‌دهنده کاهش عملکرد سیستم ایمنی پرنده است. همچنین در این راستا، امامی و همکاران گزارش کردند که کاهش سطح فسفر جیره باعث کاهش تولید تیترآنتی‌بادی‌های کل و IgG و IgM علیه گلبول قرمز گوسفندی می‌شود (Emami *et al.*, 2013). این امر احتمالاً به‌دلیل تضعیف بدن پرنده در اثر کمبود مواد مغذی و متعاقب آن تضعیف سیستم ایمنی است.

۳. کیفیت استخوان درشت‌نی

نتایج حاصل از تست کیفیت استخوان درشت‌نی در جدول ۶ گزارش شده است. باتوجه به اثرات اصلی، بیشترین وزن خشک، طول استخوان درشت‌نی ، ضخامت دیواره و شاخص وزن مربوط به جوجه هایی بود که با بیشترین سطح فسفر (۰/۲۶ درصد) و مونوکلسیم فسفات تغذیه شده بودند ($P<0.05$). برای پارامترهای قطر کانال مدولاری و شخاص تیبیوتارسال هیچ تفاوت معناداری بین تیمارها وجود نداشت؛ امّا براساس اثرات اصلی، شاخص روبوستیستی در جوجه‌های تغذیه شده با ۰/۱۶ درصد فسفر به‌طور معناداری بیشتر بود. اثرات متقابل برای وزن خشک و شاخص روبوستیستی معنادار بود؛ امّا برای سایر پارامترها تفاوت معناداری نداشت.

نتایج حاصل از تست استحکام و میزان خاکستر و فسفر درشت‌نی در جدول ۷ گزارش شده است. باتوجه به اثرات اصلی، تنش برشی و خمشی برای استخوان درشت‌نی در جوجه‌های تغذیه شده با ۰/۲۶ درصد فسفر به‌طور معناداری بیشتر بود ($P<0.05$)؛ امّا بین جوجه‌های تغذیه شده با مونوکلسیم‌فسفات و خاکستر استخوان تفاوت معناداری وجود نداشت. افزایش نیروی خمشی و برشی بدین معنا است که برای شکستن این استخوان‌ها نیروی بیشتری لازم است، که نشان‌دهنده استحکام بیشتر این استخوان‌ها است. هیچ تفاوت معناداری برای اثرات متقابل وجود نداشت. اندازه‌گیری درصد خاکستر و فسفر استخوان‌های درشت‌نی نشان داد که با افزایش سطح فسفر در جیره، درصد خاکستر و فسفر درشت‌نی به‌طور معناداری بیشتر می‌شود ($P<0.05$). همچنین استفاده از مونوکلسیم فسفات در جیره باعث

افزایش معنادار فسفر درشت‌نـی شـده بـود (P<0.05)؛ امّـا در درصـد خاکستر تفاوت معنـاداری ایجـاد نکـرده بـود. نتـایج حاصـل از آنـالیز رگرسیون درصد خاکستر و فسفر درشت‌نی نیز در جدول ۸ و شـکل ۲ و ۳ گزارش شده اسـت. براسـاس نتـایج حاصـل از آنـالیز رگرسـیون، قابلیت زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان براساس درصد خاکستر و فسفر درشت‌نی ، به‌ترتیب ۹۲/۸۶ و ۹۶/۳۹ درصد بود.

جدول ۵- تأثیر منبع و سطح فسفر بر تیتر آنتی‌بادی تولید شده علیه گلبول قرمز گوسفندی در جوجه‌های گوشتی (لگاریتم ۲)

Table 5- The effect of the source and level of phosphorus (P) on the antibody titer produced against sheep red blood cells in broilers (Log2)

منبع فسفر P source	سطح فسفر P level	پاسخ اولیه Primary response			پاسخ ثانویه Secondary response		
		آنتی‌بادی کل Total antibody	IgG	IgM	آنتی‌بادی کل Total antibody	IgG	**IgM**
فاقد منبع فسفر No phosphorus source	0.11 %	2.20	1.00	1.20	3.40 [b]	1.80 [a]	1.60
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	3.20	1.20	2.00	6.00 [a]	3.40 [ab]	2.60
	0.21 %	3.40	1.60	1.80	6.22 [a]	3.60 ab	2.60
	0.26 %	3.80	1.80	2.00	6.40 [a]	4.00 [a]	2.40
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	2.60	1.40	1.20	4.00 [ab]	2.00 [b]	2.00
	0.21 %	3.20	1.60	2.60	5.40 [ab]	2.60 [ab]	2.80
	0.26 %	4.00	2.00	2.00	5.80 [ab]	3.40 [ab]	2.40
مقدار احتمال P-value		0.371	0.393	0.767	0.0041	0.008	0.518
خطای استاندارد میانگین SEM		0.595	0.329	0.489	0.568	0.444	0.437
اثرات اصلی Main effects							
درصد فسفر P level	0.16 %	2.90	1.30	1.60	5.00	2.70	2.30
	0.21 %	3.30	1.60	1.70	5.80	3.10	2.40
	0.26 %	3.90	1.90	2.00	6.10	3.70	2.70
مقدار احتمال P-value		0.261	0.261	0.862	0.165	0.125	0.623
منبع فسفر P source	مونوکلسیم فسفات MCP	3.49	1.53	1.93	6.20 [a]	3.36 [a]	2.53
	خاکستر استخوان Bone ash	3.26	1.66	1.60	5.06 [b]	2.66 [b]	2.40
مقدار احتمال P-value		0.685	0.650	0.396	0.024	0.016	0.703
اثرات متقابل [1] Intractional							
مقدار احتمال P-value منبع فسفر × سطح فسفر P source × P level		0.800	0.948	0.682	0.425	0.702	0.623

[ab] اعداد در هر ستون با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنادار از لحاظ آماری هستند (تست توکی P<0.05).

[۱] به‌دلیل معنادار نبودن اثرات متقابل، مقایسات میانگین اثرات متقابل گزارش نشد.

[ab] Value in each column with different letters has statistically significant differences. (Tukey's test *P<0.05*).

[1] Due to non-significance of interaction effects, mean comparisons of interaction effects were not reported.

جدول ٦- تأثیر منبع و سطح فسفر بر کیفیت استخوان درشت‌نی در جوجه‌های گوشتی

Table 6- The effect of the source and level of phosphorus (P) on tibia bone quality in broilers

منبع فسفر P source	سطح فسفر P level	وزن خشک Dry weight (mg)	طول Length (mm)	شاخص وزن Weight index	قطر دیافیز Diaphysis diameter (mm)	ضخامت دیواره Wall thickness (mm)	قطر کانال مدولاری Medullary canal diameter (mm)	شاخص تیبیوتارسال Tibiotarsal index	شاخص روبوستیسیتی Robusticity index
فاقد منبع فسفر No P source	0.11 %	1606 ^{e}	67.7 ^{d}	23.71 ^{e}	5.93 ^{c}	0.88 ^{c}	5.05	14.86	5.75 ^{ab}
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	1772 ^{d}	70.3 ^{bc}	25.17 ^{de}	6.00 ^{bc}	0.93 ^{bc}	5.07	15.52	5.81 ^{a}
	0.21 %	2018 ^{b}	71.3 ^{b}	28.28 ^{b}	6.14 ^{abc}	0.98 ^{ab}	5.16	15.98	5.64 ^{b}
	0.26 %	2332 ^{a}	73.6 ^{a}	30.31 ^{a}	6.35 ^{a}	1.03 ^{a}	5.32	16.24	5.63 ^{b}
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	1706 ^{de}	68.7 ^{bc}	24.80 ^{de}	6.19 ^{a}	0.95 ^{abc}	5.34	15.34	5.75 ^{ab}
	0.21 %	1840 ^{cd}	70.6 ^{b}	26.05 ^{cd}	6.35 ^{a}	0.95 ^{abc}	5.40	14.95	5.76 ^{a}
	0.26 %	1960 ^{bc}	71.1 ^{b}	27.53 ^{bc}	6.28 ^{ab}	1.00 ^{ab}	5.28	15.92	5.68 ^{ab}
مقدار احتمال P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0012	0.0002	0.05	0.122	0.0007
خطای استاندارد میانگین SEM		32.05	0.388	0.389	0.072	0.019	0.078	0.368	0.029
اثرات اصلی Main effects									
درصد فسفر P level	0.16 %	1739 ^{c}	69.5 ^{c}	24.98 ^{c}	6.09 ^{b}	0.94 ^{b}	5.15	15.43	5.78 ^{a}
	0.21 %	1929 ^{b}	70.9 ^{b}	27.16 ^{b}	6.24 ^{ab}	0.96 ^{b}	5.28	15.46	5.70 ^{b}
	0.26 %	2096 ^{a}	72.4 ^{a}	28.92ش	6.31 ^{a}	1.01 ^{a}	5.30	16.08	5.66 ^{b}
مقدار احتمال P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.017	0.002	0.137	0.163	0.0007
منبع فسفر P source	مونوکلسیم فسفات MCP	2007 ^{a}	71.7 ^{a}	27.92 ^{a}	6.16	0.98	5.18	15.91	5.70
	خاکستر استخوان Bone ash	1835 ^{b}	70.1 ^{b}	26.13 ^{b}	6.37	0.96	5.30	15.41	5.73
مقدار احتمال P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.074	0.402	0.057	0.107	0.141
اثرات متقابل Intractional									
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	1772 ^{d}	70.3	25.17 ^{d}	6.00	0.93	5.07	15.52	5.81 ^{a}
	0.21 %	2018 ^{b}	71.3	28.28 ^{b}	6.14	0.98	5.16	15.98	5.64 ^{b}
	0.26 %	2332 ^{a}	73.6	30.31 ^{a}	6.35	1.03	5.32	16.24	5.63 ^{b}
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	1706 ^{d}	68.7	24.80 ^{d}	6.19	0.95	5.34	15.34	5.75 ^{ab}
	0.21 %	1840 ^{cd}	70.6	26.05 ^{cd}	6.35	0.95	5.40	14.95	5.76 ^{a}
	0.26 %	1960 ^{bc}	71.1	27.53 ^{bc}	6.28	1.00	5.28	15.92	5.68 ^{ab}
مقدار احتمال P-value منبع فسفر × سطح فسفر P source × P level		0.020	0.081	0.019	0.118	0.327	0.178	0.476	0.015

^{ab} اعداد در هر ستون با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنادار از لحاظ آماری هستند (تست توکی $P<0.05$).

^{ab} Value in each column with different letters has statistically significant differences. (Tukey's test $P<0.05$).

جدول ۷- تأثیر منبع و سطح فسفر بر استحکام و میزان خاکستر و فسفر استخوان درشت‌نی در جوجه‌های گوشتی

Table 7- Effect of source and level of phosphorus on strength and tibia bone ash and phosphorus (P) in broilers

منبع فسفر P source	سطح فسفر P level	تنش برشی (N/mm²)Shear stress	تنش خمشی (N/mm²)Tensile stress	خاکستر درشت‌نی Tibia ash (% of dry matter)	فسفر درشت‌نی Tibia P (% of dry matter)
فاقد منبع فسفر No phosphorus source	0.11 %	13.03 [c]	28.99 [b]	39.56 [c]	2.59 [e]
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	22.79 [ab]	49.64 [a]	41.77 [c]	3.11 [d]
	0.21 %	25.00 [ab]	52.80 [a]	46.89 [ab]	3.78 [bc]
	0.26 %	27.71 [a]	55.44 [a]	48.19 [a]	4.19 [a]
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	19.76 [bc]	40.92 [ab]	41.86 [c]	2.94 [d]
	0.21 %	25.04 [ab]	51.48 [a]	45.25 [b]	3.68 [c]
	0.26 %	26.63 [ab]	56.08 [a]	47.65 [ab]	4.04 [ab]
مقدار احتمال P-value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
خطای استاندارد میانگین SEM		1.61	3.397	0.651	0.072
اثرات اصلی Main effects					
درصد فسفر P level	0.16 %	21.27 [b]	45.28 [b]	41.81 [c]	3.02 [c]
	0.21 %	25.02 [ab]	52.14 [ab]	46.07 [b]	3.73 [b]
	0.26 %	27.17 [a]	55.75 [a]	47.92 [a]	4.11 [a]
مقدار احتمال P-value		0.006	0.023	<0.0001	<0.0001
منبع فسفر P source	مونوکلسیم فسفات MCP	25.16	52.63	45.62	3.69 [a]
	خاکستر استخوان Bone ash	23.81	49.49	44.92	3.55 [b]
مقدار احتمال P-value		0.328	0.296	0.171	0.027
اثرات متقابل [1] Intractional					
مقدار احتمال P-value منبع فسفر × سطح فسفر P source × P level		0.663	0.404	0.364	0.861

[ab] اعداد در هر ستون با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنادار از لحاظ آماری هستند (تست توکی $P<0.05$).

[1] به‌دلیل معنادار نبودن اثرات متقابل، مقایسات میانگین اثرات متقابل گزارش نشد.

[ab] Value in each column with different letters has statistically significant differences. (Tukey's test $P<0.05$).

[1] Due to non-significance of interaction effects, mean comparisons of interaction effects were not reported.

شاخص وزن (نسبت وزن به طول استخوان) یک شاخص ساده برای توصیف چگالی استخوان است (Onyango *et al.*, 2003). بر همین اساس، ما مشاهده کردیم که در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح پایین فسفر، این شاخص کمتر بود. همچنین شاخص‌های روبوستیسیتی و تیبیوتارسال نشان‌دهنده درجه معدنی شدن و استحکام استخوان هستند. هر چقدر شاخاص روبوستیسیتی کمتر و شاخص تیبیوتارسال بیشتر باشد، نشان می‌دهد که استخوان مستحکم‌تر است و درجه کانی‌سازی در آن بیشتر بوده است (Mutuş *et al.*, 2006). لیم و همکاران (Lim Teik Chung *et al.*, 2019) گزارش کردند که افزودن مونوکلسیم‌فسفات به جیره و افزایش سطح فسفر باعث افزایش شاخص تیبیوتارسال می‌شود. در مطالعه حاضر نیز میزان شاخص تیبیوتارسال در جوجه‌هایی که کمترین سطح فسفر را دریافت کرده بودند، کمتر بود؛ امّا شاخص روبوستیسیتی برای این جوجه‌ها به‌طور معناداری بیشتر شده بود که نشان‌دهنده کاهش درجه معدنی شدن درشت‌نی با کاهش سطح فسفر جیره است. همچنین باتوجه به عدم وجود تفاوت معنادار در شاخص ربوستوسیتی، تیبیوتارسال و تنش خمشی و برشی در استخوان درشت‌نی جوجه‌های تغذیه شده با خاکستر استخوان و مونوکلسیم‌فسفات، می‌توان نتیجه گرفت که خاکستر استخوان توانسته است، همانند مونوکلسیم‌فسفات در استخوان‌سازی و تقویت سیستم اسکلتی پرنده نقش ایفا کند و کمبود

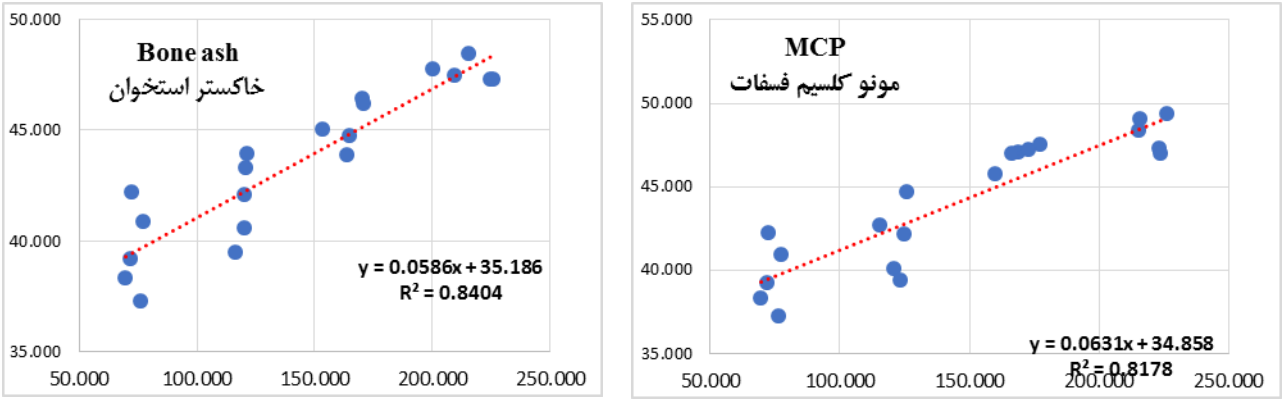
فسفر را به‌خوبی جبران کند.

درصد خاکستر استخوان پرنده بازتابی از سطح عناصر معدنی در جیره به‌خصوص کلسیم و فسفر است و زمانی که کمبود این عناصر در جیره وجود داشته باشد، منجر به تأخیر در سرعت رشد و کانی‌سازی ضعیف می‌شود (Li *et al.*, 2020). والابل و همکاران (Valable *et al.*, 2018) گزارش کردند که کاهش سطح فسفر و کلسیم جیره باعث کاهش معنادار وزن خاکستر استخوان درشت‌نی و انگشت پا می‌شود. والترز و همکاران (Walters *et al.*, 2019) نیز مشاهده کردند که با افزایش سطح فسفر قابل دسترس در خوراک از طریق منابع معدنی یا افزودن فیتاز به جیره، درصد فسفر و خاکستر درشت‌نی افزایش می‌یابد. بر همین اساس، ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم که با افزایش سطح فسفر جیره، درصد خاکستر و فسفر درشت‌نی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. همچنین، از مشابه بودن درصد خاکستر درشت‌نی در جوجه‌های تغذیه شده با مونوکلسیم‌فسفات و خاکستر استخوان، می‌توانیم نتیجه بگیریم که هر دو منبع توانسته‌اند به‌خوبی فسفر و کلسیم را جهت استخوان‌سازی در اختیار پرنده قرار بدهند. همچنین با در نظر گرفتن این نکته که درصد قابل توجهی از خاکستر تیب درشت‌نی یا مربوط به کلسیم است (۳۴ درصد) و از آنجایی که درصد فسفر درشت‌نی در جوجه‌های تغذیه شده با مونوکلسیم‌فسفات بیشتر بود؛ امّا در درصد خاکستر درشت‌نی مشابه بود، می‌توان نتیجه گرفت که کلسیم موجود در خاکستر استخوان نیز برای پرنده قابلیت دسترسی خوبی داشته است و خاکستر استخوان می‌تواند مشابه مونوکلسیم‌فسفات منبع خوبی برای تأمین کلسیم نیز باشد.

جدول ۸- تخمین زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان براساس درصد خاکستر و فسفر درشت‌نی نسبت به فسفر مصرفی

Table 8- Estimation of phosphorus (P) bioavailability in bone ash based on the percentage of tibia ash and phosphorus compared to consumed phosphorus

	منبع فسفر P source	معادله رگرسیون Regression equation	ضریب تبین R-square	ارزش زیست‌فراهمی نسبی (درصد) Bioavailability (%)
خاکستر درشت‌نی Tibia ash	مونوکلسیم‌فسفات MCP	Y=0.0631 X+ 34.58	0.81	100
	خاکستر استخوان Bone ash	Y=0.0586X+ 35.18	0.84	92.86
فسفر درشت‌نی Tibia P	مونوکلسیم‌فسفات MCP	Y=0.0111 X+ 1.794	0.92	100
	خاکستر استخوان Bone ash	Y=0.0107 X+ 1.786	0.92	96.39

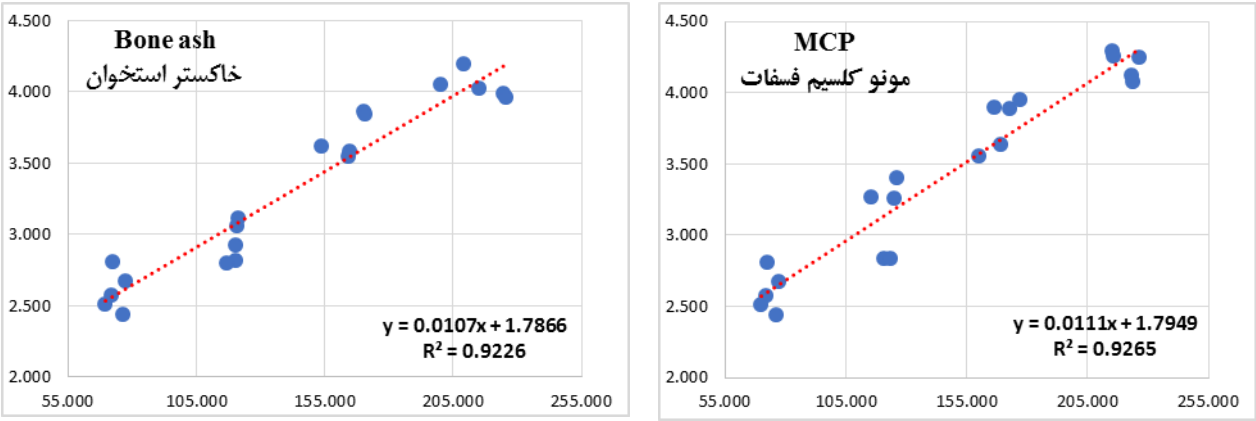


شکل ۲- نمودار رگرسیون درصد خاکستر استخوان درشت‌نی نسبت به فسفر مصرفی

Figure 2- Regression diagram of percentage of tibia bone ash relative to consumed phosphorus

محور عمودی نشان‌دهنده درصد خاکستر درشت‌نی (٪ از ماده خشک) و محور افقی نشان‌دهنده فسفر مصرفی در روز (میلی گرم) است.

The vertical axis shows the percentage of tibia ash (% of dry matter) and the horizontal axis shows the phosphorus consumed per day (mg).



شکل ۳– نمودار رگرسیون درصد فسفر استخوان درشت‌نی نسبت به فسفر مصرفی

Figure 3- Regression diagram of phosphorus percentage of tibia bone in relation to consumed phosphorus

محور عمودی نشان‌دهنده درصد فسفر درشت‌نی (٪ از ماده خشک) و محور افقی نشان‌دهنده فسفر مصرفی در روز (میلی گرم) است.

The vertical axis shows the percentage of tibia phosphorus (% of dry matter) and the horizontal axis shows the phosphorus consumed per day (mg).

۴. قابلیت هضم

نتایج حاصل از آزمایش قابلیت هضم در جدول ۹ گزارش شده است. با توجه به اثرات اصلی با افزایش سطح فسفر خوراک و استفاده از مونوکلسیم‌فسفات درصد قابلیت هضم کل خوراک به‌طور معناداری افزایش یافته است ($P<0.05$). همچنین درصد قابلیت هضم فسفر نیز با افزایش فسفر خوراک و استفاده از خاکستر استخوان، به‌صورت عددی افزایش یافته است؛ امّا تأثیر معناداری نداشته است.

مطابق با نتایج ما، امامی و همکاران (Emami *et al.*, 2013) گزارش کردند که کاهش فسفر جیره باعث کاهش درصد قابلیت هضم ماده خشک و فسفر خوراک می‌شود. والترز و همکاران (Walters *et al.*, 2019) نیز گزارش کردند که افزایش سطح فسفر قابل دسترس جیره از طریق منابع معدنی یا فیتاز باعث افزایش قابلیت هضم فسفر خوراک می‌شود. در این مطالعه نیز ما مشاهده کردیم که افزایش فسفر خوراک، قابلیت هضم ماده خشک خوراک را به‌طور معناداری زیاد می‌کند؛ امّا بر قابلیت هضم فسفر تأثیر معناداری ندارد. این امر احتمالاً به این دلیل بوده است که در زمان کمبود فسفر در جیره، پرنده جذب فسفر را در روده افزایش می‌دهد تا بتواند بهره‌وری از خوراک را بیشتر کند و با این کمبود مواد مغذی سازگار شود (Rousseau *et al.*, 2016)؛ بنابراین، احتمالاً به‌دلیل وجود کمبود فسفر، قابلیت هضم فسفر تحت تأثیر معناداری قرار نگرفته است؛ هرچند که به‌صورت عددی کاهش یافته است.

قابلیت هضم ایلئومی فسفر خاکستر استخوان در این مطالعه ۸۵/۵۷ درصد برآورد شد، درصورتی که در مطالعه ون‌هارن و همکاران (Van Harn *et al.*, 2017) قابلیت هضم فسفر خاکستر استخوان ۷۸/۲ درصد و در مطالعه سیمونس و همکاران (Simons *et al.*, 1991) ۷۹/۳ درصد گزارش شده است. این تفاوت شاید به‌دلیل شرایط متفاوت در فرآیند تولید خاکستر استخوان بوده است؛ چرا که در مطالعه آن‌ها از خاکستر استخوان ژلاتین‌زدایی نشده استفاده شده بود و همین امر باعث کاهش قابلیت هضم فسفر می‌شود (Barshan *et al.*, 2019).

نتیجه‌گیری

باتوجه به محدودیت استفاده از منابع معدنی فسفر و کلسیم و همچنین گران شدن این منابع، ما نیاز داریم تا جایگزین‌های مناسبی برای منابع معدنی فسفر و کلسیم انتخاب کنیم. استخوان یک منبع غنی از فسفر و کلسیم است که می‌توان از آن به‌عنوان یک منبع آلی برای تأمین فسفر و کلسیم در جیره‌های طیور صنعتی استفاده کرد. با توجه به مطالعات گذشته، برآورد درصد قابلیت زیست‌فراهمی براساس درصد خاکستر یا فسفر استخوان یک روش استاندارد و دقیق برای محاسبه قابلیت زیست‌فراهمی فسفر یک ماده خوراکی نسبت به یک ماده خوراکی استاندارد مثل مونوکلسیم‌فسفات است. به همین دلیل، با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، می‌توان نتیجه گرفت که به‌طور کلی، قابلیت زیست‌فراهمی فسفر خاکستر استخوان نسبت به مونوکلسیم فسفات ۹۲ تا ۹۶ درصد است. این نتیجه بیانگر قابلیت خوب خاکستر استخوان در جایگزینی منابع معدنی فسفر است.

تشکر و قدردانی

از شرکت خاکستر استخوان الماس نوین که حمایت مالی این

پژوهش را به عهده داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

جدول ۹- تأثیر منبع و سطح فسفر بر قابلیت هضم در جوجه‌های گوشتی (درصد)

Table 9- Effect of source and level of phosphorus (P) on digestibility in broilers (%)

منبع فسفر P source	سطح فسفر P level	قابلیت هضم ماده خشک Dry matter digestibility	قابلیت هضم فسفر P digestibility
فاقد منبع فسفر No phosphorus source	0.11 %	56.54 [b]	81.83
مونوکلسیم فسفات MCP	0.16 %	65.64 [a]	83.22
	0.21 %	67.42 [a]	85.46
	0.26 %	69.92 [a]	86.03
خاکستر استخوان Bone ash	0.16 %	62.83 [ab]	84.70
	0.21 %	65.57 [a]	85.71
	0.26 %	66.01 [a]	86.30
مقدار احتمال P-value		0.0026	0.483
خطای استاندارد میانگین SEM		2.00	1.704
		اثرات اصلی Main effects	
درصد فسفر P level	0.16 %	64.23 [b]	83.96
	0.21 %	66.49 [ab]	85.58
	0.26 %	67.97 [a]	86.17
مقدار احتمال P-value		0.049	0.391
منبع فسفر P source	مونوکلسیم فسفات MCP	67.66 [a]	84.90
	خاکستر استخوان Bone ash	64.80 [b]	85.57
مقدار احتمال P-value		0.023	0.621
		اثرات متقابل [1] Intractional	
مقدار احتمال P-value منبع فسفر × سطح فسفر P source × P level		0.774	0.912

[ab] اعداد در هر ستون با حروف متفاوت، دارای تفاوت معنادار از لحاظ آماری هستند (تست توکی P<0.05).

[۱] به‌دلیل معنادار نبودن اثرات متقابل، مقایسات میانگین اثرات متقابل گزارش نشد.

[ab] Value in each column with different letters has statistically significant differences. (Tukey's test P<0.05).

[1] Due to non-significance of interaction effects, mean comparisons of interaction effects were not reported.

Refrences

1. Akhlaghi, A., Zamiri, M. J., Jafari Ahangari, Y., Atashi, H., Ansari Pirsaraei, Z., Deldar, H., Eghbalian, A. N., Akhlaghi, A. A., Navidshad, B., & Yussefi Kelarikolaei, K. (2013). Oral exposure of broiler breeder hens to extra thyroxine modulates early adaptive immune responses in progeny chicks. *Poultry Science*, *92*, 1040-49 . https://doi.org/10.3382/ps.2012-02545 .
2. Akter, M., Graham, H., & Iji, P. A. (2016). Response of broiler chickens to different levels of calcium, non-phytate phosphorus and phytase. *British Poultry Science*, *57*, 799-809 . https://doi.org/10.1080/00071668.2016.1216943.

3. Barnett, Ellis, & Nordin, B. E. C. (1960). The radiological diagnosis of osteoporosis: A new approach. *Clinical Radiology*, *11*, 166-7 .https://doi.org/10.1016/S0009-9260(60)80012-8
4. Barshan, S., Saeedi, K., Hedayati, M., & Yari, M. (2019). Influence of bone meal degelatinisation and calcium source and particle size on broiler performance, bone characteristics and digestive and plasma alkaline phosphatase activity. *British Poultry Science*, *60*, 297-308 .https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1587151.
5. Cowieson, A. J., Acamovic, T., & Bedford, M. R. (2004). The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*, *45*, 101-08 . https://doi.org/10.1080/00071660410001668923.
6. Cowieson, A. J., Acamovic, T., & Bedford. M. R. (2006) Supplementation of corn–soy-based diets with an *Eschericia coli*-derived phytase: Effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poultry Science*, *85*, 1389-97 .https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1389.
7. Cuevas, A. C., González, E. A., Coello, C. L., & Menocal, J. A. (2019). Phosphorus bioavailability, amino acid digestibility and metabolizable energy of broiler chick diets supplemented with low-oil distiller's dried grains with solubles. *Veterinaria México*, *6*, 40-51.
8. Dilger, R. N., Onyango, E. M., Sands, J. S., & Adeola, O. (2004). Evaluation of microbial phytase in broiler diets. *Poultry Science*, 83, 962-70 .https://doi.org/10.1093/ps/83.6.962.
9. Efranji, S., Sedghi, M., Mahdavi, A. H., & Abdollahi, M. R. (2022). Effects of feed physical form and insoluble fiber during different rearing periods on productive performance, immune response, behavior, tibia indices and gastrointestinal alterations of W-36 laying pullets. *Poultry Science Journal*, *10*, 111-27.
10. Emami, N., Khodambashi, S., Naeini, Z., & Ruiz-Feria, C. A. (2013). Growth performance, digestibility, immune response and intestinal morphology of male broilers fed phosphorus deficient diets supplemented with microbial phytase and organic acids. *Livestock Science*, *157*, 506-13 .https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.08.014
11. Fenton, T. W., & Fenton, M. (1979). An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and feces. *Canadian Journal of Animal Science*, *59*, 631-34 .https://doi.org/10.4141/cjas79-081
12. Haug, Wolfgang, & Hans-Joachim Lantzsch. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *34*: 1423-26 . https://doi.org/10.1002/jsfa.2740341217
13. Imari, Zeyad k., Hassanabadi, A. & Nassiri Moghaddam, H. (2020). Response of broiler chickens to calcium and phosphorus restriction: Effects on growth performance, carcase traits, tibia characteristics and total tract retention of nutrients. *Italian Journal of Animal Science*, *19* :929 .–https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1808101
14. Kocabagli, NEŞE. (2001). The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *25*: 797-802.
15. Li, T., Guanzhong X., Yuxin S., Liyang Z., Sufen Li, Lin Lu, Zongping L., Xiudong L., & Xugang L. (2020). Dietary calcium or phosphorus deficiency impairs the bone development by regulating related calcium or phosphorus metabolic utilization parameters of broilers. *Poultry Science*, *99*: 3207-14 . https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.028.
16. Li, X, Zhang, D. & Bryden, W. L. (2017). Calcium and phosphorus metabolism and nutrition of poultry: are current diets formulated in excess? *Animal Production Science*, *57*: 2304-10.
17. Li, Xiuhua, Zhang, D. Tsung, Y. & Wayne, L. (2016). Phosphorus bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal feed resource with reference to broiler nutrition. *Agriculture*, *6*: 25 . https://doi.org/10.3390/agriculture6020025.
18. Lim T. C., Eric, Mamat H. Kamalludin, Faez F. Abdullah J., Mohd Farhan, H. R., Teck C., & Zulkifli, I. (2019). Effect of Monocalcium Phosphate Supplementation on the Growth Performance, Carcass Characteristic, Gut Histomorphology, Meat and Bone Quality of Broiler Chickens. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, *42*.
19. Liu, J.B., Chen, D. W. & Adeola, O. (2013). Phosphorus digestibility response of broiler chickens to dietary calcium-to-phosphorus ratios. *Poultry Science*, *92*: 1572-78 .https://doi.org/10.3382/ps.2012-02758.
20. Matin, N, Utterback, P. L. & Parsons, C. M. (2021). Phosphorus digestibility and relative phosphorus bioavailability in two dried black soldier fly larvae meals and a defatted black soldier fly larvae meal in broiler chickens. *Poultry Science*, *100*: 101221 .https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101221.
21. Mutuş, R., Neşe Kocabağli, Müjdat Alp, NÜKET Acar, MUSTAFA Eren, & ŞŞ Gezen. (2006). The effect of

dietary probiotic supplementation on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Poultry Science*, *85*, 1621-25 .https://doi.org/10.1093/ps/85.9.1621.

22. Nari, N., Ghasemi, H. A., Hajkhodadadi, I., & Khaltabadi Farahani, A. H. (2020). Intestinal microbial ecology, immune response, stress indicators, and gut morphology of male broiler chickens fed low-phosphorus diets supplemented with phytase, butyric acid, or Saccharomyces boulardii. *Livestock Science*, *234*, 103975 . https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.103975.
23. Onyango, E. M., Hester, P. Y., Stroshine, R., & Adeola, O. (2003). Bone densitometry as an indicator of percentage tibia ash in broiler chicks fed varying dietary calcium and phosphorus levels. *Poultry Science*, *82*, 1787-91 .https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1787
24. Pieniazek, J., Smith, K. A., Williams, M. P., Manangi, M. K., Vazquez-Anon, M., Solbak, A., Miller, M., & Lee, J. T. (2017). Evaluation of increasing levels of a microbial phytase in phosphorus deficient broiler diets via live broiler performance, tibia bone ash, apparent metabolizable energy, and amino acid digestibility. *Poultry Science*, *96*, 370-82 .https://doi.org/10.3382/ps/pew225
25. Riesenfeld, A. (1972). Metatarsal robusticity in bipedal rats. *American Journal of Physical Anthropology*, *36*, 229-33 .https://doi.org/10.1002/ajpa.1330360211
26. Rousseau, X., Anne-Sophie, V., Marie-Pierre, L. M., Nathalie, M., Estelle, G., Michel, M., Yves, N., Michel, J. D., & Agnès, N. (2016). Adaptive response of broilers to dietary phosphorus and calcium restrictions. *Poultry Science*, *95*, 2849-60 .https://doi.org/10.3382/ps/pew172
27. Sedghi, M., Sarrami, Z., Ghasemi, R., & Abbasi, M. (2023). Replacing dicalcium phosphate with bone ash in broiler diets and its effect on performance. Second International *Congress of Animal Sciences of Iran, University of Tehran, Tehran, Iran* .https://iransascongress.com (In Persian).
28. Simons, P. C. M., Versteegh, H. A. J., &Van der Klis, J. D. (1991). De beschikbaarheid van fosfor voor slachtkuikens in voederfosfaten en in dierlijke veevoedergrondstoffen. *Verslag, 93*.
29. Suttle, Neville, F. (2010). The mineral nutrition of livestock-4-th ed. *Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing*.
30. Valable, A. S., Agnès N., Jacques Duclos, M., Pomar, C., Page, G., Nasir, C., Magnin, M., & Létourneau-Montminy, M. P. (2018). Effects of dietary calcium and phosphorus deficiency and subsequent recovery on broiler chicken growth performance and bone characteristics. *Animal*, *12*, 1555-63 . https://doi.org/10.1017/S1751731117003093
31. Van Harn, J., Spek, J. W., Van Vuure, C. A., & Van Krimpen, M. M. (2017).'Determination of pre-cecal phosphorus digestibility of inorganic phosphates and bone meal products in broilers. *Poultry Science*, *96*, 1334-40 . https://doi.org/10.3382/ps/pew458
32. Walters, H. G., Coelho, M., Coufal, C. D., & Lee, J. T. (2019). Effects of increasing phytase inclusion levels on broiler performance, nutrient digestibility, and bone mineralization in low-phosphorus diets. *Journal of Applied Poultry Research*, *28*, 1210-25 .https://doi.org/10.3382/japr/pfz087

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 221-234

The Effects of Replacing Synbiotics and macroalgae *Sargassum* with Oxytetracycline on Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Morphology and Blood Serum Lipid Parameters of Broiler Chickens

Mohammad Reza Rezvani[1], Mohammad Javad Agah[2]*, Zohreh Gazor Habibabadi[3], Alidad Boostani[4], Houshang Lotfollahian[5], Ahmad Ali Sabetan Shirazi[6]

1-Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2-Associate Professor, Animal Science Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran
3-Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4-Assistant Professor, Animal Science Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.
5- Associate Professor, Animal Science Research Institute, AREEO, Karaj, Iran
6-Associate Professor, Animal Science Research Institute, AREEO, Karaj, Iran. Assistant Professor of Islamic Azad University, Fasa Branch, Iran.
*Corresponding Author's Email: mjagah1400@gmail.com

Received: 21-07-2023
Revised: 19-01-2024
Accepted: 31-01-2024
Available Online: 04-08-2024

How to cite this article:
Rezvani, M.R., Agah, M.J., Gazor Habibabadi, Z., Boostani, A.D., Lotfollahian, H., & Sabetan Shirazi, A.A. (2024). The effects of replacing synbiotics and *macroalgae Sargassum* with oxytetracycline on performance, carcass characteristics, intestinal morphology and blood serum lipid parameters of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 221-234.(in Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83425.1163

Introduction: Antibiotics have been used for many years in animal production to treat infectious diseases and as growth promoters. However, the misuse of antibiotics causes problems such as bacterial antibiotic resistance. Also, the possible accumulation of antibiotic residues in livestock products is risky for consumers. After the ban on the use of antibiotic growth promoters in 2006, there was a need to use substitutes in animal feed to replace antibiotics. These alternatives include prebiotics, probiotics, phytobiotics and synbiotics. Probiotics are live microorganisms that, when consumed in sufficient amounts, have beneficial effects on the host by creating a microbial balance in the gut. The purpose of probiotics is to create a competition between the species that are naturally present in the intestinal flora of broilers. The most important advantage of probiotics is that they do not remain in animal products. Prebiotics are feed compounds that are not digested by the host when consumed but can support beneficial bacteria. These compounds are short-chain carbohydrates such as non-digestible oligosaccharides that cannot be digested by animal enzymes. Compounds containing prebiotics and probiotics used in nutrition are called synbiotics. Phytobiotics include a wide range of plant-derived products with bioactive compounds. Plant feed additives (PFAs) are widely effective in improving gut health, increasing digestibility and thus growth performance. These bioactive compounds include secondary metabolites (phenolic and flavonoid). In recent years, various marine organisms have been considered as valuable biological compounds for livestock. Marine algae, due to a wide range of bioactive components such as flavonoid, carotenoid, phenolic compounds, tocopherol, peptide and various sulfated and carboxylated polysaccharides such as alginate and fucoidan with antibacterial, antifungal and antiviruses have beneficial effects on health. Brown macroalgae such as *Sargassum angustifolium* have beneficial effects on health due to a wide range of bioactive components such as fucoidan, fucose sulfate and polysaccharides. Also, this group of algae is a rich source of sodium alginate oligosaccharides.

Materials and Methods: The present study was conducted in the form of a completely randomized design,

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83425.1163

lasted for 42 days at the Ali Abad Kamin research farm of the Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Shiraz, Iran. A total of 240 Ross 308 broilers were distributed in five treatments, four replications and 12 birds per replication. The dietary treatments included: 1 basal diet, without additives, 2 basal diet + 0.05% Oxytetracycline, 3 basal diet + 0.2% brown algae *Sargassum* and treatments 4 and 5 the basal diet was + 1% and 1.5% of synbiotics Limax, respectively. Ingredients and chemical composition of the ration are presented in (Table 1). At the end of each period, chickens in each group were weighed and the average body weight gain (g/b) in each period was calculated. Feed intake in each period was calculated and expressed as g/b/d. Based on weight gain and feed intake in each period, the FCR values of each group were calculated. Tow representative chickens from each group were selected for carcass analysis representing the average weight and variability of each group. The data obtained on various parameters studied during this experimental trial were analyzed statistically with SAS software.

Results and Discussion: The results showed that the treatments had no significant effect on the feed conversion ratio of the birds. In the finisher period (25-42 days) and total period (1-42 days), oxytetracycline and Limax 1% treatments had the highest and lowest average daily weight gain, respectively. There wasn't any significant difference between average daily weight gain of the oxytetracycline treatment and other experimental treatments. In the finisher period, the highest amount of feed intake was for the control treatment and the lowest for the Limax 1% treatment ($P<0.05$). The highest value of production index was belonged to oxytetracycline and Limax treatments was 1.5% (295 and 272, respectively). The highest abdominal fat percentage in the day 42 was related to Oxytetracycline treatment and the lowest was related to Limax treatment of 1.5% ($P<0.05$). The highest villus width in the day 42 was belonged to Limax treatment of 1 and 1.5% and the lowest was belonged to Oxytetracycline, control and *Sargassum* treatments ($P<0.05$). The treatments did not show a significant difference in the feed conversion ratio. The highest value of production index was observed in oxytetracycline and Limex 1.5% treatments (295.25 and 271.71, respectively).

Conclusion: The final result is that the two oxytetracycline and 1.5% of synbiotics Limax treatments shown the highest average daily weight gain and the production index among the experimental treatments. Also, the maximum width of villi and its absorption surface of villus was related to Limax treatment of 1.5%. Therefore, despite the problems of using antibiotics in the diet of birds, Limax synbiotic supplement can be a suitable substitute for oxytetracycline antibiotic.

Keywords: Broiler, Brown macroalga *Sargassum*, Intestinal morphology, Performance, Synbiotics

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۳۴-۲۲۱

اثرات جایگزینی سین‌بیوتیک و ماکروجلبک *سارگاسوم* با اکسی‌تتراسایکلین بر عملکرد، ویژگی‌های لاشه، ریخت‌شناسی روده و فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی

محمد رضا رضوانی[۱]، محمد جواد آگاه[۲]*، زهره گازر حبیب آبادی[۳]، علی‌داد بوستانی[۴]، هوشنگ لطف اللهیان[۵]، احمد علی ثابتان شیرازی[۶]

تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۰۴/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی مقایسه‌ای اثرات سین‌بیوتیکی لیماکس و ماکروجلبک قهوه‌ای *سارگاسوم* به‌منظور جایگزینی با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در جیره، بر عملکرد تولیدی، ریخت‌شناسی بافت روده، ویژگی‌های لاشه و فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار، چهار تکرار و ۱۲ پرنده در هر تکرار انجام شد. تیمارها شامل: شاهد، اکسی‌تتراسایکلین ۰/۰۵ درصد، جلبک *سارگاسوم* ۰/۲ درصد، سین‌بیوتیک لیماکس با دو سطح ۱ و ۱/۵ درصد بودند. نتایج نشان داد که تیمارهای آزمایشی تأثیری بر میانگین ضریب تبدیل غذایی نداشتند. در دوره پایانی و کل دوره پرورش، به‌ترتیب تیمارهای اکسی‌تتراسایکلین و لیماکس یک درصد بیشترین (۶۵/۵۲ و ۴۹/۰۲ گرم/ پرنده/ روز) و کمترین (۵۴/۵۰ و ۴۳/۰۷ گرم/پرنده/ روز) میانگین افزایش وزن زنده را داشتند (P<۰/۰۵)، تفاوت میانگین افزایش وزن روزانه سایر تیمارهای آزمایشی با تیمار اکسی‌تتراسایکلین معنی‌دار نبود. با تفکیک لاشه، کمترین میزان چربی حفره شکمی در تیمار لیماکس ۱/۵ درصد (۰/۸۸ درصد) و بیشترین آن در تیمار اکسی‌تتراسایکلین (۱/۷۱ درصد) مشاهده شد. با بررسی بافت شناسی روده، بیشترین عرض پرز ژژنوم در دو سطح سین‌بیوتیک لیماکس ۱ و ۱/۵ درصد و کمترین آن در شاهد، اکسی‌تتراسایکلین و *سارگاسوم* مشاهده شد. میانگین افزایش وزن روزانه و شاخص تولید دو تیمار اکسی‌تتراسایکلین و لیماکس ۱/۵ درصد، بیشترین مقدار را در بین تیمارهای آزمایشی داشتند. همچنین، بیشترین عرض پرزها و در نتیجه، سطح جذبی آن مربوط به تیمار لیماکس ۱/۵ درصد بود. بنابراین، با وجود مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره پرندگان، مکمل سین‌بیوتیکی لیماکس می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین باشد.

واژه‌های کلیدی: جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم*، جوجه گوشتی، ریخت‌شناسی روده، سین‌بیوتیک، عملکرد

مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد، نزدیک به چندین دهه است که جهت بهبود عملکرد و سلامت پرندگان در صنعت مرغ گوشتی به‌صورت درمانی رایج شده است. با این حال، استفاده از این ترکیب‌ها سبب ایجاد مشکلاتی چون مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریای، کاهش کارایی سامانه ایمنی، عفونت ثانویه و تجمع مواد باقی‌مانده در فرآورده‌های مورد استفاده انسان می‌شود که برای مصرف‌کنندگان خطرناک است. پس از تصویب ممنوعیت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها توسط اتحادیه اروپا در ژانویه ۲۰۰۶ موارد مؤثری جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها شامل پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، سین‌بیوتیک‌ها و فایتوبیوتیک‌ها به‌عنوان عوامل ضد باکتری و مؤثر بر عملکرد رشد حیوان بررسی و پیشنهاد شده است (Al-Khalaifa *et al.*, 2019).

سین‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک ماده افزودنی خوراک از ترکیب همزمان پروبیوتیک و پری‌بیوتیک تشکیل شده‌اند. سین‌بیوتیک مورد مطالعه در پژوهش حاضر، مخلوطی از ریزجانداران

۱- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲- دانشیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.
۳- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.
۵- دانشیار مؤسسه تحقیقات علوم دامی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۶- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد فسا، فسا، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mjagah1400@gmail.com)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.83425.1163

(میکرواورگانیسم‌ها) با خاصیت پروبیوتیکی، دیواره سلولی مخمر به‌عنوان جز پری‌بیوتیکی و عصاره پوست مرکبات با خاصیت فیتوبیوتیکی است. پوست مرکبات حاوی غلظت بالایی از ترکیبات فنلی و منبعی غنی از فلاونوئیدهای طبیعی است. فلاونوئیدهای مرکبات به‌عنوان عوامل مؤثر در داخل بدن قادر به تعدیل سوخت و ساز کبدی لیپید می‌باشند. این ترکیب‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشای داخلی باکتریایی، از بین بردن پتانسیل غشا و کاهش تولید ATP، همچنین سبب مهار فرآیند DNA و RNA در باکتری می‌شوند (Rafiq *et al.*, 2018). در پژوهشی، سین‌بیوتیک متشکل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و فروکتوالیگوساکارید در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اورئومایسین جهت بررسی عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی در جوجه‌های گوشتی مورد استفاده قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده، افزودن سین‌بیوتیک بر عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی تأثیر معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده پتانسیل آن برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه جوجه‌های گوشتی است (Song *et al.*, 2022).

اثر بهبوددهندگی رشد ارگانیسم‌ها و گیاهان دریایی از جمله جلبک‌ها برای سلامت و تقویت عملکرد حیوان به‌دلیل فعالیت‌های ضد باکتریایی ثابت شده است. این موجودات منبعی از ترکیب‌های فعال زیستی با طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی همچون اثر پادزیستی محرک رشد، پاداکسندگی و ضد التهابی هستند. در این میان، بزرگ جلبک‌ها منبع ویژه‌ای از این ترکیبات ثانویه را به خود اختصاص می‌دهند. *سارگاسوم آنگوستیفولیوم*[1]، بزرگ جلبک دریایی قهوه‌ای منبع غنی از ترکیب‌های فعال زیستی مثل فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدهای سولفاته (فوکوئیدان یا فوکوز سولفاته)، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، پپتیدها و پلی‌ساکاریدهای کربوکسیله مانند آلژینات (آلژینیک اسید، لامیناریان و گلوکان) و اولوان با مزایای سلامتی اثبات شده، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. پلی‌فنل‌های گزارش شده در این بزرگ جلبک‌ها، پلیمرهای فلاونوئیدها و فلروتانن‌ها هستند که به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی عمل می‌کنند. در بین پلی‌ساکاریدهای مختلف، فرم سولفاته مانند فوکویدان، فوکان سولفات و اولوان از نظر ارزش زیستی بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است. پتانسیل سرکوب رشد باکتری‌هایی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* برای فوکوئیدان‌های جدا شده از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای گزارش شده است (Ganesan *et al.*, 2019; Sanjeewa & Jeon, 2018). اولیگوساکاریدهای آلژینات غیراشباع فعالیت‌های فیزیولوژیکی متنوعی، مانند افزایش فاگوسیتوز ماکروفاژها و اثر بر رشد باکتری‌هایی همچون *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیل* را از خود نشان دادند. خاصیت آلژینات به گونه جلبک و نوع آلژینات موجود در آن‌ها بستگی دارد، یکی از منابع تجاری اصلی آلژینات‌ها، گونه *سارگاسوم* است (Borazjani *et al.*, 2018). الیگوساکاریدهای سدیم آلژینات جلبک قهوه‌ای، در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی در معرض *سالمونلا اینتریکا* (*Salmonella enterica*) سبب کاهش مرگ‌ومیر ناشی از عفونت سالمونلا، افزایش تولید IgA اختصاصی *سالمونلا انتریتیدیس* در سکوم و افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در سکوم شد (Yan *et al.*, 2011). همچنین، بررسی فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی جلبک دریایی قهوه‌ای (*Sargassum wightii*) در جیره جوجه‌های گوشتی علیه بیمارگرهای مختلف کاهش قابل توجه ۴۰-۷۵ درصد بیوفیلم توسط باکتری‌های گرم منفی و اثر مهاری را بر باکتری‌های بیمارگر را نشان داد (Suganya *et al.*, 2019). این جلبک دریایی توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان بوشهر تحت شماره ۲۶۶۲ شناسایی و ثبت شده است (Mehdinezhad *et al.*, 2016).

بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سین‌بیوتیکی مکمل لیماکس و ماکرو جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم* به‌منظور جایگزینی با آنتی بیوتیک محرک رشد اکسی‌تتراسایکلین در جیره، بر عملکرد تولیدی، خصوصیات لاشه، ریخت‌شناسی روده و فراسنجه‌های خونی جوجه های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سالن تحقیقاتی پرورش جوجه گوشتی ایستگاه تحقیقات و آموزش علی‌آباد کمین شهرستان پاسارگارد، انجام شد. تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی سویه راس ۳۰۸ (از مخلوط دو جنس) در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تیمار با چهار تکرار و هر تکرار دارای ۱۲ پرنده در ۲۰ واحد آزمایشی قرار گرفتند. تیمارها شامل: گروه شاهد (جیره بر پایه ذرت و کنجاله سویا)، گروه اکسی‌تتراسایکلین (جیره پایه + ۰/۰۵ درصد اکسی‌تتراسایکلین)، گروه جلبک قهوه‌ای (جیره پایه + ۰/۲ درصد جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم*)، گروه لیماکس یک درصد (جیره پایه + یک درصد سین‌بیوتیک لیماکس) و گروه لیماکس ۱/۵ درصد (جیره پایه + ۱/۵ درصد سین‌بیوتیک لیماکس) بودند. جیره‌های یکسان از لحاظ انرژی و پروتئین، بر اساس راهنمای پرورش ۲۰۱۹ راس ۳۰۸ با نرم‌افزار UFFDA تنظیم شد (جدول ۱). افزودنی‌های خوراک پس از آماده‌سازی جیره پایه به آن اضافه شد.

بزرگ جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم آنگوستیفولیوم* (حاوی اسیدهای امگا ۳ و امگا ۶، مواد معدنی در محدوده ۱۴ تا ۳۵ درصد ماده خشک و ترکیبات زیست فعال ثانویه فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدهای سولفاته فوکوئیدان، کاروتنوئیدها، پپتیدها و پلی‌ساکاریدهای کربوکسیله آلژینات) از شرکت دانش بنیان ذخایر جلبک فارس واقع در پارک علم

1- *Sargassum angustifolium*

و فناوری شیراز تهیه شد که پس از خالص‌سازی و جدا کردن ناخالصی‌های همراه محصول (صدف و سنگ‌ریزه) به‌صورت پودر درآمد. سین‌بیوتیک مصرفی با نام تجاری لیماکس[1] از انجمن علوم دامی کرمان تهیه شد. این محصول حاوی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتروم، باسیلوس لچینی فرمیس، باسیلوس سابتیلیس، انتروکوکوس فاسالیس، استرپتوکوکوس درموفیلوس* (1×10^{10} cfu)، همچنین مخمر و پوست خشک مرکبات به‌عنوان منبع فراوانی از فنل و فلاونوئیدها می‌باشد. همچنین، ترکیبات شیمیایی آن شامل ۹۴/۲ درصد ماده خشک، ۱۱ درصد پروتئین خام، ۲ درصد چربی، ۳/۵ درصد خاکستر و ۱۰/۲ درصد فیبرخام می‌باشد.

در این پژوهش، برنامه نوری به این ترتیب بود که سه روز اول دوره پرورش ۲۴ ساعت روشنایی اعمال شد. در ادامه، ساعات خاموشی به‌صورت افزایشی ادامه یافت؛ به‌طوری‌که از روز پنجم تا دهم، با چهار ساعت خاموشی، از روز ۱۱ تا ۱۵ با پنج ساعت خاموشی و از روز ۱۶ تا ۲۱ با شش ساعت خاموشی اعمال شد. سپس، از روز ۲۲ دوره پرورش، ساعات خاموشی به‌صورت متناوب کاهش یافت. به این ترتیب که از روز ۲۲ تا ۲۸ چهار ساعت خاموشی، از روز ۲۹ تا ۳۳، سه ساعت خاموشی، از روز ۳۳ تا ۳۸، دو ساعت خاموشی و از روز ۳۹ تا پایان دوره پرورش، به‌صورت ثابت یک ساعت خاموشی در سالن اعمال شد (Rahmani *et al.*, 2010).

دمای روزانه بر اساس راهنمای شرکت راس تنظیم و دمای اولیه ورود جوجه‌ها به سالن ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود. ثبت خوراک مصرفی و وزن بدن پرندگان در مقاطع تغییر جیره‌های آغازین، رشد و پایانی، با ترازوی دیجیتال با دقت ۱۰ ± گرم انجام شد. میانگین خوراک مصرفی روزانه هر مرغ، بر اساس روز مرغ با احتساب تلفات محاسبه شد. جهت محاسبه شاخص‌های عملکردی شامل افزایش وزن روزانه، مصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل خوراک از وزن بدن و خوراک مصرفی روزانه استفاده شد. محاسبه شاخص تولید با ثبت تعداد تلفات و محاسبه درصد ماندگاری در هر تیمار و هر تکرار با تاریخ انجام شد.

در پایان دوره پرورش (۴۲ روزگی)، از هر واحد آزمایشی دو پرنده (خروس و مرغ) با میانگین وزنی نزدیک به وزن واحد آزمایشی مربوطه کشتار شده و صفات لاشه شامل درصد وزن نسبی (لاشه، ران، سینه، پشت، چربی حفره بطنی و روده خالی) به وزن زنده محاسبه شد.

معادله (۱)

۱۰۰ × (تعداد پرنده در روز اول دوره ÷ تعداد پرنده زنده در پایان دوره) = درصد ماندگاری

((تعداد روزهای پرورش× ضریب تبدیل غذایی) / (میانگین وزن به کیلوگرم × درصد ماندگاری)) = شاخص تولید×۱۰۰

1- LIMAX

به‌منظور تعیین غلظت لیپیدهای خون در پایان دوره (۴۲ روزگی) از هر واحد آزمایشی از دو پرنده نمونه خون اخذ شد. نمونه‌های سرم خون به‌کمک دستگاه سانتریفوژ جدا و در میکروتیوب‌های ۰/۵ سی‌سی تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از جداسازی سرم، مقدار کلسترول کل، لیپوپروتئین با چگالی پایین LDL، لیپوپروتئین با چگالی بالا HDL و تری‌گلیسرید هر نمونه پس از یخ‌گشایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری، اتوآنالیزر مدل بیوسیستم اسپانیا-15A و با استفاده از کیت تجاری زیست شیمی اندازه‌گیری شد.

به‌منظور بررسی مخاط ژژنوم، در سن ۴۲ روزگی از هر تکرار یک پرنده کشتار و محتویات داخل بدن تخلیه و از قسمت میانی ژژنوم یک نمونه بافتی به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر تهیه شده و با محلول سالین ۰/۹ درصد برای حذف بقایای مواد غذایی شسته و در فرمالین ۱۰ درصد برای مطالعه بافت تثبیت شد. پس از تهیه بلوک‌های پارافینی، نمونه‌های بافت روده با ضخامت پنج میکرومتر با استفاده از میکروتوم نیمه اتومات روی اسلاید شیشه‌ای قرار گرفته و با هماتوکسیلین‌ائوزین رنگ‌آمیزی شد. اندازه‌گیری‌های ریخت‌شناسی پرزهای روده روی ۱۰ پرز سالم انتخاب شده از هر نمونه اندازه‌گیری شد. شاخص‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی شامل طول پرز (نوک پرز تا محل اتصال کریپت)، عرض پرز (متوسط عرض پرز در ابتدا، وسط و انتهای پرز)، عمق غدد لیبرکون یا کریپت (پایه پرز تا لایه زیر مخاط) اندازه‌گیری شده و سطح جذبی پرزها محاسبه شد (Sakamoto *et al.*, 2000).

معادله (۲)

(۲ ÷ میانگین عرض پرز) × (میانگین طول پرز) × (π۲) = سطح جذبی پرزها

در این پژوهش، از مدل طرح کاملاً تصادفی، با پنج تیمار و چهار تکرار به شرح ذیل استفاده شد. داده‌ها در رویه GLM از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) با استفاده از آزمون تجزیه واریانس و دانکن واکاوی شدند. تیمارها در سطح پنج درصد مقایسه شدند. آزمون نرمال بودن باقی‌مانده‌ها برای همه صفات انجام شد.

معادله (۳)

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

که در آن، Y_{ij}: مشاهدات آزمایش، μ: میانگین مشاهدات، t_i: اثر تیمار و e_{ij}: خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

تأثیر سین‌بیوتیک لیماکس و جلبک قهوه‌ای *سارگاسوم* بر میانگین خوراک مصرفی و افزایش وزن زنده در جدول ۲، ضریب تبدیل خوراک و شاخص تولید در جدول ۳ آورده شده است. در دوره پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) بیشترین مقدار خوراک مصرفی مربوط به

شاهد و کمترین آن برای تیمار لیماکس یک درصد بود (P<۰/۰۵)، هر چند بر اساس آزمون دانکن، در کل دوره پرورشی (۰ تا ۴۲ روزگی) نیز از لحاظ عددی همین روند مشاهده شد، امّا تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

جدول ۱- اجزا و ترکیبات شیمیایی جیره پایه مورد استفاده در سنین مختلف برای جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸

Table 1- Diet formulation and calculated chemical composition of the basal ration (as fed)

اجزای جیره (درصد) Feed ingredient (%)	جیره آغازین Starter diet (1-10 days)	جیره رشد Growth diet (11-24 days)	جیره پایانی Finisher diet (25-42 days)
ذرت Corn	57.90	60.20	61.20
کنجاله سویا (44% پروتئین) Soybean meal (CP %44)	33.20	31.00	31.00
گلوتن ذرت (60% پروتئین) Soybean meal (CP %60)	3.90	3.00	1.50
دی کلسیم فسفات Di calcium phosphate	1.87	1.60	1.45
نمک Salt	0.36	0.33	0.32
بیکربنات سدیم Sodium bicarbonate	0.11	0.11	0.11
ال- ترئونین L-threonine	0.06	0	0
ال- لیزین هیدرو کلراید L- lysine hydrochloride	0.30	0.18	0.06
دی ال- متیونین DL- methionine	0.19	0.20	0.18
روغن سویا Soy oil	0.40	1.80	2.63
کربنات کلسیم Calcium carbonate	1.21	1.08	1.05
مکمل ویتامینی و معدنی[1] Vitamin and mineral premix[1]	0.50	0.50	0.50
ترکیب شیمیایی محاسباتی (%) Calculated chemical composition			
انرژی قابل سوخت و ساز ME (kcal/kg)	2880	2993	3039
پروتئین خام Crude protein (%)	22.35	20.90	19.96
کلسیم Calcium (%)	0.99	0.86	0.81
فسفر قابل دسترس Available phosphorous (%)	0.48	0.43	0.40
متیونین + سیستین Methionine + cysteine (%)	1.02	0.90	0.82
لیزین کل Lysine (%)	1.36	1.18	1.04
سدیم Sodium (%)	0.19	0.18	0.17
تعادل کاتیون آنیون جیره (mEq/kg) DCAB	287	280	285

[1] مکمل ویتامینی و معدنی در هر کیلوگرم خوراک مقادیر زیر را تأمین می‌نمود: ویتامین A، ۱۱۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ کوله کلسیفرول، ۲۳۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E، ۱۲۱ واحد بین‌اللملی؛ ویتامین K_3، دو میلی‌گرم؛ ویتامین B_{12}، ۰/۰۲ میلی‌گرم؛ تیامین، چهار میلی‌گرم؛ ریبوفلاوین، چهار میلی‌گرم؛ اسید فولیک، یک میلی‌گرم؛ بیوتین، ۰/۰۳ میلی‌گرم؛ پیرودوکسین، چهار میلی‌گرم؛ کولین کلراید، ۸۴۰ میلی‌گرم؛ اتوکسی کوئین، ۰/۱۲۵ میلی‌گرم؛ سولفات منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ سلنیوم (سلنات سدیم)، ۰/۲ میلی‌گرم؛ ید، یک میلی‌گرم؛ سولفات مس، ۱۰۰ میلی‌گرم؛ آهن، ۵۰ میلی‌گرم بود.

[1] Vitamin and Mineral premix supplied per kilogram of diet: A 11000, IU; D_3, 2300 IU; E, 121 IU; K_3, 2 mg; B_{12}, 0.02 mg; B_1, 4 mg; B_2, 4 mg; B_9, 1 mg; Biotin, 0.03 mg; B_6, 4 mg; Choline chloride, 840 mg; Ethoxyquin, 0.125 mg; Manganese sulphate, 100 mg; Se (Sodium Selenate), 0.2 mg; I, 1 mg; copper sulphate, 100 mg; Fe, 50 mg.

در راستای نتایج پژوهش حاضر، چوی و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Choi *et al.*, 2014) در کل دوره پرورش تفاوت معنی‌داری بین عملکرد رشد و مصرف خوراک روزانه تیمار جلبک دریایی قهوه‌ای و شاهد مشاهده نکردند؛ امّا در پژوهش بای و همکاران در سال ۲۰۱۹ (Bai *et al.*, 2019) مصرف خوراک روزانه در جیره حاوی جلبک دریایی در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان داد. همچنین، خوراک مصرفی روزانه جوجه‌ها با استفاده از مکمل پروبیوتیک پروتکسین و مولتی‌بهسیل در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌دار را در کل دوره پرورش نشان داد (P<۰/۰۵) (Agah *et al.*, 2020). نتایج مصرف سین‌بیوتیک‌ها در مطالعه سانگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ (Song *et al.*, 2022) نشان داد که میانگین مصرف خوراک روزانه برای جوجه‌های گروه سین‌بیوتیک طی روزهای ۱ تا ۲۱ روزگی دوره پرورش در مقایسه با جوجه‌های گروه مصرف‌کننده آنتی‌بیوتیک، افزایش یافت (P<۰/۰۵)، هر چند که از این نظر، تفاوت معنی‌داری در کل دوره پرورش مشاهده نشد. سایر پژوهشگران نیز گزارش کردند در طول دوره پرورش، مصرف خوراک تحت تأثیر اسانس آویشن و فیتوبیوتیک‌های دانه انگور قرار نگرفت (Wade *et al.*, 2018). در این شرایط می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره با بهبود بهره‌وری استفاده از خوراک، سبب کاهش میزان خوراک مصرفی می‌شوند، امّا باید توجه داشت که شرایط متفاوت پرورش و سطوح مورد استفاده از این ترکیبات در جیره نیز سبب ایجاد تفاوت در عملکرد پرنده می‌شود (Song *et al.*, 2022). در پژوهش حاضر، نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری بین میانگین افزایش وزن زنده تیمارهای مختلف در دوره‌های آغازین و رشدی نشان نداد (P>۰/۰۵)، امّا در دوره پایانی و کل دوره پرورشی تأثیر تیمارهای آزمایشی بر افزایش وزن روزانه معنی‌دار شد (P<۰/۰۵)، به‌گونه‌ای که گروه اکسی‌تتراسایکلین بیشترین میانگین افزایش وزن زنده (به‌ترتیب ۶۵/۵۲ و ۴۹/۰۲ گرم/پرنده/روز) و گروه لیماکس یک درصد کمترین میانگین افزایش وزن زنده (به‌ترتیب ۵۴/۵۰ و ۴۳/۰۷ گرم/پرنده/روز) را داشتند، اختلاف میانگین افزایش وزن سایر تیمارهای آزمایشی با گروه اکسی‌تتراسایکلین معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در پژوهش حاضر، آنالیز واریانس در هیچ یک از دوره‌های پرورشی اختلاف معنی‌داری بین ضریب تبدیل غذایی تیمارهای آزمایشی مختلف نشان نداد (P>۰/۰۵). امّا تأثیر تیمارهای آزمایشی بر مقدار شاخص تولید در پایان دوره پرورشی معنی‌داری شد (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که بیشترین مقدار شاخص تولید مربوط به تیمارهای اکسی‌تتراسایکلین و لیماکس ۱/۵ درصد (به‌ترتیب ۲۹۵/۲۵ و ۲۷۱/۷۱) بود. در توافق با نتایج پژوهش حاضر، در تیمارهای حاوی جلبک دریایی قهوه‌ای در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری بین افزایش وزن روزانه جوجه‌ها مشاهده نشد (Choi *et al.*, 2014). در پژوهشی دیگر، تأثیر فلاونوئیدهای حاصل از دانه انگور با خاصیت فیتوبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد، بر افزایش وزن روزانه جوجه‌های گوشتی در کل دوره پرورش معنی‌داری نشد (Vlaicu *et al.*, 2017). این عدم وجود تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و شاهد می‌تواند ناشی از شرایط پرورش بدون چالش از جمله تنش‌های گرمایی، بیماری و سایر تنش‌های محیطی باشد. به نظر می‌رسد که در شرایط چالشی مختلف در طول دوره پرورش و اثرات منفی که این چالش‌ها بر سامانه ایمنی، عملکرد دستگاه گوارش و عملکرد پرورشی پرنده دارد، اثرات مثبت استفاده از ترکیبات سین‌بیوتیکی و پروبیوتیکی از طریق افزایش دادن تولید باکتریوسین‌ها و کلی‌سین‌ها و بهبود پاسخ ایمنی روده‌ای مشهودتر باشد (Al-Khalaifa *et al.*, 2019). در پژوهش فاضل‌نیا و همکاران در سال ۲۰۲۱ (Fazelnia *et al.*, 2021) نیز چالش جوجه‌های گوشتی با سالمونلا باعث کاهش شاخص تولید، افزایش وزن روزانه و افزایش عددی ضریب تبدیل غذایی شد. درحالی‌که افزودن مکمل غذایی با خصوصیات پروبیوتیکی و سین بیوتیکی توانست منجر به بهبود افزایش وزن روزانه، شاخص تولید و پاسخ ایمنی برای مقابله با چالش‌های عفونی در جوجه‌های گوشتی شود. هر چند، نتایج پژوهش‌های مختلف بهبود ضریب تبدیل خوراک را در تیمارهای سین‌بیوتیک و فیتوبیوتیک در مقایسه با تیمار آنتی‌بیوتیک را گزارش کردند (Abdel-Wareth *et al.*, 2019)؛ امّا همسو با نتایج پژوهش حاضر، سانگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ (Song *et al.*, 2022) تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای شاهد، سین‌بیوتیک و آنتی‌بیوتیک برای ضریب تبدیل خوراک گزارش نکردند. چنین نتایج متنوعی ممکن است از تعداد و انواع مختلف ریزجانداران گوارشی موجود در مطالعات مختلف ناشی شود که معمولاً اندازه‌گیری نمی‌شوند (Wade *et al.*, 2018).

نتایج جدول ۴ نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تیمارهای آزمایشی بر درصد چربی حفره شکمی بود. به‌طوری‌که بیشترین درصد چربی حفره شکمی (۱/۷۱ درصد) در تیمار اکسی‌تتراسایکلین و کمترین آن (۰/۸۸ درصد) در تیمار ۱/۵ درصد لیماکس مشاهده شد. امّا بین تیمارهای سین‌بیوتیک ۱ و ۱/۵ درصد و جلبک *سارگاسوم* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. پژوهش‌های دیگری در تأیید این نتایج، کمترین درصد چربی حفره شکمی نسبت به وزن زنده را در گروه سین‌بیوتیک و پروبیوتیک و بیشترین میزان را در گروه آنتی‌بیوتیک گزارش کردند (Abdel-Wareth *et al.*, 2019; Tayeri *et al.*, 2018). در پژوهش‌های دیگری نیز تیمارهای فیتوبیوتیک درصد چربی حفره شکمی کمتری را نسبت به گروه شاهد نشان دادند (Petricevic *et al.*, 2018). برخلاف نتایج پژوهش حاضر، درصد چربی حفره شکمی

در گروه تغذیه شده با جلبک دریای قهوه‌ای به‌صورت معنی‌دار کمتر از گروه شاهد گزارش شد (Reski *et al.*, 2021). کاهش چربی حفره شکمی می‌تواند ناشی از تأثیر فلاونوئیدهای پوست مرکبات موجود در سین‌بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه باشد که سبب ایجاد تعدیل در متابولیسم کبدی لیپید می‌شوند و از انباشته شدن چربی در حفره شکمی جلوگیری می‌کند (Rafiq *et al.*, 2018).

جدول ۲- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میانگین خوراک مصرفی و افزایش وزن روزانه جوجه‌های گوشتی (گرم/پرنده/روز)

Table 2- The effect of experimental treatments on feed intake and Body weight gain of broilers (g/b/d)

تیمارها Treatments	خوراک مصرفی Feed intake				افزایش وزن زنده Body weight gain			
	1-10 days	11-24 days	25-42 days	0-42 days	1-10 days	11-24 days	25-42 days	0-42 days
شاهد Control	29.25	74.42	131.07 [a]	87.95 [a]	20.20	45.82	60.50 [ab]	46.00 [ab]
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	30.02	77.25	125.32 [ab]	86.60 [a]	21.22	47.67	65.52 [a]	49.02 [a]
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	29.20	76.52	124.22 [ab]	85.70 [ab]	20.30	47.40	59.87[ab]	46.30 [ab]
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	29.65	73.65	113.02[b]	80.05 [b]	20.47	44.45	54.50 [b]	43.07 [b]
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	30.80	79.83	117.67 [b]	84.38 [ab]	21.48	48.43	58.80 [ab]	46.43 [ab]
SEM[1]	0.394	0.799	1.696	0.896	0.289	0.519	0.951	0.532
P-value	0.689	0.168	0.035	0.091	0.546	0.162	0.035	0.045

در هر ستون، اعداد با حروف غیر مشترک، دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Mean within the same row with different letters significantly (P<0.05).

میانگین خطای استاندارد

[1] SEM: Standard Error of Mean

جدول ۳- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ضریب تبدیل خوراک و شاخص تولید

Table 3- The effect of experimental treatments on feed conversion ratio and Production index

تیمارها Treatments	ضریب تبدیل خوراک Feed conversion ratio				شاخص تولید Production index
	1-10 days	11-24 days	25-42 days	0-42 days	
شاهد Control	1.44	1.62	2.18	1.82	254.23 [b]
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	1.41	1.62	1.92	1.70	295.25 [a]
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	1.43	1.61	2.07	1.77	255.60 [b]
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	1.45	1.65	2.07	1.78	247.34 [b]
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	1.44	1.65	2.00	1.75	271.71 [ab]
SEM[1]	0.011	0.009	0.038	0.017	4.702
P-value	0.8766	0.4544	0.2919	0.2726	0.0381

[1] SEM: Standard Error of Mean

میانگین خطای استاندارد

در پژوهش حاضر (جدول ۴)، تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر درصد وزن نسبی ترکیب لاشه (لاشه خالی بدون پوست، سینه، ران، گردن و پشت) و اندام‌های داخلی (سنگدان، کبد، پانکراس، بورس فابریسیوس و طحال) جوجه‌های گوشتی نداشتند. در راستای

نتایج ما، جیره‌های حاوی سین‌بیوتیک در مقایسه با سایر گروه‌ها درخصوص درصد وزن نسبی به وزن زنده (کبد، قلب، سنگدان، طحال و پانکراس) تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (Song *et al.*, 2022; Abdel-Wareth *et al.*, 2019)، همچنین در مورد صفات لاشه و اندام‌های داخلی (درصد ران، پشت و بال، سنگدان، چربی حفره بطنی، بورس، طحال و طول نسبی بخش‌های مختلف روده کوچک) در جیره‌های حاوی مکمل پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند (Agah *et al.*, 2020). امّا در تضاد با نتایج پژوهش حاضر، تیمار سین‌بیوتیک به‌طور قابل توجهی سبب افزایش خطی درصد وزن نسبی عضله سینه و ران در سن ۳۵ روزگی شد (Abdel-Wareth *et al.*, 2019). همچنین، افزایش معنی‌دار درصد لاشه خالی و درصد وزن نسبی عضله سینه نسبت به وزن زنده در گروه‌های تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد گزارش شد (Agah *et al.*, 2020). بهبود عملکرد و خصوصیات لاشه با استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی ممکن است به‌دلیل افزایش قابلیت هضم خوراک رخ دهد، زیرا مکمل‌های پروبیوتیکی توانایی افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را دارند و از طریق ارتقای جمعیت میکروبی مفید روده، باعث بهبود سلامت روده میزبان می‌شوند (Tayeri *et al.*, 2018). محققان در زمینه استفاده از جلبک دریایی قهوه‌ای نیز تفاوت معنی‌داری بین میانگین وزن اندام‌های داخلی گروه‌های تغذیه شده با جلبک و آنتی‌بیوتیک مشاهده نکردند (Choi *et al.*, 2014). امّا تایری و همکاران در سال ۲۰۱۸ (Tayeri *et al.*, 2018) وزن نسبی سبک‌تری برای طحال پرندگان تغذیه شده با تیمار سین‌بیوتیک در مقایسه با تیمارهای شاهد و آنتی‌بیوتیک گزارش کردند. تغییر در اندازه طحال یکی از ارگان‌های مرتبط با پاسخ ایمنی در تیمار سین‌بیوتیک، ممکن است به‌دلیل فعال کردن سلول‌های دندریتیک در تکه‌های پیر که تحریک‌کننده لنفوسیت‌های T هستند، باشد که سبب تأثیر بر عملکرد سیستم ایمنی می‌شود و یا ممکن است نتیجه تحریک مستقیم تکثیر سلول‌های B طحال و ساخت ایمونوگلوبولین باشد (Tayeri *et al.*, 2018).

جدول ٤- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ترکیب لاشه جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی (گرم/۱۰۰ گرم وزن بدن)

Table 4- The effect of experimental treatments on carcass composition of broiler at 42 days (g/100 g of body weight)

تیمارها Treatments	لاشه بدون پوست Carcass without skin	سینه Thigh	ران Breast	گردن و پشت Neck and back	چربی شکمی Abdominal fat	سنگدان Gizard	کبد Liver	پانکراس Pancreas	بورس فابریسیوس Bursa of Fabriciuse	طحال Spleen
شاهد Control	63.46	19.96	21.05	21.73	1.10[ab]	1.47	1.89	0.275	0.228	0.115
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	63.88	21.01	21.55	21.40	1.71[a]	1.52	1.88	0.228	0.193	0.105
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	65.69	21.80	21.37	21.24	1.45[ab]	1.46	1.72	0.215	0.185	0.103
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	62.32	19.38	21.68	21.91	1.23[ab]	1.70	1.78	0.233	0.190	0.085
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	63.81	20.33	20.12	21.96	0.88[b]	1.75	1.97	0.275	0.198	0.095
SEM[1]	0.468	0.789	0.241	0.090	0.083	0.043	0.057	0.008	0.011	0.006
P-value	0.526	0.310	0.300	0.823	0.054	0.154	0.677	0.102	0.740	0.363

در هر ستون، اعداد با حروف غیر مشترک، دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Mean within the same row with different letters significantly (P<0.05).

میانگین خطای استاندارد

[1] SEM: Standard Error of Mean

نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که در رابطه با نسبت طول قسمت‌های مختلف روده به وزن زنده، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. امّا در تضاد با یافته‌های ما، غلظت‌های متفاوت فیتوبیوتیک‌های عصاره هسته انگور و روغن گل‌رز در سن ۴۲ روزگی سبب بروز تفاوت معنی‌داری در نسبت طول ژژنوم و ایلئوم به وزن زنده شد، با این حال، نسبت طول دئودنوم به وزن زنده تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. طول ژژنوم بالاترین میزان را در گروه شاهد و کمترین میزان را در سه سطح فیتوبیوتیک داشت، نتایج در مورد طول ایلئوم نیز مشابه نتایج ژژنوم گزارش شد (Brenes *et al.*, 2010; Vlaicu *et al.*, 2017). چنین نتایج متنوعی ممکن است از

تعداد و انواع مختلف ریزجانداران گوارشی موجود در مطالعات مختلف ناشی شود که معمولاً اندازه‌گیری نمی‌شوند.

جدول ۵- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر نسبت طول روده به وزن زنده در سن ۴۲ روزگی (سانتی‌متر/ ۱۰۰ گرم وزن بدن)

Table 5- The effect of experimental treatments on the ratio of intestinal length to live weight at the age of 42 days (cm/100 g of body weight)

تیمارها Treatments	طول ایلئوم Length of ileum	طول ژژنوم Length of jejunum	طول دئودنوم Length of duodenum
شاهد Control	3.70	3.47	1.43
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	3.48	3.16	1.26
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	3.38	3.37	1.45
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	3.71	3.46	1.41
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	3.77	3.63	1.35
SEM[1]	0.077	0.083	0.034
P-value	0.792	0.521	0.463

[1] SEM: Standard Error of Mean

میانگین خطای استاندارد

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میانگین فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی در جدول ۶ آمده است. فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون شامل تری‌گلیسیرید، لیپوپروتئین با چگالی بالا HDL، لیپوپروتئین با چگالی پایین LDL و کلسترول تام هیچ‌کدام تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. شاخص‌های بیوشیمیایی سرم طیور توسط عوامل ژنتیکی و محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، خوراک یکی از عوامل محیطی است که تأثیر بیشتری بر سوخت و ساز لیپید و کلسترول دارد (Dev *et al.*, 2020). پژوهشگران، نتایج متفاوتی را در استفاده از سین‌بیوتیک و جلبک‌ها بر فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی گزارش کردند، به‌طوری‌که براساس پژوهش‌های پیشین کاربرد جیره‌های حاوی مکمل سین‌بیوتیک، مقدار LDL و جیره‌های حاوی مقادیر مشترک مونوالیگوساکارید و لاکتوباسیلوس به‌عنوان سین‌بیوتیک، غلظت LDL و HDL سرم خون جوجه‌های گوشتی را تحت تأثیر قرار نداد (Ashayerizadeh *et al.*, 2009). همچنین، استفاده از مکمل پروبیوتیکی و آنتی‌بیوتیک تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون جوجه‌های گوشتی نشان نداد (Jangjoo *et al.*, 2021). امّا در پژوهشی دیگر، غلظت کلسترول‌کل و تری‌گلیسیرید سرم در جیره حاوی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و مقادیر مشترک مونوالیگوساکارید و لاکتوباسیلوس به‌عنوان سین‌بیوتیک در مقایسه با گروه شاهد کاهش و غلظت HDL افزایش یافت، این در حالی است که غلظت LDL تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (Abd El-Hady *et al.*, 2022; Dev *et al.*, 2020). جلبک کرولا، *اسپیرولینا پلاتنسیس* فیکوسیانین، سین‌بیوتیک و جلبک قهوه‌ای غلظت سرمی کلسترول، LDL و تری‌گلیسیرید را کاهش داد، امّا HDL تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (El-Naga *et al.*, Abdel-Wareth *et al.*, 2019; 2018; Omar *et al.*, 2022). جلبک‌های قهوه‌ای به‌دلیل وجود استرول‌ها و پلی‌ساکاریدهایی همچون آلژینات اثر مفیدی بر غلظت HDL، LDL، کلسترول تام و تری گلیسیرید دارند (El-Naga *et al.*, 2018).

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی بافت ژژنوم روده جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی در جدول ۷ آمده است. عرض پرز ناحیه ژژنوم روده کوچک جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (P<۰/۰۵) به‌گونه‌ای که بیشترین عرض پرز در دو سطح سین‌بیوتیک لیماکس ۱ و ۱/۵ درصد (به‌ترتیب ۱۹۶/۲۵ و ۲۰۱/۸۷ میکرومتر) و کمترین عرض پرز در شاهد، اکسی‌تتراسایکلین و جلبک *سارگاسوم* مشاهده شد. امّا سایر صفات شامل ارتفاع پرز، عمق کریپت، نسبت ارتفاع به عرض پرز و سطح جذبی پرز تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت.

جدول ٦- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر برخی از فراسنجه‌های لیپیدی سرم خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)

Table 6- The effect of experimental treatments on some of blood serum lipid parameters (mg/dL)

تیمارها Treatments	تری گلیسرید Triglyceride	لیپوپروتئین با دانسیته بالا High density lipoprotein (HDL)	لیپوپروتئین با دانسیته پایین Low density lipoprotein (LDL)	کلسترول تام Total cholesterol
شاهد Control	46.25	50.25	21.00	103.75
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	52.25	50.25	21.75	109.57
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	62.50	58.50	29.25	122.75
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	57.75	46.00	23.00	104.50
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	61.50	55.25	29.73	104.50
SEM[1]	4.07	2.35	1.21	5.54
P-value	0.699	0.511	0.097	0.805

[1] SEM: Standard Error of Mean

میانگین خطای استاندارد

جدول ۷- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ریخت‌شناسی بافت ژژنوم

Table 7- The effect of experimental treatments on jejunum morphology

تیمارها Treatments	ارتفاع پرز (میکرومتر) Villus height (µm)	عرض پرز (میکرومتر) Villus width (µm)	عمق کریپت (میکرومتر) Crypt of depth (µm)	نسبت ارتفاع به عرض Height to width ratio	سطح جذبی پرز (میکرومتر مربع) Absorption surface of villus (µm^2)
شاهد Control	1087.0	175.63^b	124.75	8.71	301816
اکسی‌تتراسایکلین Oxytetracycline	1121.5	174.38^b	128.50	8.72	307684
جلبک *سارگاسوم* *Sargassum* algae	1314.5	174.37^b	125.00	10.50	360222
لیماکس ۱ درصد Limax 1%	1166.3	196.25^a	120.50	9.67	358470
لیماکس ۱/۵ درصد Limax 1.5%	1215.6	201.87^a	127.50	9.52	384684
SEM[1]	35.75	2.78	1.31	0.2523	12219.4
P-value	0.3372	0.0117	0.3894	0.1844	0.192

در هر ستون، اعداد با حروف غیر مشترک، دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Mean within the same row with different letters significantly (P<0.05).

میانگین خطای استاندارد

[1] SEM: Standard Error of Mean

ساختار مخاط روده نشان‌دهنده سلامت روده در جوجه‌ها است و افزایش سطح گوارشی و جذبی منجر به استفاده بهتر از مواد مغذی می‌شود. طبق پژوهش‌های پیشین، ترکیب پرزهای روده مستقیماً با عملکرد رشد مرتبط است و پرزهای بزرگتر با افزایش وزن بدن مرتبط هستند. ترکیبات گیاهی و پروبیوتیکی بر ریخت‌شناسی و سطح جذبی روده تأثیر می‌گذارند (Cao *et al.*, 2013). استفاده از این مواد در جیره جوجه‌های گوشتی به‌دلیل افزایش فعالیت میتوز سلولی و کاهش آسیب به اپیتلیال روده، ارتفاع پرزها را افزایش و عمق کریپت را کاهش می‌دهد. رشد طول و عرض پرزهای روده باعث افزایش سطح جذبی روده می‌شود که جذب مواد مغذی را برای حفظ رشد مطلوب جوجه‌های گوشتی افزایش می‌دهد (Rezaei *et al.*, 2018). افزایش عرض پرز روده در دو سطح تیمار لیماکس می‌تواند بیانگر این امر باشد که این مکمل توانایی ایجاد شرایط مناسب جهت بهبود سلامت روده را دارد.

اگرچه در پژوهش حاضر، ارتفاع پرز و سطح جذبی پرز تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد، امّا تیمارهای جلبک *سارگاسوم* و دو

سطح سین‌بیوتیک نسبت به گروه اکسی‌تتراسایکلین و شاهد به‌صورت عددی بیشترین ارتفاع پرز و سطح جذب پرز را داشتند. در پژوهش‌های متعدد در این رابطه نتایج متفاوتی گزارش شده است. این در حالی است که افزایش معنی‌داری در ارتفاع و عرض پرز و کاهش عمق کریپت در ژژنوم جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروبیوتیک، عصاره زنیان و مانان الیگوساکارید مشاهده شد (Hajiaghapour and Rezaeipour, 2018; Hedayati and Manafi, 2018). در پژوهشی دیگر استفاده از *ساکارومایسس سرویزیه*[1] در جیره بلدرچین‌های تخم‌گذار باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع پرز، عرض پرز و سطح جذبی پرزها در مقایسه با شاهد شد (Mirakzehi *et al.*, 2022). همچنین، کمترین عمق کریپت در تیمار مخلوط پروبیوتیک و آب پنیر نسبت به گروه شاهد توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است (Liu *et al.*, 2020; Zarei *et al.*, Kazemi *et al.*, 2019; 2018). تغییرات مطلوب در ریخت‌شناسی روده احتمالاً به‌دلیل عملکرد پلی‌ساکاریدهای موجود در جلبک‌های دریایی و پری‌بیوتیک‌های موجود در سین‌بیوتیک‌ها باشد که می‌تواند به‌عنوان بستری برای میکروفلور روده عمل کند و به تحریک سرعت تخمیر و افزایش تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه کمک کند. اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه به تمایز و تکثیر سلول‌های اپیتلیال روده کمک می‌کنند (Liu *et al.*, 2020).

با توجه به موارد بحث شده ملاحظه می‌شود که نتایج متفاوتی با استفاده از انواع مکمل‌های پروبیوتیکی و سین‌بیوتیکی در جیره و یا آب مصرفی انواع طیور، در شرایط مختلف گزارش شده است. امّا میزان اثربخشی استفاده از این نوع مکمل‌ها را به عوامل متعددی می‌توان نسبت داد. از جمله موارد قابل‌ذکر شامل: فرم خوراک مصرفی، چگونگی ساخت آن‌ها، گونه‌ها و سویه‌های باکتریایی موجود و نحوه مصرف این مکمل‌ها (محلول در آب و یا ترکیب با جیره)، کیفیت جوجه یک‌روزه، آلودگی مزرعه پرورشی، ترکیب جیره غذایی و چگونگی مدیریت گله می‌باشند (Khodaei *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری کلی

نتیجه نهایی این که میانگین افزایش وزن روزانه و شاخص تولید دو تیمار اکسی‌تتراسایکلین و لیماکس ۱/۵ درصد بیشترین مقدار را در بین تیمارهای آزمایشی داشتند. همچنین، بیشترین عرض پرزها و در نتیجه، سطح جذبی آن مربوط به تیمار لیماکس ۱/۵ درصد بود. بنابراین، با وجود مشکلات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره پرندگان، مکمل سین‌بیوتیکی لیماکس می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین باشد.

سپاسگزاری

این اثر برگرفته از بخشی از نتایج پروژه تحقیقاتی خاص انجام شده در ایستگاه تحقیقات و آموزش علی‌آباد کمین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان فارس می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود فرض می‌دانند از حمایت‌های مادی و معنوی انجمن علوم دامی استان کرمان در تأمین بخشی از هزینه‌های اجرای پروژه تشکر و قدردانی کنند.

References

1. Abd El-Hady, A. M., Elghalid, O. A., Elnaggar, A. S., & Abd El-khalek, E. (2022). Growth performance and physiological status evaluation of *Spirulina platensis* algae supplementation in broiler chicken diet. *Livestock Science*, *263*, 105009. http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105009
2. Abdel-Wareth. A. A., Hammad, S., Khalap hallah, R., Salem, W. M., & Lohakare, J. (2019). Synbiotic as eco-friendly feed additive in diets of chickens under hot climatic conditions. *Poultry Science*, *98*(10), 4575-4583. https://dx.doi.org/10.3382/ps/pez115
3. Agah, M. J., Bostani, A., Hashemi, M., Safdarian, M., Hashemi, MR., & Saleh, H. (2020). Effect of physical from of the diet and the type of probiotic on performance, carcass characteristics and acidity of the contents of the gastrointestinal tract of broiler chicks. *Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, *129*, 101–112. (in Persian). http://dx.doi.10.22092/asj.2019.126980.1951
4. Al-Khalaifa, H., Al-Nasser, A., Al-Surayee, T., Al-Kandari, S., Al-Enzi, N., Al-Sharrah, T., & Mohammed, A. (2019). Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens. *Poultry Science*, *98*(10), 4465-4479. https://dx.doi.org/10.3382/ps/pez282
5. Ashayerizadeh A., Dabiri, N., Ashayerizadeh, O., Mirzadeh, K. H., Roshanfeker, H., & Manooee, M. (2009). Effect of dietary antibiotic, probiotic and prebiotic as growth promoters, on growth performance, carcass characteristics and hematological indices of broiler chickens. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. *12*, 52-57.
6. Bai, J., Wang, R., Yan, L., & Feng, J. (2019). Co-supplementation of dietary seaweed powder and antibacterial peptides improves broiler growth performance and immune function. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21.

1-*Saccharomyces cerevisiae*

https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0826
7. Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S., & Rezaei, M. (2018). Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 793-802. https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.059
8. Brenes, A., Montoro, A. V., Cambrodón, I. G., Centeno, C., Calixto, F. S., & Arija, I. (2010). Effect grape seed extract on growth performance, protein and polyphenol digestibilities, and antioxidant activity in chickens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *2*, 326-333.
9. Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*, *92*(11), 2949-2955. https://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03366
10. Choi, Y., Lee, S., & Oh, J. (2014). Effects of dietary fermented seaweed and seaweed fusiforme on growth performance, carcass parameters and immunoglobulin concentration in broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), 862. http://dx.doi.10.5713/ajas.2014.14015
11. Dev, K., Mir, N. A., Biswas, A., Kannoujia, J., Begum, J., Kant, R., & Mandal, A. (2020). Dietary synbiotic supplementation improves the growth performance, body antioxidant pool, serum biochemistry, meat quality, and lipid oxidative stability in broiler chickens. *Animal Nutrition*, *6*(3), 325-332. https://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2020.03.002
12. El-naga, A., Manal, K., & Megahed, M. M. (2018). Impact of brown algae supplementation in drinking water on growth performance and intestine histological changes of broiler chicks. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, *21*(2), 495-507. http://dx.doi.10.21608/ejnf.2018.75603
13. Fazelnia, K., Fakhraei, J., Mansoori Yarahmadi, H., & Amini, K. (2022). Investigation of probiotic and synbiotic effects of dietary inclusion of two dietary supplements on growth performance and immune responses of broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. *Animal Sciences Journal*, *34*(133), 103-116. (in Persian). http://dx.doi.10.22092/asj.2021.352377.2110
14. Ganesan, A. R., Tiwari, U., & Rajauria, G. (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Science and Human Wellness*, *8*(3), 252-263. https://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.001
15. Jangjoo, O., Saleh, H., Agah, M.J., & Mirakzehi, M.T. (2021). The effect of feed form and probiotic supplements on performance, blood parameters and immune response of broilers. *Research on Animal Production*, *31*, 22-30. (in Persian).
16. Hajiaghapour, M., & Rezaeipour, V. (2018). Comparison of two herbal essential oils, probiotic, and mannan-oligosaccharides on egg production, hatchability, serum metabolites, intestinal morphology, and microbiota activity of quail breeders. *Livestock Science*, *210*, 93-98. https://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2018.02.007
17. Hedayati, M., & Manafi, M. (2018). Evaluation of anherbal compound, a commercial probiotic, and an antibiotic growth promoter on the performance, intestinal bacterial population, antibody titers, and morphology of the jejunum and ileum of broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *20*, 305-316. https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2017-0639
18. Kazemi, S. A., Ahmadi, H., & Karimi Torshizi, M. A. (2019). Evaluating two multistrain probiotics on growth performance, intestinal morphology, lipid oxidation and ileal microflora in chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(5), 1399-1407. https://dx.doi.org/10.1111/jpn.13124
19. Khodaei, H., Maghsoudlou, S., Garehbash, A. M., & Taraz, Z. (2016). Effect of physical form of feed and dietary supplementation of probiotic and prebiotic on performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Research on Animal Production (Scientific and Research)*, *6*(12), 20-29.
20. Liu, W. C., Guo, Y., Zhao, Z. H., Jha, R., & Balasubramanian, B. (2020). Algae-derived polysaccharides promote growth performance by improving antioxidant capacity and intestinal barrier function in broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 601336. http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.601336
21. Mehdinezhad, N., Ghannadi, A., & Yegdaneh, A. (2016). Phytochemical and biological evaluation of some *Sargassum* species from Persian Gulf. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *11*(3), 243.
22. Mirakzehi, M. T., Agah, M. J., Baranzehi, T., & Saleh, H. (2022). The effects of *Saccharomyces cerevisiae* and citric acid on productive performance, egg quality parameters, small intestinal morphology, and immune-related gene expression in laying Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *4*, 1-12.
23. Omar, A. E., Al-Khalaifah, H. S., Osman, A., Gouda, A., Shalaby, S. I., Roushdy, E. M., & Amer, S. A. (2022). Modulating the growth, antioxidant activity, and immunoexpression of proinflammatory cytokines and apoptotic proteins in broiler chickens by adding dietary *Spirulina platensis* phycocyanin. *Antioxidants*, *11*(5), 991. http://dx.doi.org/10.3390/antiox11050991
24. Petricevic, V., Lukic, M., Skrbic, Z., Rakonjac, S., Doskovic, V., Petricevic, M., & Stanojkovic, A. (2018). The effect of using rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in broiler nutrition on production parameters, slaughter characteristics, and gut microbiological population. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *42*(6), 658-

664. http://dx.doi.10.3906/vet-1803-53
25. Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *17*(4), 351-358. http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.07.006
26. Rahmani, M., Karimi Torshizi, M. A., & Vaez Torshizi, R. (2010). Effect of lighting programs on performance, carcass and production costs of Arian broilers. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *3*(3). (in Persian).
27. Reski, S., Mahata, M., Rizal, Y., & Pazla, R. (2021). Influence of brown seawed (*Turbinaria murayana*) in optimizing performance and carcass quality characteristics in broiler chickens. *Advances in* ANIMAL *and* VETERINARY *Sciences*, *9*(3), 407–515. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.3.407.415
28. Rezaei, M., Karimi Torshizi, M. A., Wall, H., & Ivarsson, E. (2018). Body growth, intestinal morphology and microflora of quail on diets supplemented with micronised wheat fibre. *British Poultry Science*, *59*(4), 422-429. http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2018.1460461
29. Sakamoto, K., Hirose, H., Onizuka, A., Hayashi, M., Futamura, N., Kawamura, Y., & Ezaki, T. (2000). Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *Journal of Surgical Research*, *94*(2), 99-106. http://dx.doi.org/10.1006/jsre.2000.5937
30. Sanjeewa, K. A., & Jeon, Y. J. (2018). Edible brown seaweeds: A review. *Journal of Food Bioactives*, *2*, 37–50. http://dx.doi.org/10.31665/JFB.2018.2139
31. Song, D., Li, A., Wang, Y., Song, G., Cheng, J., Wang, L., & Wang, W. (2022). Effects of synbiotic on growth, digestibility, immune and antioxidant performance in broilers. *Animal*, *16*(4), 1–7. http://dx.doi.org/10.1016/j.animal.2022.100497
32. Suganya, S., Ishwarya, R., Jayakumar, R., Govindarajan, M., Alharbi, N., Kadaikunnan, S., & Vaseeharan, B. (2019). New insecticides and antimicrobials derived from *Sargassum wightii* and *Halimeda gracillis* seaweeds: Toxicity against mosquito vectors and antibiofilm activity against microbial pathogens. *South African Journal of Botany*, *125*, 466-480. http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.006
33. Tayeri, V., Seidavi, A., Asadpour, L., & Phillips, C. J. (2018). A comparison of the effects of antibiotics, probiotics, synbiotics and prebiotics on the performance and carcass characteristics of broilers. *Veterinary Research Communications*, *42*, 195-207. http://dx.doi.org/10.1007/s11259-018-9724-2
34. Vlaicu, P. A., Saracila, M., Panaite, T. D., Tabuc, C., Bobe, E., & Criste, R. D. (2017). Effect of the dietary grape seeds and rosehip oils given to broilers (14-42 days) reared at 32 C on broiler performance, relative weight of carcass cuts and internal organs and balance of gut microflora. *Archiva Zootechnica*, *20*(1), 77.
35. Wade, M., Manwar, S., Kuralkar, S., Waghmare, S., Ingle, V., & Hajare, S. (2018). Effect of thyme essential oil on performance of broiler chicken. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *6*(3), 25–28.
36. Yan, G., Guo, Y., Yuan, J., Liu, D., & Zhang, B. (2011). Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chickens. *Poultry Science*, *90*(7), 1441-1448. http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01364
37. Zarei, A., Lavvaf, A., & Motamedi Motlagh, M. (2018). Effects of probiotic and whey powder supplementation on growth performance, microflora population, and ileum morphology in broilers. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 840-844. http://dx.doi.org/10.1080/09712119.2017.1410482

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 235-247

Analysis of the Regulatory Effects of lncRNAs on Kidney Tissue in Ascites Susceptible Broiler

Kasra Ahmadian[1], Mohammadreza Nassiri[2*], Karim Hasanpur[3], Ali Javadmanesh[4]

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author's Email: nassiryr@um.ac.ir

Received: 19-07-2023
Revised: 23-10-2023
Accepted: 26-11-2023
Available Online: 26-11-2023

How to cite this article:
Ahmadian, K., Nassiri, M., Hasanpur, K., & Javadmanesh, A. (2024). Analysis of the regulatory effects of lncRNAs on kidney tissue in ascites susceptible broiler. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 235-247. (in Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83528.1162

Introduction: Ascites syndrome, as a metabolic disorder, is one of the most non-infectious causes of death in the old age of breeding in the poultry industry, which causes annual losses of over one hundred million dollars and is an important economic concern. The growth rate of broiler and their high need for oxygen causes an increase in pumping, followed by heart failure, and heart failure is often associated with other diseases. Due to the relationship between the heart and the kidney, chronic heart failure leads to a decrease in filtered blood volume and a decrease in kidney function, which over time causes permanent damage to the kidneys. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play crucial roles in various mechanisms related to cellular homeostasis and are involved in a wide range of pathophysiological processes and the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular disorders, respiratory diseases, and kidney diseases. Preliminary studies in human samples show that lncRNAs are strongly involved in the development and disease of the kidney. For this reason, lncRNAs obtained from RNA-seq data of kidney tissue were investigated in relation to the occurrence of ascites.

Materials and Methods: Seven hundred one-day-old chicks from one of the paternal lines of a commercial strain were kept under standard conditions until they were 21 days old. On the 21st day of the breeding period, cold stress (24 degrees Celsius) began and continued until the age of 48 days. After applying cold stress, the birds with ascites symptoms were grouped in the Ascites group and the rest in the Healthy group. On the 39th day of the breeding period, 70 slaughtered birds and kidney tissue samples from each bird were immediately transferred to the liquid nitrogen tank after separation. 16 ascites birds and 16 healthy birds were used for RNA extraction. Total RNA extraction was done individually using trizol (YTzol) solution, and then an equal amount of RNA from four tissue samples was combined and then cDNA was prepared from 4 ascites tissue samples and 4 healthy tissue samples. All small RNAs, such as rRNAs, tRNAs, etc., were removed by dt oligo beads, and finally, all mRNAs were used to prepare the library. Novagen company was used for sequencing using Illumine hiseq 2500 technology and paired-end reads. Several software such as hisat2, cufflinks, stringtie, cuffmerge and cuffdiff were used for mapping, aligning and analysis of gene expression differences. In order to extract coding and non-coding genes, FEELnc software was used with default settings. Potential target genes of lncRNAs were investigated by searching for protein coding genes located within 100 kb upstream and downstream of each lncRNA. In the following, a positive and negative correlation of 90% was obtained between two groups of coding and non-coding genes based on the degree of expression change. In order to investigate the metabolic,

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83528.1162

structural and functional pathways of significant genes, the Enrichr database, which is connected with other databases such as KEGG, was used.

Results and Discussion: In the current research, a total of eight samples produced 187640642 million paired reads with a size of 150 nucleotides and after quality control, 185258819 uncontaminated reads were obtained. The number of 1421 lncRNA transcripts related to 921 gene loci and 154 related target genes were identified in the comparison between ascites and healthy birds. Then, this number of genes were identified (154 genes) in order to check their functional characteristics using the Enrichr database, five functional pathways Glycine, serine and threonine metabolism, Rap1 signaling pathway, Sphingolipid metabolism, Phosphatidylinositolsignaling system, Mucin type O-glycan biosynthesis and related genes were significant. Out of 13 significant lncRNAs in these biological pathways, 12 are located on the antisense direction and one is located on the sense direction. In addition, 9 lncRNAs are exonic, 3 intronic and 1 in downstream position. These pathways are activated as damage modifiers in hypoxic conditions caused by ascites and provide the required energy and maintain kidney homeostasis in response to oxygen tension caused by ascites. On the other hand, they act as cell survival, increase proliferation and anti-apoptosis, which on the one hand reduce kidney damage and on the other hand make it function better, and in this way, reduce complications caused by ascites kidney damage.

Conclusion: Therefore, by targeting the important pathways of biology obtained and the genes affecting them for the prevention and treatment of ascites disease, it will provide a new insight for breeding.

Keywords: Ascites, Broiler, Kidney, lncRNA, RNA-seq

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۴۷-۲۳۵

تجزیه و تحلیل اثرات تنظیمی lncRNAها بر بافت کلیه در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندروم آسیت

کسری احمدیان[۱]، محمدرضا نصیری[۲*]، کریم حسن پور[۳]، علی جوادمنش[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

چکیده

آسیت یک اختلال متابولیکی مهم در صنعت طیور تجاری می‌باشد که بافت‌های متفاوتی از جمله کلیه را درگیر می‌کند. در این پژوهش، ژن‌های غیررمزکننده بلند(lncRNA[۱]) مؤثر در بیماری آسیت در جوجه‌های گوشتی که اثر تنظیمی روی ژن‌های mRNA هدف دارند با استفاده از فناوری RNA-seq مورد بررسی قرار گرفت. در روز ۳۹ آزمایش، از بافت کلیه، چهار نمونه سالم و چهار نمونه بیمارRNA کل استخراج و با استفاده از پلتفرم illumina Hiseq2500 توالی‌یابی انجام شد. بر اساس نتایج آنالیز RNA-seq، تعداد ۱۴۲۱ رونوشت lncRNA از ۹۲۱ جایگاه ژنی شناسایی شد که با ۱۵۴ ژن رمزشونده در محدوده ۱۰۰ هزار باز بالادست و پایین‌دست ژن‌های مورد نظر ارتباط داشتند. از میان جفت ژن‌های رمزشونده و lncRNA، آن‌هایی که همبستگی بیانی بیشتر از مثبت ۹۰ درصد و کمتر از منفی ۹۰ درصد داشتند، به‌ترتیب به‌عنوان جفت ژن‌های با بیان هم‌راستا و غیر هم‌راستا مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی عملکردی این ژن‌ها نشان داد که ۱۳ ژن به‌طور معنی داری در مسیرهای متعدد زیستی مرتبط با بیماری مشاهده شدند. با هدف قراردادن مسیرهای مهم زیستی به‌دست آمده و ژن‌های مؤثر بر آن‌ها شامل C1GALT1C1، PLCD4، GCNT4، DGKA، IMPA2، GBA2، CERS5، CDH1، CSF1، CTNND1، LPAR2، DAO، PIPOX و تمرکز بر نقش آن‌ها در پیشگیری و درمان بیماری آسیت، درک بهتری از عملکرد آن‌ها را در تأمین انرژی و حفظ هموستاز کلیه، ممکن ساخته تا جهت پیشگیری و درمان بیماری آسیت، بینشی جدید برای اصلاح نژاد و کاهش مشکلات مربوط به این بیماری در گله‌های تجاری ارائه دهد.

واژه‌های کلیدی: آسیت، جوجه گوشتی، کلیه، lncRNA، RNA-seq.

مقدمه

سندرم آسیت به‌عنوان یک اختلال متابولیکی، یکی از قابل توجه ترین و غیرعفونی‌ترین علل تلفات در جوجه‌های گوشتی است که با تلفات بین پنج تا هفت درصدی بعد از هفته چهارم پرورش سبب مرگ‌ومیر در گله‌های پرورش می‌شود، علامت مشخص این ناهنجاری، تجمع مایع زرد رنگ در حفره بطنی می‌باشد. پرندگان مبتلا کوچک‌تر از پرندگان سالم بوده و علائم سیانوز (رنگ آبی پوست) به‌خصوص در اطراف شانه و بال‌ها و حالت افسرده همراه با پرهای ژولیده را نشان می‌دهند (Gupta, 2011). این اختلال متابولیکی، سالانه بالغ بر صد میلیون دلار خسارت اقتصادی را به صنعت طیور وارد می‌سازد، به همین دلیل به‌عنوان یک چالش مهم اقتصادی مطرح می‌باشد (Lee *et al.*, 2022).

افزایش سرعت رشد جوجه‌های گوشتی و به‌دنبال آن، افزایش مصرف اکسیژن به‌عنوان سوخت فرآیندهای مختلف متابولیکی، سبب ایجاد فشار خون ریوی و افزایش برون‌ده قلب می‌شود، از آنجایی که حجم ریه‌ها و سیستم قلبی عروقی ثابت است، پس از مدتی ریه‌ها نمی‌توانند خونی را که از قلب آمده است، دریافت کنند و این مسئله نقطه شروع نارسایی قلبی است. در چنین شرایطی، ممکن است بدن

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: nassiryr@um.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83528.1162
5- Long noncoding RNA

پرنده نتواند به افزایش اکسیژن مورد نیاز خود پاسخ دهد و نسبت به تنش‌های محیطی مستعد ابتلا به آسیت شود (Cowen *et al.*, 1988). نارسایی قلبی که در بیماری آسیت نیز مشهود است، اغلب با سایر بیماری‌ها همراه است، قلب و کلیه ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند، همزیستی بیماری قلبی و کلیوی را امروزه به‌عنوان سندرم قلبی و عروقی (CRS) تعریف می‌کنند. نارسایی مزمن قلب سبب کاهش حجم خون فیلتر شده توسط کلیه‌ها می‌شود، که منجر به کاهش عملکرد کلیه می‌گردد. از طرفی، سبب تغییرات نوروهمورال و فعال شدن سیستم رنین- آنژیوتانسین- آلدوسترون شده که حجم نمک و آب در گردش را کنترل می‌کنند. این تغییرات منجر به افزایش میزان نمک و آب می‌شود، که در کوتاه‌مدت می‌تواند میزان خون‌رسانی به ارگان‌های حیاتی را بهبود بخشد. با این حال، در بلندمدت، این تغییرات نوروهمورال منجر به تورم و حتی کاهش بیشتر در خروجی قلب می‌شود. بنابراین، به‌طور مداوم، این تغییرات جریان خون را به کلیه‌ها کاهش می‌دهد و عملکرد کلیه ضعیف‌تر می‌شود. از سوی دیگر، نارسایی قلبی، سبب کاهش اکسیژن‌رسانی به بافت‌ها از جمله کلیه شده و هیپوکسی بافتی کلیه سبب شروع پاسخ کلیه به آن خواهد شد (Ronco *et al.*, 2010).

فناوری‌های توالی‌یابی نسل جدید در حوزه RNA و بهره‌گیری از شیوه‌های مختلف محاسباتی، و تعیین کمیت بیان ژن فرصت قابل توجهی برای هستی‌شناسی و توصیف ژنومی RNAهای طولانی غیررمزکننده (lncRNAs) ارائه داده است (Xiao *et al.*, 2018). بیش از ۹۸ درصد از ژنوم به RNAهایی رونویسی می‌شود که پتانسیل رمزگذاری پروتئین را ندارند (Chinwalla *et al.*, 2002). این RNAهای غیررمزکننده (ncRNA[1]ها) را می‌توان به RNAهای غیررمزکننده بلند lncRNA که طول آن‌ها بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید است و RNAهای غیررمزکننده کوچک که طول کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید دارند، تقسیم کرد (Lorenzen *et al.*, 2011). داده‌های موجود نشان می‌دهد که lncRNAها در طیف وسیعی از فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک، مانند تنظیم فعالیت‌های سلولی (تکثیر، مهاجرت، مرگ سلولی، رگزایی، سوخت و ساز)، پاسخ‌های التهابی و ایمنی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند. برخلاف بیماری‌های قلبی‌عروقی، مطالعه lncRNAها درکلیه هنوز در مراحل اولیه است. با این حال، مطالعات اولیه در نمونه‌های انسانی نشان می‌دهد که lncRNAها به‌شدت در توسعه و بیماری کلیه نقش دارند (Lorenzen *et al.*, 2016).

در طی سال‌های اخیر، ژنوم مرغ در زمینه lncRNA به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. از آنجایی که صفت تولید گوشت یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی طیور است، تعداد زیادی از مطالعات مانند مطالعه بافت ماهیچه (Ren *et al.*, 2018)، بافت چربی (Zhang *et al.*, 2017) و همچنین کیفیت گوشت (Li *et al.*, 2019). مربوط به بیان lncRNA بافت‌ها مرتبط با رشد هستند. علاوه‌بر تولید گوشت، می‌توان به تولید تخم مرغ (Peng *et al.*, 2019)، مقاومت به ویروس لوکوز پرندگان (Hu *et al.*, 2018)، تخمدان (Yin *et al.*, 2020)، (Adetula *et al.*, 2018) برای بافت رحم واژینال، ارزیابی تحرک اسپرم خروس (Liu *et al.*, 2017) اشاره نمود.

شواهد زیادی نشان داده است که lncRNA و miRNA در سازگاری هیپوکسیک جوجه‌های تبتی در ارتفاعات نقش دارند، تجزیه و تحلیل KEGG در این نژاد نشان داد که چندین miRNA، lncRNA و ژن‌های هدف آن‌ها در رگزایی (ازجمله رشد عروق خونی و گردشخون) و متابولیسم انرژی نقش دارند (Zhang *et al.*, 2021).

مطالعات ذکر شده فوق نشان می‌دهد کهlncRNAها نقش مهمی را نه تنها در تنظیم بیان ژن ایفا می‌کنند، بلکه در بسیاری از جنبه‌های دیگر فیزیولوژی و همچنین بیماری‌ها نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. در مقایسه با تعداد رونوشت‌های موجوداتی نظیر انسان و موش، دام و طیور دارای تعداد نسبتاً کمی رونوشت‌های ذخیره‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی بیولوژیکی هستند. بنابراین، مسیر اصلی تحقیقات آینده تکمیل هستی‌شناسی[2] بخش غیررمزکننده ژنوم دام است، امروزه با بهره‌برداری کامل از اطلاعات ژنتیکی می‌توان به بازده اقتصادی مطلوب رسید، به همین دلیل کسب دانش در مورد تمام مکانیسم‌های کنترل بیان ژن، از جمله مولکول‌هایlncRNA، مهم به نظر می‌رسد (Kosinska-Selbi *et al.*, 2020).

علی‌رغم پژوهش‌های متعددی که در بررسی مقایسه‌ای بین ژن های مسبب آسیت در پرندگان آسیتی و سالم انجام شده است (Taghizadeh et al , 2018; Hasanpur et al., 2019 ; Malekshahdehi et al., 2021; Shi et al., 2017)، ولی مطالعه ای که اثر lncRNAها را در این بیماری طیور بررسی نماید، صورت نگرفته و پژوهش حاضر به بررسی lncRNAهای حاصل از داده‌های RNA-seq در بروز آسیت در بافت کلیه پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، ساخت کتابخانه و توالی‌یابی

در این پژوهش از داده‌های حاصل از پژوهش ملک‌شاه‌دهی و همکاران (Malekshahdehi *et al.*, 2021) استفاده شده است که به اختصار تشریح می‌گردد، تعداد ۷۰۰ قطعه جوجه یک روزه از خطوط پدری سویه تجاری آرین تا ۲۱ روزگی در سالن پرورشی مزرعه دانشگاه تبریز در شرایط استاندارد نگهداری شد. در روز ۲۱ دوره

1- Noncoding RNA

2- Annotation

پرورش، تنش سرمایی شروع و در روز ۳۹ دوره پرورش برای نمونه برداری از بافت کلیه، ۷۰ پرنده کشتار شده و بر اساس درصد هماتوکریت و نسبت RV/TV نمونه‌های با هماتوکریت پایین‌تر از ۳۶ درصد و RV/TV کمتر از ۰/۲۷ در گروه سالم و بقیه در گروه بیمار قرار داده شده و نمونه‌های بافتی کلیه جهت استخراج RNA سریعاً به تانک ازت منتقل شدند. استخراج RNAی کل از بافت کلیه ۳۲ پرنده شامل ۱۶ پرنده آسیتی و ۱۶پرنده سالم با استفاده از محلول ترایزول (YTzol) انجام شد. پس از کنترل کمّی و کیفی RNA، مقدار مساوی از RNAی چهار پرنده در یک نمونه واحد ادغام شد و بدین ترتیب هشت نمونه ادغام شده به‌دست آمد که در دو گروه بیمار و سالم هرکدام در چهار تکرار قرار گرفتند. سپس با استفاده از کیت‌های خاص mRNAها شکسته و تبدیل به قطعات کوچک‌تر شده و cDNA تهیه گردید و در نهایت، با استفاده از فناوری Illumina hiseq 2500 و به‌صورت جفت خوانش دو طرفه (Paired-end) توسط شرکت Novogene چین توالی‌یابی شدند.

تجزیه و تحلیل RNA-seq

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی ایجاد شده هر نمونه در پژوهش یاد شده (Malekshahdehi *et al.*, 2021)، از نرم‌افزار FastQC و Trimmomatic، جهت کنترل کیفیت خوانش‌ها استفاده شد. این آنالیز کیفیت میلیون‌ها خوانش را مورد بررسی قرار می‌دهد. خوانش‌ها از نظر بازهای با اطمینان پایین، اریب در ترتیب نوکلئوتیدها، آداپتورها، محتوای GC ،مضاعف‌شدگی‌ها و ... مورد بررسی قرار گرفتند. برای هم‌ترازی خوانش‌ها از ژنوم مرجع (Gallus_gallus-7.0) و با استفاده از نرم‌افزار HISAT2 نسخه ۲/۲/۰ استفاده شد. سپس به‌منظور سرهم‌بندی رونوشت‌ها و هویت‌یابی خوانش‌های هم‌تراز شده از نرم‌افزار Stringtie استفاده شد. پس از پایان سرهم‌بندی خوانش‌ها و ایجاد رونوشت‌ها، با استفاده از ابزار Stringtie رونوشت‌های تمام نمونه‌ها ادغام شدند تا مجموعه رونوشتی واحدی ایجاد شود. در ادامه، به‌منظور استخراج ژن‌های رمزکننده و غیررمزکننده از نرم‌افزار FEELnc نسخه 0.2.1 با تنظیمات پیش فرض استفاده گردید. با استفاده از این نرم‌افزار همه مراحل فیلتراسیون lncRNA شامل رونوشت‌هایی که تعداد اگزون بیش از یک و طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید را ارزیابی نموده و در نهایت، رونوشت‌های رمزکننده و غیررمزکننده مشخص شد. آنالیز بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار cuffdiff از بسته نرم‌افزاری cufflinks صورت پذیرفت. پژوهش‌های متعدد نشان دادند که lncRNAها، بیان ژن مجاور خود را تنظیم می‌کنند (Ørom *et al.*, 2010). بر این اساس، با استفاده از کدنویسی در محیط لینوکس ژن‌های هدف بالقوه lncRNAها حداکثرتا فاصله ۱۰۰ کیلوبازی بالادست و پایین‌دست lncRNA و نزدیک‌ترین ژن‌ها به‌عنوان ژن‌های تنظیم‌شده با lncRNA مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه، تجزیه و تحلیل همبستگی پیرسون بین دو گروه ژن‌های رمزکننده و غیررمزکننده بر اساس میزان تغییر بیان به‌دست آمد. میزان همبستگی میان lncRNA و ژن رمزکننده حداقل مثبت و منفی ۹۰ درصد در نظر گرفته شد. جهت بررسی ویژگی‌های مسیرهای متابولیکی، ساختاری و عملکردی ژن‌های معنی‌دار از پایگاه اطلاعاتی Enrichr که با دیگر پایگاه نظیر KEGG در ارتباط است، استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات مربوط به خوانش‌های نقشه یابی شده روی ژنوم مرجع نمونه‌های سالم و بیمار

Table 1 –Summary of raw, processed and mapped reads on reference genomein healthy and diseased samples

نمونه Sample	خوانش خام Raw reads	خوانش فیلتر شده Filtered reads	همردیفی جفتی جور شده(٪) Concordant Pair alignment (%)	محتوای GC (٪) GC content (%)
سالم۱ Healthy1	21486454	21463928(99.9)	87.07	53
سالم۲ Healthy2	22517021	22516047(99.9)	86.14	54
سالم۳ Healthy3	24469651	24160595(98.7)	85.61	55
سالم۴ Healthy4	23710793	23314277(98.3)	79.93	59
آسیتی ۱ Ascites1	23811191	23396401(98.3)	84.48	56
آسیتی ۲ Ascites2	21514258	21152352(98.3)	83.48	57
آسیتی ۳ Ascites3	24546273	24169849(98.5)	82.47	58
آسیتی ۴ Ascites4	25585001	25085370(98)	83.03	57

جدول ۲-بررسی مسیر معنی‌دار در پایگاه داده‌های KEGG و ژن‌های معنی‌دار شده بین پرندگان آسیتی و سالم

Table 2 –Significant terms of biological process in KEGG pathways between ascetic and helthy chickens

دسته Category	مسیر بیولوژیکی Term	تعداد Count	ارزش احتمال P-value	ژن‌ها Genes
KEGG_PATHWAY	Glycine, serine and threonine metabolism	2	0.02438	DAO,PIPOX
KEGG_PATHWAY	Rap1 signaling pathway	4	0.03883	CDH1,CSF1,CTNND1,LPAR2
KEGG_PATHWAY	Sphingolipid metabolism	2	0.03549	GBA2,CERS5
KEGG_PATHWAY	Phosphatidylinositol signaling system	3	0.0211	PLCD4,DGKA,IMPA2
KEGG_PATHWAY	Mucin type O-glycan biosynthesis	2	0.02	C1GALT1C1,GCNT4

جدول ۳- وضعیت lncRNAها و همبستگی بین lncRNA-mRNA

Table 3- Status of lncRNAs and correlation between lncRNA-mRNA

lncRNA	اسم ژن Gene name	همبستگی Corelation	جهت Direction	نوع Type	زیر نوع Subtype	موقعیت Location	کروموزوم Chr
MSTRG.12941	C1GALT1C1	0.934228268	antisense	genic	overlapping	exonic	4
MSTRG.17741	GCNT4	0.909414888	antisense	genic	overlapping	intronic	z
MSTRG.16007	PLCD4	0.931989197	antisense	genic	nested	exonic	7
MSTRG.12425	DGKA	0.924312038	antisense	genic	overlapping	exonic	33
MSTRG.7463	IMPA2	0.902809902	antisense	intergenic	convergent	downstream	2
MSTRG.17538	GBA2	0.959604116	antisense	genic	convergent	exonic	z
MSTRG.12268	CERS5	0.929736588	antisense	genic	overlapping	intronic	33
MSTRG.3248	CDH1	0.901992181	antisense	genic	overlapping	exonic	11
MSTRG.9654	CSF1	0.93356217	antisense	genic	nested	exonic	26
MSTRG.14318	CTNND1	0.905277254	antisense	genic	nested	exonic	5
MSTRG.11905	LPAR2	0.916022355	sense	genic	nested	intronic	30
MSTRG.4769	DAO	0.963258526	antisense	genic	nested	exonic	15
MSTRG.6066	PIPOX	0.98713175	antisense	genic	overlapping	exonic	19

نتایج و بحث

نتایج توالی‌یابی RNA در مجموع هشت نمونه ۱۸۷۶۴۰۶۴۲ میلیون خوانش جفتی با اندازه ۱۵۰ نوکلئوتیدی تولید نمود، که پس از کنترل کیفیت ۱۸۵۲۵۸۸۱۹ خوانش حاصل شد. محتوای GC بین ۵۳ تا ۵۹ درصد بود (جدول ۱) که نشان‌دهنده کیفیت خیلی خوب خوانش‌ها و مناسب بودن داده‌ها جهت آنالیزهای بعدی می‌باشد.

در پژوهش حاضر، تعداد ۱۱۱۷ ژن نسبت به گروه کنترل، دارای بیان افتراقی بودند. تعداد ۱۴۲۱ رونوشت lncRNA مربوط به ۹۲۱ جایگاه ژنی شناسایی شد. نتایج حاصل از بررسی ژن‌های مجاور lncRNAها منجر به شناسایی ۱۵۴ ژن هدف شد. سپس به‌منظور بررسی ویژگی‌های عملکردی و ساختاری ژن‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Enrichr، پنج مسیر عملکردی مشخص شد که در جدول ۲ ارائه شده است. در جدول ۳، ارتباط بین lncRNAها و ژن‌های رمز شونده مسیرهای بیولوژی ارائه شده است.

بر اساس مطالعات گذشته، مشخص شده است که در دمای سرد به‌طور قابل توجهی قند خون ناشتای سرم پرندگان آسیتی در هفته چهار و شش، افزایش و پروتئین سرم در هفته شش آزمایش کاهش می‌یابد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که بخش اصلی افزایش قند خون ناشتا از پروتئین‌های سرم، توسط گلوکونئوژنز تولید می‌شود، این مسیر بیولوژی در کلیه‌ها در جهت تأمین گلوکز رخ می‌دهد، و از مواد غیرقندی از جمله اسکلت کربنی اسیدهای آمینه برای این منظور استفاده می‌شود (Malekshahdehi *et al.*, 2021). مسیر متابولیسم گلایسین، سرین، ترئونین در این پژوهش همانند پژوهش ژو و همکاران (Guo *et al.*, 2023) معنی‌دار شده و ژن D- آمینو اسید اکسیداز (DAO[1]) مربوط به این مسیر زیستی، در سطح مولکولی وظیفه اکسید کردن اسیدهای آمینه D و تولید آمونیاک و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را دارد، این ژن همراه با ژن PIPOX در متابولیسم گلاسین، سرین و ترئونین نقش اساسی بر عهده دارند. به‌طوری‌که، از یک سو اسکلت کربنی اسیدهای آمینه را به متابولیت‌های دیگری مانند اسید پیرویک تبدیل و از آن برای تولید گلوکز از طریق مسیرگلوکونئوژنز استفاده می‌نمایند (Zhang, *et al.*, 2012) و از سوی دیگر، پراکسید هیدروژن یا گونه اکسیژن فعال (ROS[2]) را در اثر دآمیناسیون اسیدهای آمینه D اکسیداز (DAO) تولید می‌نمایند

1- D-amino acid oxidase
2- Reactive oxygen species

(Nagano *et al.*, 2019). یکی از دلایل اصلی آسیت را می‌توان به آسیب سلولی ناشی از تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نسبت داد و جوجه‌های دارای آسیت از تنش اکسیداتیو بالایی رنج می‌برند. نشت الکترون میتوکندری و تولید ROS در طول هیپوکسی و آسیت افزایش می‌یابد (Nemati *et al.*, 2017). همچنین هیپوکسی کلیه، تنش اکسیداتیو را تشدید و تنش اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد ROS منجر به التهاب کلیه و فیبروز می‌شود (Honda *et al.*,2019). افزایش بیان ژن‌های DAO و PIPOX در پرندگان آسیتی پژوهش حاضر از یک سو سبب تأمین گلوکزو تأمین انرژی و از سوی دیگر، سبب افزایش ROS و التهاب کلیه می‌شوند.

مسیر سیگنال‌دهی RAP1 همراه با ژن‌های CDH1، CSF1، CTNND1 و LPAR2 مسیر دیگری است که معنی‌دار شده و تمامی ژن‌های این مسیر افزایش بیان داشته‌اند. پروتئین-۱ مرتبط با Ras (Rap1[1])، یک GTPase کوچک در خانواده پروتئین‌های مرتبط با Ras، تنظیم‌کننده مهم عملکردهای سلولی مانند، تشکیل و کنترل چسبندگی و اتصالات، مهاجرت، قطبیت و تکثیر و بقای سلولی است. سیگنال‌دهی Rap1 چسبندگی سلولی با واسطه اینتگرین یا کادهرین، تنظیم می‌کند (Zhang *et al.*, 2017).

ژن CDH1، ای-کادهرین[2] را بیان می‌کند، ای-کادهرین نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک، از جمله مورفوژنز و بهبود زخم و چسبندگی سلولی وابسته به کلسیم ایفا می‌کند (Balzac *et al.*, 2005)، یکپارچگی سلول‌های اپی‌تلیال، فرآیند آپوپتوزسلولی، التهاب کلیه (Gao *et al.*, 2018)، ای-کادهرین با چندین مسیر انتقال سیگنال‌دهی در تعامل با RAP1 همراه است. از دست دادن ای-کادهرین نشان‌دهنده نقص در یکپارچگی و قطبیت اپی‌تلیال در هنگام آسیب بافتی و فیبروز است (Balzac *et al.*, 2005). ایسکمی سبب تخریب ای-کادهرین و آسیب جدی در اپی تلیال مجاری کلیوی می‌شود، تغییرات در بیان ای-کادهرین ممکن است با گلومرولونفریت، آسیب ایسکمیک کلیه مرتبط باشد. بیان ای-کادهرین در کلیه موش‌های صحرایی با انسداد حالب یک‌طرفه افزایش یافت (Docherty *et al.*, 2009). همانند پژوهش حاضر، سطوح ای-کادهرین در بیماران نفروپاتی ناشی از دیابت افزایش یافت (Ali *et al.*, 2022).

فاکتور محرک کلنی-۱ (CSF-1[3]) توسط سلول‌های اپیتلیال لوله‌های نفرون[4] (TEC) آسیب‌دیده بیان شده (Menke *et al.*, 2009) و بقا، تکثیر و تمایز ماکروفاژها را کنترل می‌کند. CSF-1 نقش مهمی در رشد اندام‌های پس از تولد و ترمیم کلیه ایفا می‌کند. CSF-1 با مکانیسم وابسته به ماکروفاژها ترمیم لوله‌های نفرون را به‌دنبال آسیب حاد ایسکمیک کلیوی ترویج و باعث بهبود آسیب مجاری کلیوی و عملکرد کلیه، کاهش فیبروز کلیه، و آپوپتوز توبولی را سرکوب می‌کند (Menke *et al.*, 2009).گسترش و پلاریزاسیون ماکروفاژها با واسطه CSF-1 ساز و کار مهمی است که بازسازی اپی-تلیال مجاری کلیوی را واسطه می‌کند و پس از آسیب حاد کلیوی ناشی از آسیب ایسکمی و یا خون‌رسانی مجدد (IRI)، افزایش اولیه در ماکروفاژهای کلیوی حاصل از مونوسیت‌های التهابی (M1) و به‌دنبال آن تجمع ماکروفاژهای کلیوی با فنوتیپ ترمیم‌کننده زخم (M2) مشاهده شد. در مقابل، مهار ژنتیکی CSF- ۱ قطبش M2 را کاهش می‌دهد و بهبودی را مهار می‌کند (Zhang *et al.*, 2012). CSF-1 ترمیم کلیه پس از تولد را در موش‌ها پس از آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد، با به‌کارگیری ماکروفاژها سبب شده و با جایگزینی سلول‌های اپی‌تلیال لوله‌ای و کاهش فیبروز بینابینی سرعت ترمیم کلیه را تسریع می‌کند. روی‌هم‌رفته، نشان داده شده است که CSF-1 در رشد کلیه و ارتقای ترمیم و رفع آسیب‌های التهابی مهم است (Alikhan *et al.*, 2011).

ژن CTNND1[5]، رمزکننده p120-catenin(P120ctn)، است، P120ctn حوزه‌های سیتوپلاسمی کادهرین‌ها با پروتئین‌هایی به‌نام کاتنین تعامل دارند. P120ctn به دم سیتوپلاسمی کادهرین‌ها متصل می‌شوند و نقش مهمی در سازماندهی اسکلت سلولی و تنظیم سیگنال‌دهی سلول ایفا می‌کنند. برای چسبندگی مکانیکی قوی در بافت‌های اپیتلیال ضروری هستند. اتصال p120ctn به ای-کادهرین باعث افزایش پایداری پروتئین و کاهش گردش ای-کادهرین در غشای پلاسمایی می‌شود. داده‌ها نشان می‌دهند که عدم وجود p120ctn در مزانشیم متانفریک منجر به کلیه‌های هیپوپلاستیک با مورفوژنز لوله‌ای و گلومرولی معیوب می‌شود. علاوه‌براین، p120ctn برای ایجاد قطر طبیعی لومن و برای جلوگیری از تشکیل کیست در لوله‌های پروگزیمال مورد نیاز است (Marciano *et al.*, 2011).

گیرنده‌های اسیدلیزوفسفاتیدیک (LPAR[6]) گیرنده‌های اختصاصی جفت شده با پروتئینG هستند که با اسیدلیزوفسفاتیدیک (LPA) پیوند می‌خورند تا انواع فرآیندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم و تمایز را واسطه کنند (Li *et al.*, 2016). در بسیاری از مدل‌های آسیب حاد و مزمن کلیه، افزایش پاتولوژیک در LPA با فعال کردن سیگنال‌دهی آپوپتوتیک، تغییرات غیرطبیعی در معماری سلول‌های اپی‌تلیال مجاری کلیوی را افزایش می‌دهد،

1- Ras-associated protein 1(Rap1)
2- E-cadherin
3- Colony Stimulating Factor 1
4- Tubular epithelial cell
5- Catenin Delta 1
6- Lysophosphatidic Acid Receptor 1

سلول‌های ایمنی را به محل آسیب جذب می‌کند و سیگنال‌دهی پروفیبروتیک را تحریک می‌کند (Zhang *et al.*, 2017). تغییرات در بیان و فعال سازی LPAR2 مسیرهای سیگنالینگ را در پایین دست این گیرنده تحریک و سبب فیبروز می‌شود (Reddy *et al.*, 2021).

اسفنگولیپیدها و متابولیت‌های آن‌ها به‌خصوص سرامیدها و اسفنگوزین در سیگنال‌دهی سلولی، تنظیم بقای سلولی، رشد، تکثیر، تمایز و پاسخ‌های سلولی به التهاب با عمل به‌عنوان واسطه‌های سیگنال‌دهی سلولی نقش دارند. متابولیسم غیرطبیعی لیپیدها، نقش مهمی در پاتوژنز و پیشرفت اختلالات کلیوی و نفروپاتی دیابتی ایفا می‌کند (Yokota *et al.*, 2021). یکی از مسیرهایی که در بیماری آسیت معنی‌دار شده است، مسیر زیستی متابولیسم اسفنگولیپید و ژن های GBA2 و CERS5 مرتبط با آن است که افزایش بیان داشته‌اند.

سرامید، یک واسطه کلیدی در متابولیسم اسفنگولیپید است که نقش مهمی در تنظیم رفتار سلولی رشد سلولی، تمایز و آپوپتوز ایفا می‌کنند. CERS5 به‌دلیل توانایی آن در سنتز C16-ceramide، اغلب به‌عنوان یک سرامید پروآپوپتوز مهم در نظر گرفته می‌شود. سنتز de novo سرامید یک محرک مهم برای فعال شدن Bax در شرایط هیپوکسی و یا اکسیژن‌رسانی مجدد می‌باشد. بیان CERS5 نیز به‌دنبال هیپوکسی و یا اکسیژن‌رسانی مجدد افزایش یافته و نشان می‌دهد که CerS5 ممکن است در ارتقاء تنظیم سرامید در این شرایط که منجر به آپوپتوز می‌شود، مهم باشد (Levy Jin *et al.*, 2008 ; and Futerman, 2010).

ژن GBA2[1] آنزیم بتا-گلوکوزیداز ۲ را کد می‌کند که گلوکوزیل-سرامید را تجزیه و به گلوکز و سرامید تبدیل می‌کند. گلوکوزیل‌سرامید (GlcCer) یک گلیکواسفنگولیپید یوکاریوتی (GSL) است که در سطح سیتوپلاسمی غشای سلولی و روی سطح سلول وجود دارد، سطوح کلیوی گلوکوزیل‌سرامید در بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی، بیماری کلیه پلی‌کیستیک، کارسینوم سلول کلیه، نفریتلوپوس و در کاهش عملکرد کلیه، افزایش می‌یابد. بیان GBA2 منجر به کاهش گلوکوزیل‌سرامید و افزایش سطوح سرامید می‌شود، سطح فعالیت GBA2 یکی از عوامل تعیین‌کننده سطوح سرامید است، و نشان می‌دهد که GBA2 ممکن است برای سیگنال‌دهی آپوپتوز با توجه به تولید سرامید که به‌عنوان یک ابلاغ‌کننده مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول است، مرتبط باشد (Yokota *et al.*, 2021).

فسفاتیدیل‌اینوزیتول یکی از معدود لیپیدهایی است که به‌وضوح به‌عنوان پیش‌ساز مولکول‌های سیگنال‌دهی متعدد عمل می‌کند (Balla *et al.*, 2009). پروتئین G، PLC[2]ها، Ca^{2+} عوامل مؤثر مسیر سیگنال‌دهی فسفاتیدیل‌اینوزیتول را تشکیل می‌دهند. هورمون‌ها، انتقال‌دهنده‌های عصبی و سایر مولکول‌های سیگنال، می‌توانند به گیرنده‌های سیستم سیگنال‌دهی فسفاتیدیل‌اینوزیتول متصل شوند و آبشارهای پیام‌رسانی بعدی را تحریک کنند و انواع عملکردهای سلولی از جمله التهاب، متابولیسم، آپوپتوز، و پاسخ ایمنی را کنترل می‌کنند (Zhang, 2021). ژن‌های مؤثر در این مسیر زیستی عبارتند از PLCD4، DGKA، IMPA2 که افزایش بیان داشته‌اند.

دی‌آسیل‌گلیسرول‌کینازآلفا (DGKα) آنزیمی است که توسط ژن DGKA[3] کدگذاری می‌شود. نقش مهمی در سنتز مجدد فسفاتیدیل-اینوزیتول‌ها و فسفریله کردن دی‌آسیل‌گلیسرول (DG[4]) به اسید-فسفاتیدیک (PA[5]) دارد. گزارش شده است که DGKA در پاسخ ایمنی، سیگنال‌دهی لیپید، تولید اگزوزوموم، مهاجرت و همچنین تکثیر سلولی همه فرآیندهایی که به‌عنوان مراحل حیاتی در فیبروژنز پیشنهاد می‌شوند، شرکت می‌کند. نسبت DG/PA برای حفظ هموستاز سلولی مهم است که توسط این آنزیم فراهم می‌شود، در سلول‌های سرطانی، PA تولید شده توسط DGKα نقش مهمی در آنتی‌آپوپتوز دارد (Sakane *et al.*, 2021). DGKα با فعال کردن سیگنال‌دهی PA، نفروپاتی دیابتی را بهبود می‌بخشد. نفروپاتی دیابتی (DN[6]) در اثر فعال شدن غیرطبیعی پروتئین کیناز C (PKC) در نتیجه افزایش تولید دی‌آسیل‌گلیسرول در هیپرگلیسمی دیابتی ایجاد می‌شود. انتظار می‌رود، DGK فعالیت PKC را با کاهش مقدار دی آسیل‌گلیسرول کاهش دهد و می‌تواند فعالیت غیر طبیعی PKC را در طول هیپرگلیسمی طبیعی کند. DGKα با تنظیم مورفولوژی پودوسیت و با جلوگیری از دست رفتن سلول‌های پودوسیت در بهبود DN نقش دارد (Hayashi *et al.*, 2017).

ژن PLCD4، فسفولیپازCدلتا (PLCδ) را کد می‌کند که ممکن است در فرآیندهای تکثیر و تمایز سلولی در ارتباط باشد (Kunrath-Lima *et al.*, 2018). تحت کنترل گیرنده‌های سطح سلولی، این آنزیم فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴،۵- بیس فسفات (PtdIns(4,5)P2[7]) را هیدرولیز و دو محصول درون سلولی اینوزیتول ۱،۴،۵- تری فسفات (InsP3[8]) که سبب افزایش غلظت پیامبر ثانویه کلسیم (Ca^{2+}) و دی‌آسیل‌گلیسرول (DG) به‌عنوان فعال‌کننده پروتئین کیناز C (PKC) تولید می‌کنند (Rebecchi and Pentyala, 2000). کلیه،

1- Glucosylceramidase Beta 2
2- Phosphoinositide-specific phospholipase C

3- Diacylglycerol Kinase Alpha
4- Diacylglycerol
5- Phosphatidic acid
6- Diabetic nephropathy
7- Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
8- Inositol 1,4,5-trisphosphate

اندام مهمی برای حفظ هموستاز Ca^{2+} در بدن است. در طول پیشرفت بیماری کلیوی، سیگنالینگ Ca^{2+} نقش کلیدی در فعالیت‌های سلولی مختلف مانند نکروز، آپوپتوز، اریپتوز و اتوفاژی ایفا می‌کند. اختلال در هموستاز Ca^{2+} باعث یکسری بیماری‌های کلیوی، مانند آسیب حاد کلیه (AKI)، بیماری مزمن کلیه (CKD)، آسیب ایسکمی کلیوی و یا خون‌رسانی مجدد (I/R)، بیماری کلیه پلی‌کیستیک اتوزومال غالب (ADPKD)، پودوسیت و پاتیونفروپاتی دیابتی می‌شود. افزایش سطح سیتوزولی Ca^{2+} ممکن است آپوپتوز را تشدید کند و به آسیب کلیه کمک کند. انتشار پایدار Ca^{2+} ER باعث تنش ER و تنش اکسیداتیو می‌شود و منجر به آپوپتوز در سلول‌های مزانژیال گلومرولی می‌شود که به پیشرفت CKD کمک می‌کند (Ning *et al.*, 2021).

ژن IMPA2[1]، آنزیم میو-اینوزیتول‌مونوفسفاتاز۲[2] را در سلول های اپی‌تلیوم لوله‌های پیچیده دیستال کلیه بیان می‌کند (Ohnishi *et al.*, 2007). میو-اینوزیتول‌مونوفسفاتاز۲، آنزیمی است که میو-اینوزیتول‌مونوفسفات را دفسفریله می‌کند و میو-اینوزیتول آزاد تولید می‌کند (Lin *et al.*, 2019). این مسیر آنزیمی در عملکردهای سلولی مهم است، زیرا میو-اینوزیتول پیش‌ساز فسفولیپید غشایی، فسفاتیدیل-اینوزیتول (PI[3])است (Arai *et al.*, 2007). یکی از منابع میو-اینوزیتول در سلول، اینوزیتول ۱،۴،۵- تری فسفات (InsP3) است که InsP3 تبدیل به اینوزیتول‌منوفسفات شده و در نهایت، با کمک میو-اینوزیتول مونوفسفاتاز۲ تبدیل به میو-اینوزیتول می‌شوند (Ohnishi *et al.*, 2013). InsP3 باعث آزادسازی Ca^{2+} از ذخایر درون سلولی شده (Lin *et al.*, 2019; Ohnishi *et al.*, 2007), سبب تغییرات در هموستازکلسیم می‌شود (Ablimit *et al.*, 2022) همان‌طور که اشاره شد، یون‌های Ca^{2} می‌توانند آپوپتوز را فعال کنند و با تأثیر آنزیم میو-اینوزیتول مونوفسفاتاز ۲ و تبدیل InsP3 به میواینوزیتول سبب کاهش کلسیم درون سلولی و مهار مرگ سلول می‌شود، اکثر مطالعات نشان دادند که مهار IMPA2 ممکن است باعث تجمع InsP3 و یا کاهش میو-اینوزیتول شود که باعث القای آپوپتوز می‌شود (Ning *et al.*, 2021).

O-گلیکوزیلاسیون پروتئین، یک تغییر پس از ترجمه است (Bergstrom and Xia, 2013). O-گلیکان‌ها در تنظیم بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله چسبندگی، آپوپتوز، سیگنال‌دهی سلول، عملکردهای مشخص در سیستم‌های هموستاتیک نقش دارند (Wandall *et al.*, 2021). نشان داده است که اختلال در گلیکوزیلاسیون مرتبط با نوع موسین[4] باعث اختلال در عملکرد کلیه می‌شود (Stotter *et al.*, 2020). در این مسیر زیستی ژن‌های C1GALT1C1 وGCNT4 معنی‌دار شده‌اند.

آنزیم بتا ۱،۳- گالاکتوزیل‌ترانسفراز، منتج از ژن C1GALT1 آنزیمی است که ساختار هسته ۱، O- گلیکان را سنتز می‌کند و در عین‌حال، C1GALT1 برای فعالیت خود به COSMC محصول ژن C1GALT1C1، به‌عنوان چپرون مولکولی[5] خاص برای تاخوردگی، پایداری و فعالیت کامل خود نیاز دارد (Suzuki *et al.*, 2022). ناک اوت C1GALT1C1 باعث رشد نامنظم و التهاب کلیه می‌شود. موش‌هایی که در آن‌ها COSMC-knockout اتفاق افتاد به‌دلیل کاهش هسته ۱، O-گلیکان‌ها، اختلال عملکرد کلیوی را نشان دادند (Suzuki *et al.*, 2022). C2GnT3 (GCNT4) گلیکان‌های هسته۱ را به هسته۲ تبدیل می‌کنند (Wandall *et al.*, 2021). سلول‌های لوله‌های پروگزیمال (PT[6]) دارای یک غشای لبه مسواکی مانند (BBM[7]) هستند که حاوی گلیکوپروتئین‌های متعددی است که به حفظ هموستازی کمک می‌کنند و اغلب در بیماری کلیوی مختل می‌شوند. در مطالعه‌ای، O-گلیکان‌های موجود در BBM موش که دچار بیماری کلیوی بوده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که اختلالات PT به اختلال عملکرد بیماری مزمن کلیه کمک می‌کند و بسیاری از عملکردهای گلیکوپروتئین به N- و O-گلیکان آن‌ها نسبت داده شده است (Yu *et al.*, 2021). O-گلیکان-ها در حفظ یکپارچگی منافذ شکاف پودوسیت و فیلتراسیون گلومرولی نقش بسیار مهم دارند (Ravidà *et al.*, 2015). با تجزیه و تحلیل اجزای سد فیلتراسیون گلومرولی مشخص شده است که از دست دادن O- گلیکان‌ها منجر به تغییر فرآیندهای پودوسیتمی‌شود، موش‌های دارای کمبود O- گلیکان پروتئینوری خودبه‌خود و گلومرولواسکلروز به‌سرعت در حال پیشرفت را نشان می‌دهند. این نتایج عملکرد جدیدی از O- گلیکان‌ها را در هموستاز گلومرول نشان می‌دهد (Song *et al.* 2017). همچنین مشخص شده است که حیوانات با پودوسیت‌های COSMC-Null دچار آلبومینوری، اسکلروز گلومرولی و نارسایی کلیه می‌شوند که منجر به مرگ زودرس می‌شود (Stotter *et al.*, 2020).

C1GALT1C1 در سلول‌های ترشح‌کننده IgA1، سلول‌های خونی، دستگاه گوارش، کلیه‌هاو ریه‌ها بیان می‌شود (Kiryluk *et al.*, 2017). بتا ۱،۳- گالاکتوزیل‌ترانسفراز۱ به همراه، COSMC، نقش مهمی در گلیکوزیلاسیون مولکول IgA1 دارند (Li *et al.*, 2007) 1IgA فاقد گالاکتوز (Gd-IgA1) یکی از ویژگی‌های اصلی بیماری نفروپاتی IgA (N^1IgA) است که شایع‌ترین شکل گلومرولونفریت

1- Inositol Monophosphatase 2
2- Myo-inositol Monophosphatase 2
3- Phosphatidylinositol
4- Mucin type O-glycan biosynthesis
5- Molecular chaperone
6- Proximal tubule
7- Brush border membrane

است و ارتباط بسیار معنی‌داری بین بیان C1GALT1C1 و O-گلیکوزیلاسیون NIgA مشاهده شده است (Xie *et al*., 2010). کاهش بیان C1GALT1C1 سبب افزایش تولید 1IgAGd- و ایجاد NIgA می‌شود. در NIgA، پاسخ التهابی مشاهده می‌شوند (Kiryluk *et al*., 2017). تعادل بین تقاضا و بیوسنتز O– گلیکوزیلاسیون مهم است و از آن‌جا که بیوسنتز O-گلیکوزیلاسیون 1IgA به بتا۱،۳– گالاکتوزیل‌ترانسفراز و همراه با آن بیان مناسب C1GALT1C1 نیاز است، لذا به‌منظور جلوگیری از O–گلیکوزیلاسیون نابجای 1IgA در بیماران مبتلا به NIgA، بیان C1GALT1C1 افزایش می‌یابد و سبب بهبود O- گلیکوزیلاسیون 1IgA شده و از افزایش IgAN جلوگیری نماید (Xie *et al*., 2010). لذا، به‌منظور حفظ عملکرد، هموستازی، کارکرد فیلتراسیون گلومرولی کلیه، در پرندگان آسیتی افزایش بیان C1GALT1C1 و GCNT4 منطقی به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه، تعداد ۱۴۲۱ رونوشت lncRNA مربوط به ۹۲۱ جایگاه ژنی و ۱۵۴ ژن هدف مربوط به آن در مقایسه بین پرندگان آسیتی و سالم شناسایی شد و پنج مسیر زیستی و ۱۳ ژن مربوط به آن‌ها را به‌طور معنی‌داری درگیر نموده است. این مسیرها در شرایط هیپوکسی که در اثر آسیت عارض می‌شوند، به‌عنوان تعدیل‌کننده آسیب فعال می‌شوند. علاوه‌برآن، انرژی مورد نیاز را تأمین و هموستازی کلیه‌ها در پاسخ به تنش اکسیژن ناشی از آسیت را برقرار می‌کنند، از سوی دیگر، بقای سلول، افزایش تکثیر و ضد آپوپتوز عمل می‌کنند که این خود از یک سو، سبب کاهش آسیب کلیوی و از سوی دیگر، سبب عملکرد بهترآن شده و از این طریق، در کاهش عوارض ناشی از آسیب آسیتی کلیه و کمبود اکسیژن بافتی عمل می‌نمایند. نتایج ما بینش جدیدی در مورد عملکرد lncRNAها در آسیت از طریق ژن‌های هم جوار ارائه کرد که با بررسی بیشتر این ژن‌ها می‌توان در جهت کنترل این بیماری اقدام نمود و همچنین یافته‌های این پژوهش می‌تواند در اصلاح نژاد پرنده‌های گوشتی با به‌کارگیری lncRNAها و ژن‌های مرتبط با آن در تهیه مارکرهای ژنتیکی و یا بیومارکرهای تشخیصی استفاده شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد، گرنت شماره ۳/۴۶۹۴۳ انجام شد.

References

1. Ablimit, T., Tursun, G., Zhang, Y., Abduxkur, G., Abdurexit, G., & Abliz, G. (2022). Inositol monophosphatase 2 promotes epithelial ovarian cancer cell proliferation and migration by regulating the AKT/mTOR signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *24*(5), 1-8. http//:doi.org/10.3892/etm.2022.11604
2. Adetula, A. A., Gu, L., Nwafor, C. C., Du, X., Zhao, S., & Li, S. (2018). Transcriptome sequencing reveals key potential long non-coding RNAs related to duration of fertility trait in the uterovaginal junction of egg-laying hens. *Scientific Reports*, *8*(1), 13185 http//:doi.org /10.1038/s41598-018-31301-z.
3. Ali, H., Abu-Farha, M., Hammad, M. M., Devarajan, S., Bahbahani, Y., Al-Khairi, I., & Al-Mulla, F. (2022). Potential role of N-Cadherin in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 882700. http//:doi.org /10.3389/fendo.2022.882700
4. Alikhan, M. A., Jones, C. V., Williams, T. M., Beckhouse, A. G., Fletcher, A. L., Kett, M. M., & Deane, J. A. (2011). Colony-stimulating factor-1 promotes kidney growth and repair via alteration of macrophage responses. *The American Journal of Pathology*, *179*(3), 1243-1256. http//:doi.org /10.1016/j.ajpath.2011.05.037
5. Arai, R., Ito, K., Ohnishi, T., Ohba, H., Akasaka, R., Bessho, Y., & Yokoyama, S. (2007). Crystal structure of human myo-inositol monophosphatase 2, the product of the putative susceptibility gene for bipolar disorder, schizophrenia, and febrile seizures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *67*(3), 732-742. http//:doi.org /10.1002/prot.21299
6. Balla, T., Szentpetery, Z., & Kim, Y. J. (2009). Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology*. *24*, 231–244. http//:doi.org /10.1152/physiol.00014.2009.
7. Balzac, F., Avolio, M., Degani, S,. Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., & Retta, S. F. (2005). E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *Journal of Cell Science*, *118*(20), 4765-4783. http//:doi.org /10.1242/jcs.02584

1- Immunoglobulin A Nephropathy

8. Bergstrom, K. S., & Xia, L. (2013). Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Glycobiology, 23*(9), 1026-1037. http//:doi.org /10.1093/glycob/cwt045.
9. Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., & Members of the Mouse GenomeAnalysis, G. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature, 420*(6915), 520-562. http//:doi.org / 10.1038/nature01262
10. Cowen, B., Rothenbacher, H., Schwartz, L., Braune, M., & Owen, R. (1988). A case of acute pulmonary edema, splenomegaly, and ascites in Guinea fowl. *Avian Diseases, 32(1)*, 151-156 http//:doi.org /10.2307/1590966.
11. Docherty, N. G., Calvo, I. F., Quinlan, M. R., Pérez-Barriocanal, F., McGuire, B. B., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. G. (2009). Increased E-cadherin expression in the ligated kidney followingunilateral ureteric obstruction. *Kidney International, 75*(2), 205-213 . http//:doi.org /10.1038/ki.2008.482.
12. Gao, L., Liu, M. M., Zang, H. M., Ma, Q. Y., Yang, Q., Jiang, L., & Wang, J. N. (2018). Restoration of E-cadherin by PPBICA protects against cisplatin-induced acute kidney injuryby attenuating inflammation and programmed cell death. *Laboratory Investigation, 98*(7), 911-923. http//:doi.org /10.1038/s41374-018-0052-5
13. Guo, D., Zhang, J., Han, Y., Cui, L., Wang, H., Wang, K., & Duan, Z. (2023). Transcriptomic study on the lungs of broilers with ascites syndrome. *Animals, 13*(1), 175. http//:doi.org /10.3390/ani13010175
14. Gupta, A. (2011). Ascites syndrome in poultry: A review. *World's Poultry Science Journal, 67*(3), 457-468. http//:doi.org /10.1017/S004393391100050X..
15. Hasanpur, K., Nassiri, M., & Hosseini Salekdeh, G. (2019). The comparative analysis of phenotypic and whole transcriptome gene expression data of ascites susceptible versus ascites resistant chickens. *Molecular Biology Reports, 46*, 793-80a. Doi.org/10.1007/s11033-018-4534-8.
16. Hayashi, D., Yagi, K., Song, C., Ueda, S., Yamanoue, M., Topham, M., & Shirai, Y. (2017). Diacylglycerol kinase alpha is involved in the vitamin E-induced amelioration of diabetic nephropathy in mice. *Scientific Reports, 7*(1), 2597 . http//:doi.org /10.1038/s41598-017-02354-3.
17. Honda, T., Hirakawa, Y., & Nangaku, M. (2019). The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease. *Kidney Research and Clinical Practice, 38*(4), 414. http//:doi.org /10.23876/j.krcp.19.063
18. Hu, X., Chen, S., Jia, C., Xue, S., Dou, C., Dai, Z., & Cui, H. (2018). Gene expression profile and long non-coding RNA analysis, using RNA-Seq, in chicken embryonic fibroblast cells infected by avian leukosis virus J. *Archives of Virology, 163*, 639-647 http//:doi.org /10.1007/s00705-017-3659-8 .
19. Jin, J., Hou, Q., Mullen, T. D., Zeidan, Y. H., Bielawski, J., Kraveka, J. M., & Hsu, Y. T. (2008). Ceramide generated by sphingomyelin hydrolysis and the salvage pathway is involved in hypoxia/reoxygenation-induced Bax redistribution to mitochondriain NT-2 cells. *Journal of Biological Chemistry, 283*(39), 26509-26517 http//:doi.org /10.1074/jbc.M801597200
20. Kiryluk, K., Li, Y., Moldoveanu, Z., Suzuki, H., Reily, C., Hou, P., & Fischman, C. (2017). GWAS for serum galactose-deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. *PLoS Genetics, 13*(2), e1006609. http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006609
21. Kosinska-Selbi, B., Mielczarek, M., & Szyda, J. (2020). Long non-coding RNA in livestock. *Animal, 14(10)*, 2003-2013. http//:doi.org /10.1017/S1751731120000841
22. Kunrath-Lima, M., de Miranda, M. C., da Fonseca Ferreira, A., Faraco, C. C. F., de Melo, M. I. A., Goes, A. M., & Gomes, D. A. (2018). Phospholipase C delta 4 (PLCδ4) is a nuclear protein involved in cell proliferation and senescence in mesenchymal stromalstem cells. *Cellular Signalling, 49*, 59-67. http//:doi.org /10.1016/j.cellsig.2018.05.011
23. Lee, K. P., Anthony, N. B., Orlowski, S. K., & Rhoads, D. D. (2022). SNP-based breeding for broiler resistance to ascites and evaluation of correlated production traits. *Hereditas, 159*(1), 1-15. http//:doi.org /10.1186/s41065-022-00228-x
24. Levy, M., & Futerman, A. H. (2010). Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life, 62*(5), 347-356. http//:doi.org /10.1002/iub.319
25. Li, D., Li, F., Jiang, K., Zhang, M., Han, R., Jiang, R., & Kang, X. (2019). Integrative analysis of long noncoding RNA and mRNA reveals candidate lncRNAs responsible formeat quality at different physiological stages in Gushi chicken. *PloS One, 14*(4), e0215006. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0215006.
26. Li, G. S., Zhang, H., Lv, J. C., Shen, Y., & Wang, H. Y. (2007). Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Kidney International, 71*(5), 448-453 http//:doi.org /10.1038/sj.ki.5002088.
27. Li, M., Xiao, D., Zhang, J., Qu, H., Yang, Y., Yan, Y., & Wang, J. (2016). Expression of LPA2 is associated with poor prognosis in human breast cancer and regulates HIF-1α expression and breast cancer cell growth. *Oncology Reports, 36*(6), 3479-3487. http//:doi.org /10.3892/or.2016.5206

28. Lin, Y. F., Chou, J. L., Chang, J. S., Chiu, I. J., Chiu, H. W., & Lin, Y. F. (2019). Dysregulation of the miR-25-IMPA2 axis promotes metastatic progression in clear cell renal cell carcinoma. *EBioMedicine, 45*, 220-230. http//:doi.org /10.1016/j.ebiom.2019.06.006.
29. Liu, Y., Sun, Y., Li, Y., Bai, H., Xue, F., Xu, S., & Chen, J. (2017). Analyses of long non-coding RNA and mRNA profiling using RNA sequencing in chicken testis with extreme sperm motility. *Scientific Reports, 7*(1), 1-8 http//:doi.org /10.1038/s41598-017-08738-9.
30. Lorenzen, J. M., Haller, H., & Thum, T. (2011). MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology, 7*(5), 286–294. http://dx.doi.org/ 10.1038/nrneph.2011.26. http//:doi.org /10.1038/nrneph.2011.26
31. Lorenzen, J. M., & Thum, T. (2016). Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. *Nature Reviews Nephrology, 12*(6), 360-373. http//:doi.org /10.1038/nrneph.2016.51.
32. Malekshahdehi, S., Hafezian, S., Rahimi-Mianji, G., & Hasanpur, K. (2021). Investigation of gender differences in the incidence of ascites and profile of gene expression in kidney tissue of broiler chickens. *Animal Production Research, 10*(3), 33-44 http//:doi.org /10.22124/AR.2021.17794.1563.
33. Marciano, D. K., Brakeman, P. R., Lee, C.-Z., Spivak, N., Eastburn, D. J., Bryant, D. M., & Reichardt, L. F. (2011). p120 catenin is required for normal renal tubulogenesis and glomerulogenesis. *Development, 138*(10), 2099-2109 http//:doi.org /10.1242/dev.056564.
34. Menke, J., Iwata, Y., Rabacal, W. A., Basu, R., Yeung, Y. G., Humphreys, B. D., & Kelley, V. R. (2009). CSF-1 signals directly to renal tubular epithelial cells to mediate repair in mice. *The Journal of Clinical Investigation, 119*(8), 2330-2342. http//:doi.org /10.1172/JCI39087..
35. Nagano, T., Yamao, S., Terachi, A., Yarimizu, H., Itoh, H., Katasho, R., & Kikkawa, U. (2019). D-aminoacid oxidase promotes cellular senescence via the production of reactive oxygen species. *Life Science Alliance, 2(1), 1-14* . http//:doi.org /10.26508/lsa.201800045.
36. Nemati, M., Shahir, M., Harakinezhad, M., & Lotfalhian, H. (2017). Cold-induced ascites in broilers: effects of vitamin C and coenzyme Q10. *Brazilian Journal of Poultry Science, 19*, 537-544 . http//:doi.org /10.1590/1806-9061-2017-0463.
37. Ning, B., Guo, C., Kong, A., Li, K., Xie, Y., Shi, H., & Gu, J. (2021). Calcium signaling mediates cell death and crosstalk with autophagy in kidney disease. *Cells, 10*(11), 3204. http//:doi.org /10.3390/cells10113204
38. Ohnishi, T., Ohba, H., Seo, K. C., Im, J., Sato, Y., Iwayama, Y., & Yoshikawa, T. (2007). Spatial expression patterns and biochemical properties distinguish a second myo-inositol monophosphatase IMPA2 from IMPA1. *Journal of Biological Chemistry, 282*(1), 637-646 http//:doi.org /10.1074/jbc.M604474200.
39. Ohnishi, T., Tanizawa, Y., Watanabe, A., Nakamura, T., Ohba, H., Hirata, H., & Watanabe, K. (2013). Human myo-inositol monophosphatase 2 rescues the nematode thermotaxis mutant ttx-7 more efficiently than IMPA 1: Functional and evolutionary considerations of the two mammalian myo-inositol monophosphatase genes. *Journal of Neurochemistry, 124*(5), 685-694. http://doi.org/10.1111/jnc.12112
40. Ørom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., & Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell, 143*(1), 46-58. http//:doi.org /10.1016/j.cell.2010.09.001
41. Peng, Y., Chang, L., Wang, Y., Wang, R., Hu, L., Zhao, Z., & Li, J. (2019). Genome-wide differential expression of long noncoding RNAs and mRNAs in ovarian follicles of two different chicken breeds. *Genomics, 111*(6), 1395-1403. http//:doi.org /10.1016/j.ygeno.2018.09.012
42. Ravidà, A., Musante, L., Kreivi, M., Miinalainen, I., Byrne, B., Saraswat, M., & Holthofer, H. (2015). Glycosylation patterns of kidney proteins differ in rat diabetic nephropathy. *Kidney International, 87*(5), 963-974. http//:doi.org /10.1038/ki.2014.387.
43. Rebecchi, M. J., & Pentyala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiological Reviews, 80*(4), 1291-1335 http//:doi.org /10.1152/physrev.2000.80.4.1291.
44. Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2021). Cooperative activation of divergent pathways by LPAR1 and LPAR2 receptors in fibrotic signaling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology, 320*(3), F322-f324. http//:doi.org /10.1152/ajprenal.00685.2020
45. Ren, T., Li, Z., Zhou, Y., Liu, X., Han, R., Wang, Y., & Kang, X. (2018). Sequencing and characterization of lncRNAs in the breast muscle of Gushi and Arbor Acres chickens. *Genome, 61*(5), 337-347 . http//:doi.org /10.1139/gen-2017-0114.
46. Ronco, C., McCullough, P., Anker, S. D., Anand, I., Aspromonte, N., Bagshaw, S. M., Bellomo, R., Berl, T., Bobek, I., & Cruz, D. N, (2010). Cardio-renal syndromes: Report from the consensus conference of the acute dialysis quality initiative. *European Heart Journal, 31*(6), 703-711. http//:doi.org /10.1093/eurheartj/ehp507

47. Sakane, F., Hoshino, F., Ebina, M., Sakai, H., & Takahashi, D. (2021). The roles of diacylglycerol kinase α in cancer cell proliferation and apoptosis. *Cancers, 13(20)*, 1-13 http//:doi.org /10.3390/cancers13205190.
48. Shi, S., Shen, Y., Zhang, S., Zhao, Z., Hou, Z., Zhou, H., & Guo, Y. (2017). Combinatory evaluation of transcriptome and metabolome profiles of low temperature-induced resistant ascites syndrome in broiler chickens. *Scientific Reports, 7(1)*, 1-16. http//:doi.org /10.1038/s41598-017-02492-8
49. Song, K., Fu, J., Song, J., Herzog, B. H., Bergstrom, K., Kondo, Y., & Lupu, F. (2017). Loss of mucin-type O-glycans impairs the integrity of the glomerular filtration barrier in the mouse kidney. *Journal of Biological Chemistry, 292*(40), 16491–16497. http//:doi.org /10.1074/jbc.M117.798512.
50. Stotter, B. R., Talbot, B. E., Capen, D. E., Artelt, N., Zeng, J., Matsumoto, Y., & Schlondorff, J. S. (2020). Cosmc-dependent mucin-type O-linked glycosylation is essential for podocyte function. *American Journal of Physiology-Renal Physiology, 318*(2), F518-F530. http//:doi.org /10.1152/ajprenal.00399.2019.
51. Suzuki, R., Nakamura, Y., Koiwai, R., Fuseya, S., Murakami, Y., Hagiwara, K., & Kudo, T. (2022). global loss of core 1-derived o-glycans in mice leads to high mortality due to acute kidney failure and gastric ulcers. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(3), 1273. http//:doi.org /10.3390/ijms23031273
52. Taghizadeh, V., Nassiri, M.R., Tahmoorespur, M., Bakhtiarizadeh, M. R., & Javadmanesh, A. (2018). Gene expression network analysis on angiogenesis pathway in low temperature-induced ascites susceptible chickens in B-line pedigree of Iranian meat-type strain, Arian. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *10*(2), 249-262. In Persian with English Summary.
53. Wandall, H. H., Nielsen, M. A., King-Smith, S., de Haan, N., & Bagdonaite, I. (2021). Global functions of O-glycosylation: promises and challenges in O-glycobiology. *The FEBS Journal, 288*(24), 7183-7212. http//:doi.org /10.1111/febs.16148
54. Xiao, Y., Hu, J., & Yin, W. (2018). Systematic identification of non-coding RNAs. *Non-coding RNAs in Complex Diseases: A Bioinformatics Perspective*, 9-18. http//:doi.org /10.1007/978-981-13-0719-5_2.
55. Xie, L. S., Qin, W., Fan, J. M., Huang, J., Xie, X. S., & Li, Z. (2010). The role of C1GALT1C1 in lipopolysaccharide-induced IgA1 aberrant O-glycosylation in IgA nephropathy. *Clinical and Investigative Medicine*, E5-E1. http//:doi.org /10.25011/cim.v33i1.11832 3.
56. Yin, Z., Lian, L., Zhu, F., Zhang, Z. H., Hincke, M., Yang, N., & Hou, Z. C. (2020). The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (Gallus gallus) egg formation. *Genomics, 112*(1), 243-251. http//:doi.org /10.1016/j.ygeno.2019.02.003
57. Yokota, R., Bhunu, B., Toba, H., & Intapad, S. (2021). Sphingolipids and kidney disease: possible role of preeclampsia and intrauterinegrowth restriction (IUGR). *Kidney360, 2*(3), 534. http//:doi.org /10.34067/KID.0006322020.
58. Yu, A., Zhao, J., Zhong, J., Wang, J., Yadav, S. P. S., Molitoris, B. A., & Mechref, Y. (2021). Altered O-glycomes of renal brush-border membrane in model rats with chronic kidney diseases. *Biomolecules, 11*(11), 1560. http//:doi.org /10.3390/biom11111560
59. Zhang, M. Z, Yao, B., Yang, S., Jiang, L., Wang, S., Fan, X., & Chen, J. (2012a). CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation, 122*(12), 4519-4532. http//:doi.org /10.1172/JCI60363.
60. Zhang, T., Zhang, X., Han, K,. Zhang, G., Wang, J., Xie, K., & Fan, X. (2017). Analysis of long noncoding RNA and mRNA using RNA sequencing during the differentiation of intramuscular preadipocytes in chicken. *PloS One*, *12*(2), e0172389. http//:doi.org /10.1371/journal.pone.0172389
61. Zhang , X. (2021). A Brief Note on Phosphatidylinositol (PI) Signal Pathway. *Journal of Cell Signaling, 6*(11), 1.
62. Zhang, Yi. L., Wang, R. C., Cheng, K., Ring, B. Z., & Su, L. (2017). Roles of Rap1 signaling in tumor cell migration and invasion. *Cancer Biology & Medicine, 14*(1), 90. http//:doi.org / 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0086
63. Zhang, Y., Baker, S. S., Baker, R. D., Zhu, R., & Zhu, L. (2012). Systematic analysis of the gene expression in the livers of nonalcoholic steatohepatitis: Implications on potential biomarkers and molecular pathological mechanism. *PloS One, 7*(12), e51131. http//:doi.org /10.1371/journal.pone.0051131
64. Zhang, Y,. Su, W., Zhang, B., Ling, Y., Kim, W. K., & Zhang, H. (2021). Comprehensive analysis of coding and non-coding RNA transcriptomes related to hypoxic adaptation in Tibetan chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology, 12*, 1-14. http//:doi.org /10.1186/s40104-021-00582-2

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 249-258

Genome-Wide Association Study Based on Mega-Analysis to Detect Genomic Regions Associated with Prolificacy in Sheep

Hossein Mohammadi[1*]

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, Iran
*Corresponding Author's Email: H-mohammadi37@araku.ac.ir

Received: 24-07-2023
Revised: 30-09-2023
Accepted: 21-10-2023
Available Online: 21-10-2023

How to cite this article:
Mohammadi, H. (2024). Genome-wide association study based on mega-analysis to detect genomic regions associated with Prolificacy in sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 249-258 . (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83596.1164

Introduction: Genetic architecture of sheep reproduction is increasingly gaining scientific interest due to the major impact on sheep production systems. The number of lambs per lambing is one of the m ost important reproductive traits in sheep. Many studies have reported that genetic mechanisms play an important role in the variation of litter size in sheep. Reproductive traits normally show low heritability and therefore response to conventional selection methods is not satisfactory for these traits. Considering the genetic information of the genetic variants underlying reproduction variability could efficiently increase the selection efficacy. Genome-wide association studies (GWAS) have been used to identify associations between genotypes and phenotypes as well as candidate genes for reproductive economically important traits. Statistical power in GWAS is mostly affected by sample size. The low sample size is hence a main obstacle in GWAS. Combining multiple data sets of different studies for joint (mega) GWAS provides an opportunity to increase the sample size required for GWAS. This study was performed to identify genomic regions affecting litter size in different sheep breeds using the mega-analysis of GWAS.

Materials and Methods: Multi-population joint GWAS was performed using genotypic and phenotypic data of three sheep breeds including native Zandi and two breed retrieved from the database. Quality control was performed using the Plink software. The markers or individuals were removed from the further study based on the following criteria: (1) unknown chromosomal or physical location, call rate <0.90, missing genotype frequency >0.05, minor allele frequency (MAF) < 0.05, and a P value for Hardy–Weinberg equilibrium test less than 10^{-6}. Before analysis, imputation of missing genotypes for combined data set was implemented by LD-kNNi method. Mega-analysis was performed using a mixed linear model in TASSEL software considering kinship and population structure (top five components of principal component analysis (PCA)) as confounding effects. The quantile–quantile (Q–Q) plot was visualized by plotting the distribution of obtained vs. expected log10 (P-value). The association results along the genome and the significant SNPs were visualized in the Manhattan plot. To account for multiple test problem and identify the genome-wide significance level, Bonferroni test was used based on the number of independent SNPs obtained from pairwise linkage disequilibrium analysis. After GWAS analysis, the 500 bp sequence upstream and downstream of the significant SNP was explored to identify the adjacent candidate genes using *ARS-UI_Ramb_v2.0* (Genome Data Viewer).

Results and Discussion: In the present study, we implemented a mega GWAS using three different sheep breed data to identify the genetic mechanisms responsible for litter size in sheep. After quality control, 671 animals and 45167 SNP markers were kept for further analysis. The results of the mega-analysis identified nine marker on chromosome on chromosomes 1 (two SNP), 2, 3 (two SNP), 10, 13 (two SNP), and 22. The quantile–quantile plot that features the total distribution of the observed P-values (−log10 P-values) of quality passed SNPs vs. the expected values, showed the effective control for confounding effects. Many of the significant SNPs identified in this study were located in or very adjacent to known genes (*DLG1*, *CLSTN2*, *INHBE*, *TCFL5*, and *RBP4*) that have been already reported for their contribution to fertility and pregnancy success. It has been

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83596.1164

reported that the *RBP4* gene is expressed during the period of fast elongation of the pig blastocyst which is a crucial period for the survival of the embryos. Also, it has been suggested that *CLSTN2* has the main contribution in uterine and conceptus physiology during the establishment of pregnancy and therefore can be considered as a candidate gene for litter size. *INHBE* has an essential function during ovulation and pregnancy through extracellular matrix (ECM) components degradation and therefore enabling cell migration and angiogenesis.

Conclusion: Comparison of the results of this study with previous reports showed that the mega-analysis of GWAS, compared to the meta-analysis already reported for GWAS results, had comparable power in identifying genomic regions influencing litter size in sheep but identified fewer genomic regions than individual GWAS for each breed. No previously reported major genes controlling litter size in sheep were identified using our mega GWAS. The results of our research are suggested for further investigations in identifying causal genetic variants or genomic regions underlying the litter size variation in sheep and can be used to understand the genetic mechanism controlling this trait.

Keywords: Association analysis, Genomic region, Genetic Marker, Improving fertility, Mega-Analysis.

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۵۸-۲۴۹

پویش ژنومی بر پایه آنالیز چند جمعیتی مشترک مرتبط با صفت تعداد نتاج متولد شده در گوسفندان نژاد بومی و خارجی

حسین محمدی[1*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۹

چکیده

تعداد بره متولد شده در هر زایش یکی از مهم‌ترین صفات اقتصادی و تولیدمثلی در گوسفند است. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی مناطق ژنومی و ژن‌های کاندیدای مرتبط با چندقلوزایی در نژادهای مختلف گوسفند با رویکرد مگاآنالیز پویش ژنومی از طریق استفاده از اطلاعات مربوط به سه نژاد زندی، راهمنی و کایاس می‌باشد. بدین منظور، از اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی ۶۸۲ رأس دام شامل نژادهای زندی (۹۶)، راهمنی (۴۸) و کایاس (۵۳۸) تعیین ژنوتیپ شده با از آرایه‌های 50K گوسفندی، استفاده شد. پس از مراحل مختلف کنترل کیفیت و ادغام داده‌های تعیین ژنوتیپ شده، ۶۷۱ رأس دام و ۴۵۱۶۷ نشانگر SNP برای ادامه آنالیزهای پویش ژنومی مورد استفاده قرار گرفتند. مگاآنالیز با استفاده از مدل خطی مختلط در نرم‌افزار TASSEL با در نظر گرفتن روابط خویشاوندی و ساختار جمعیتی انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که تعداد نه نشانگر روی کروموزوم‌های شماره ۱ (دو نشانگر)، ۲، ۳ (دو نشانگر)، ۱۰، ۱۳ (دو نشانگر) و ۲۲ به‌طور معنی‌داری با صفت چندقلوزایی مرتبط می‌باشند. بررسی مناطق ژنومی کاندیدا به‌وسیله پایگاه‌های داده‌ای برخط نشان داد ژن‌های کاندیدای *DLG1*، *CLSTN2*، *INHBE*، *TCFL5* و *RBP4* نقش مؤثری در باروری، آبستنی موفق، فرآیند آزادسازی تخمک و اوولاسیون دارند. نتایج این پژوهش می‌تواند در درک ساز و کار ژنتیکی کنترل‌کننده چندقلوزایی در گوسفند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز پیوستگی، بهبود باروری، مگاآنالیز، ناحیه ژنومی، نشانگر ژنتیکی

مقدمه

صفات تولیدمثلی، مهم‌ترین صفات مؤثر بر سودآوری اقتصادی سیستم‌های پرورش گوسفند هستند و سالانه به‌طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر توانایی میش در تولید بره‌های بیشتر قرار می‌گیرند (Abdoli *et al.*, 2019). از سوی دیگر، تولیدمثل یک فرآیند پیچیده زیست‌شناختی بوده که علاوه‌بر شرایط محیطی تحت تأثیر فاکتورهای ژنتیکی نیز قرار می‌گیرد. از طرفی، تعداد نتاج متولد شده در هر زایش یکی از مهم‌ترین صفت اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند است. در واقع، یکی از اجزای بیولوژیکی در تولید، صفات تولیدمثلی می‌باشد، لذا بازده پرورش گوسفند به‌مقدار زیادی تابع توان تولید مثلی میش‌ها می‌باشد. به‌عبارت دیگر، افزایش تعداد بره‌های متولد شده به‌ازای هر میش در یک سال سبب افزایش بازده تولید در پرورش گوسفند خواهد شد (Zhang *et al.*, 2022).

گوسفند زندی یکی از نژادهای متوسط وزن کشور بوده و از نظر صفات عملکردی دارای خصوصیات مطلوبی می‌باشد، به‌طوری‌که چربی زیرپوستی در این نژاد در مقایسه با بسیاری از نژادهای گوسفند دیگر ایرانی کمتر می‌باشد. همچنین، مقاومت در برابر سرما و گرما (از ۲۰- درجه سانتی‌گراد در زمستان تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد در تابستان)، شرایط سخت تغذیه‌ای و مراتع ضعیف و هوای بارانی و برفی در این گوسفند بسیار شایان توجه است (Bohlouli *et al.*, 2013). گوسفند نژاد راهمنی جزو سه نژاد اصلی پرورشی در کشور مصر است و نژاد مقاوم به شرایط آب و هوایی گرم و خشک بوده و به نژاد با تولید گوشت کیفیت بالا شهرت دارد (El-Halawany *et al.*, 2016). همچنین، نژاد کایاس مورد استفاده در پژوهش حاضر، یکی از نژادهای گوسفند معروف کشور یونان از نظر صفات تولیدی و تولیدمثلی می‌باشد. به‌طوری‌که این نژاد دارای تولید شیر بالا و عملکرد تولیدمثلی مطلوبی در سیستم‌های پرورشی صنعتی و نیمه صنعتی است (Tsartsianidou *et al.*, 2023).

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: H-mohammadi37@araku.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83596.1164

در طی سال‌های اخیر، تکنیک‌های بیولوژی مولکولی با سرعت شگرفی توسعه پیدا کرده و موجب گردیده است تا پروژه‌های مختلف توالی‌یابی کل ژنوم، از جمله گوسفند تکمیل شود و متعاقب آن پانل-های مختلفی از آرایه‌های نانویی با تراکم متفاوت طراحی شده و انجام مطالعات پویش کل ژنومی را امکان‌پذیر نماید. مطالعه پویش ژنومی می‌تواند به شناسایی دقیق ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی کمک کرده و یافته‌های آن برای انتخاب به‌کمک نشانگر مفید باشد (Johnston *et al.*, 2011).

مطالعات مختلفی برای شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفات تولیدمثلی در گوسفند با رویکرد پویش کل ژنومی انفرادی انجام شده است (Xu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, Abdoli *et al.*, 2019; 2022; Ramos *et al.*, 2023). اندازه جمعیت مورد مطالعه یکی از پارامترهای اصلی مؤثر بر صحت پیش‌بینی ژنومی است. در مورد نژادهای با اندازه جمعیت کوچک، دستیابی به یک جمعیت پایه به اندازه کافی بزرگ، ممکن است بسیار دشوار و یا غیر ممکن باشد که در این صورت، اضافه کردن افراد از نژادهای دیگر می‌تواند به حل مشکل کمک نماید (Marjanovic and Calus, 2020). در آنالیز پویش ژنومی، اندازه نمونه مهم‌ترین عاملی است که قدرت آماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در کنترل محقق است. به‌طور خاص، اندازه نمونه یک مانع بزرگ برای آنالیزهای پویش ژنومی در صفاتی است که اندازه‌گیری آن‌ها دشوار و یا هزینه‌بر است. یکی از راهکارهای حل محدودیت اندازه نمونه در فهم ساز و کار ژنتیکی صفات، ترکیب کردن نمونه‌های کوچک‌تر برای پویش ژنومی مشترک (مگاآنالیز) است (Gebreyesus *et al.*, 2019). ترکیب کردن مجموعه داده‌ها برای آنجام آنالیز پویش ژنومی مشترک، یک روش کارآمد برای افزایش قدرت پویش ژنومی برای مطالعات در این زمینه است (Bouwman *et al.*, 2018). با در نظر گرفتن محدودیت‌های کمتر در ادغام نمونه‌های حیوانی، انتخاب روش‌های اجرای پویش ژنومی بر پایه رویکرد مگاآنالیز برای صفات تولیدمثلی می‌تواند خیلی پراهمیت باشد (Gebreyesus *et al.*, 2019).

اخیراً، پژوهشی با عنوان مطالعه پویش ژنومی بر پایه مگاآنالیز برای شناسایی جایگاه‌های ژنی مؤثر بر نرخ چندقلوزایی در شش نژاد مختلف گوسفند به تعداد ۴۶۲ رأس میش شامل نژادهای وادی، هوو، آیسلندیک، فینشیپ، رومانف و تکسل با هدف درک ساز و کار ژنتیکی این صفت با استفاده از مدل خطی مختلط انجام شده است که موفق به شناسایی ژن‌های کاندیدا شامل *OPCML*، *GULP1*، *RBP4*، *MMP2* و *LPCAT2* روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۳، ۱۴، ۱۷ و ۲۲ شدند. نتایج نشان داد که روش پویش ژنومی بر مبنای مسیر کارآیی بالاتری برای یافتن مناطق ژنومی و درک بهتری از معماری ژنتیکی صفت تعداد نتاج متولد شده نسبت به آنالیز پویش ژنومی بر پایه تک نشانگری دارد (Gholizadeh and Esmaeili-Fard, 2022). مطالعه مروری دیگری در سال ۲۰۲۱ با هدف شناسایی ژن-های کاندیدای و مسیرهای زیستی مرتبط با تعداد بره متولد شده در گوسفند بر اساس آنالیز مسیر انجام شده است، که نتایج نشان داد، از میان ۲۱ ژن کاندیدای شناسایی شده ژن‌های *FLT1* و *CCL2* و از میان ۲۰ مسیر زیستی مرتبط با تعداد نتاج، مسیر زیستی negative regulation of vascular endothelial cell proliferation بیشترین ارتباط را با تعداد نتاج متولد شده در هر زایش را داشتند (Ghiasi and Abdollahi-Arpanahi, 2021).

با توجه به اینکه تا به امروز، اثر ترکیب کردن مجموعه داده‌های نژادهای مورد مطالعه برای انجام آنالیز پویش ژنومی مشترک در شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر چندقلوزایی گزارش نشده است. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر انجام مگاآنالیز پویش ژنومی و شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر چندقلوزایی گوسفند با استفاده از ترکیب نمونه‌های سه نژاد شامل ۶۸۲ رأس دام بومی زندی (۹۶)، راهمنی مصر (۴۸) و کایاس یونان (۵۳۸) بود. همچنین عملکرد مگاآنالیز با گزارش‌های قبلی پویش ژنومی انفرادی روی این نژادها مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی سه نژاد مختلف گوسفند شامل نژادهای زندی (بومی)، راهمنی (مصری) و کایاس (یونانی) استفاده شد. ابتدا از ۲۰۰ گوسفند نژاد زندی حاضر در دو گله مرکز اصلاح نژاد خجیر واقع در تهران وابسته به سازمان جهاد کشاورزی استان تهران، مقدار ۷–۵ سی‌سی خون استحصال و همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA در لوله‌های خلأ با pH ۸–۷/۵ نگهداری شد. از میان نمونه‌های اخذ شده پس از آنالیز شجره، حیواناتی که کمترین رابطه خویشاوندی را با هم داشته باشند، به تعداد ۹۶ رأس انتخاب شدند. تعدادی از میش‌ها (۴۴ رأس) دارای حداقل یک رکورد دوقلوزایی و تعدادی از میش‌ها (۵۲ رأس) میش دارای رکورد تک قلوزایی انتخاب شدند. استخراج DNA با استفاده از روش بهینه یافته استخراج نمکی از خون کامل انجام شد (Helms, 1990). ژنوتیپ نمونه‌ها در کمپانی Neogen (http://genomics.neogen.com) در کشور آمریکا با استفاده از آرایه‌های Illumina OvineSNP50K BeadChip تعیین ژنوتیپ شدند.

علاوه‌براین، در پژوهش حاضر از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۴۸ رأس گوسفندان غیر خویشاوند مصری مربوط به نژاد راهمنی استفاده گردید (El-Halawany *et al.*, 2016). لازم به ذکر است که تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها در مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی مناطق خشک کشور مصر انجام شده بود. ژنوتیپ نمونه‌ها در کمپانی Neogen GeneSeek در کشور آمریکا با استفاده از آرایه‌های Illumina OvineSNP50K BeadChip با به‌کارگیری پروتکل استاندارد

شرکت ایلومینا انجام شده بودند. داده‌های مورد استفاده در این پژوهش در پایگاه برخط Dryad (thttps://datadryad.org) با شماره دسترسی 10.5061/dryad.k83b3 در دسترس می‌باشد. همچنین، از اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی مجموع ۵۳۸ رأس گوسفندان غیر خویشاوند یونانی مربوط به نژاد کایاس[1] نیز استفاده گردید (Tsartsianidou *et al.*, 2023). نمونه‌ها با استفاده از آرایه های شرکت ایلومینا Ovine SNP50 Bead Chip برای ۵۴۲۴۱ جایگاه نشانگری تعیین ژنوتیپ شده بودند. داده‌های مورد استفاده در این پژوهش در پایگاه برخط Mendeley (https://data.mendeley.com/datasets) با شماره دسترسی nvjn8mvwtg/1 در دسترس می‌باشد.

برای اطمینان از کیفیت داده‌های حاصل از تعیین ژنوتیپ در آنالیزهای نهایی مراحل مختلف کنترل کیفیت بر روی داده‌های اولیه اعمال شد. بدین منظور، در ابتدا نمونه‌هایی که فراوانی ژنوتیپ در آن‌ها کمتر از ۹۰ درصد بود، شناسایی و حذف شدند. در مرحله بعد، نشانگرهایی که فراوانی آلل نادر (MAF[2]) در آن‌ها کمتر از پنج درصد بود، حذف شدند. سپس، نشانگرهای SNPای که فراوانی ژنوتیپ آن‌ها در نمونه‌ها کمتر از ۹۵ درصد بود، شناسایی و حذف شدند. همچنین برای SNPهای باقی‌مانده آن‌هایی که در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشتند، با سطح احتمال 10^{-6} شناسایی و حذف شدند. مراحل مختلف غربالگری با استفاده از نرم‌افزار PLINK (نسخه۱/۹۰) انجام شد (Purcell *et al.*, 2007).

پس از کنترل کیفیت، داده‌های پیرایش شده با استفاده از نرم‌افزار PLINK ادغام شدند و دور بعدی کنترل کیفیت روی داده‌های ادغام شده با معیارهای مشابه دور قبل انجام شد. در مرحله بعد، قبل از انجام آنالیز پویش ژنومی، ایمپیوتیشن با روش LD-kNNi (Money *et al.*, 2015) انجام شد. ادغام داده‌های جمعیت‌های انفرادی در قالب یک مجموعه داده بزرگ، امکان مگاایمپیوتیشن و مگاآنالیز (Fritsche *et al.*, 2016) و شناسایی واریانت‌های بیشتر نسبت به متاایمپیوتیشن را فراهم می‌کند (Gorski *et al.*, 2019). ایمپیوتیشن با استنتاج SNPهای گم‌شده یا تعیین ژنوتیپ نشده، ابزاری مفید برای آنالیز پویش ژنومی است که می‌تواند مجموعه SNPهای مشابه برای افراد مورد مطالعه را فراهم کند و بنابراین، منجر به افزایش قدرت آزمون پویش ژنومی می‌گردد (Gorski *et al.*, 2019).

در مرحله بعد برای بررسی ساختار جمعیتی و مدل کردن آنالیز پویش ژنومی از مدل خطی مختلط در نرم‌افزار TASSEL 5 (Bradbury *et al.*, 2007) استفاده گردید. دو عامل مختل‌کننده که می‌توانند نتایج آنالیز پویش ژنومی را دچار اریبی کنند، شامل خویشاوندی و ساختار لایه‌بندی جمعیتی هستند. مدل‌های خطی عمومی امکان در نظر گرفتن لایه‌بندی جمعیتی را از طریق وارد کردن ابعاد مؤلفه‌های اصلی در مدل را فراهم می‌کنند. ولی نمی‌توانند خویشاوندی را در نظر بگیرند. مدل مختلط این امکان را فراهم می‌سازد که علاوه‌بر لایه‌بندی جمعیتی، خویشاوندی نیز در قالب ماتریس روابط خویشاوندی را در مدل وارد شود. برای بررسی ساختار جمعیت ادغام شده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی (PCA[3]) استفاده شد. این تجزیه با استفاده از نرم‌افزار PLINK انجام شد و تعداد هشت مؤلفه اول ماتریس ژنوتیپی محاسبه شد.

مدل مورد استفاده بر پایه مدل خطی مختلط به‌شکل زیر بود:

$$y = Wa + x\beta + Zu + e \qquad \text{معادله (۱)}$$

که در آن، **y**: بردار مشاهدات فنوتیپی، **W**: ماتریس ضرایب مربوط به اثر ثابت شامل نژاد، سن و پنج سطح اول تجزیه مؤلفه اصلی با بیشترین واریانس توجیه شده، x: بردار ژنوتیپ‌های نشانگر تحت آزمون، **u**: بردار اثرات تصادفی پلی‌ژنیک، **Z**: ماتریس روابط ژنومیک، **e**: بردار اثر تصادفی باقی‌مانده‌ها، **α** و **β**: برادر ضرایب ارتباط دهنده است.

برای تصحیح آزمون‌های چندگانه و رسیدن به سطح معنی‌داری ژنومی از آزمون بنفرونی بر اساس تعداد SNPهای مستقل استفاده شد. برای این منظور، با استفاده از نرم‌افزار PLINK و دستور indep-pairwise 50 5 0.05 استفاده گردید. برای در نظر گرفتن سطح معنی‌داری پنج درصد ژنومی (α) و با تعداد SNPهای مستقل (N)، آستانه معنی‌داری ژنومی برآورد شد (0.05/11812). همچنین، برای بررسی برازش مدل و نتایج از پلات‌های Q-Q و منهتن استفاده شد و برای ترسیم گراف‌های مربوطه از نرم‌افزار SNPEVG2 استفاده گردید (Wang *et al.*, 2012).

بررسی ژن‌های گزارش شده در مناطق کاندیدا و ۵۰۰ کیلو جفت‌باز اطراف آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی برخط NCBI به‌وسیله Genome Data Viewer (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv?org=ovis-aries&group=bovidae) بر اساس آخرین نسخه اسلبی گوسفند (*ARS-UI_Ramb_v2.0*) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین طبقات عملکردی ژنی و مسیرهای متابولیکی ژن‌های شناسایی شده از پایگاه اطلاعاتی PANTHER (http://www.pantherdb.org) استفاده گردید. همچنین، برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

1- Chios
2- Minor allele frequency
3- Principal component analysis

جدول ۱- توصیف مراحل کنترل کیفیت داده‌های مربوط به نژادهای مختلف مورد بررسی در سطح افراد

Table 1- Description of the quality control steps in different studied breeds at the level of individuals

	زندی Zandi	کایاس Chios	راهمنی Rahmani
تعداد حیوانات Number of animals	96	538	48
حذف حیواناتی با نرخ فراخوانی کمتر از ۹۰ درصد Excluding animals with call rate<0.90	0	3	2
حذف حیواناتی با یکسانی بر اساس موقعیت افراد بالاتر از ۹۹ درصد Excluding animals with IBS>0.99	0	3	1
حذف حیواناتی که در آنالیز PCA خارج از توده جمعیتی خود قرار داشتند Excluding animals that were clustered outside of their population mass in PCA analysis	2	0	0
تعداد حیوانات باقی‌مانده Remaining animals	94	532	45

جدول ۲- خلاصه مراحل مختلف کنترل کیفیت نشانگرهای SNP برای آنالیزهای پویش ژنومی

Table 2- Summary of quality control steps for SNP markers used for GWAS analysis

مراحل مختلف کنترل کیفی Quality control filters	تعداد نشانگر SNP SNP number
تعداد نشانگرهای SNP قبل از کنترل کیفیت SNP number before QC	37844
حذف SNPهایی با فراوانی آللی نادر کمتر از ۵ درصد Excluding SNPs ≤5% MAF over all animals	1025
حذف SNPهایی با نرخ فراخوانی کمتر از ۹۵ درصد در کلیه حیوانات Excluding SNPs ≤95% Call rate over all animals	842
حذف SNPهای خارج از تعادل هاردی-واینبرگ با ارزش (۰/۰۰۰۰۰۱) Excluding SNPs with deviation from HW (<0.000001)	95
تعداد نشانگرهای SNP باقی‌مانده Remaining SNPs	35882
تعداد نشانگرهای SNP باقی‌مانده بعد از ایمپیوتیشن Remaining SNPs after imputation	45167

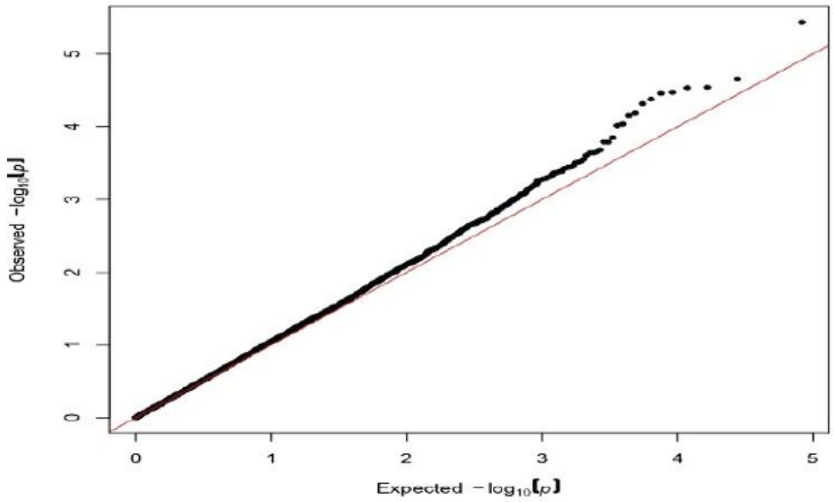
نتایج و بحث

نتایج مربوط به مراحل مختلف ویرایش داده‌های ژنوتیپ شده در جدول ۱ ارائه شده است. تعداد چهار حیوان با داشتن IBS[1] حدود ۰/۹۹ تا یک با احتمال تکراری بودن نمونه‌ها و تعیین ژنوتیپ چند باره یک حیوان و همچنین حیوانات خارج از توده نژادی خود در آنالیز PCA به‌منظور جلوگیری از ایجاد اریبی در محاسبات حذف شد (جدول ۱). پس از حذف داده‌های حیوانات حذف شده، داده‌های نژاد بومی زندی با نژادهای گوسفند مصری و یونانی با هم ترکیب شدند که دارای ۳۷۸۴۴ نشانگر SNP مشترک بودند که پس از مرحله کنترل کیفیت در سطح SNP در نهایت، تعداد ۳۵۸۸۲ نشانگر SNP باقی ماندند که شامل اطلاعات ۲۶ جفت کروموزوم گوسفند بودند، به‌طوری‌که پس از پایان ایمپیوتیشن تعداد ۶۷۱ دام و ۴۵۱۶۷ نشانگر SNP با متوسط MAF برابر با ۰/۳۰۴ در آنالیز پویش ژنومی مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

نتیجه تجزیه مؤلفه‌های اصلی نشان داد که سطح یک مؤلفه‌های اصلی در برابر سطح دو جمعیت‌ها را از هم تفکیک کرد. همچنین، پنج سطح اول که بالاترین میزان واریانس ژنتیکی را توجیه می‌کردند، برای کنترل ساختار جمعیتی در مدل آماری گنجانده شدند. پلات Q-Q و منهتن مرتبط با صفت تعداد نتاج متولد شده در هر زایش در شکل ۱ و ۲ ارائه شده است. چندین روش برای تخمین کنترل تورم ژنومیکی (λ) وجود دارد که در این تحقیق روش تخمین‌گر میانه اجرا شد. فاکتور تورم کنترل جمعیتی بزرگ‌تر از یک ($\lambda>1$)، وجود لایه-بندی جمعیتی و یا خطای تعیین ژنوتیپ را نشان می‌دهد. فاکتور لامبدا از طریق تجزیه و تحلیل پیوستگی در PLINK برای صفات مورد مطالعه محاسبه شد که برای صفت مورد مطالعه، ۱/۰۲۴ بود که همان‌طور که مشاهده می‌شود، تقریباً برابر با یک بودند و نشان‌دهنده

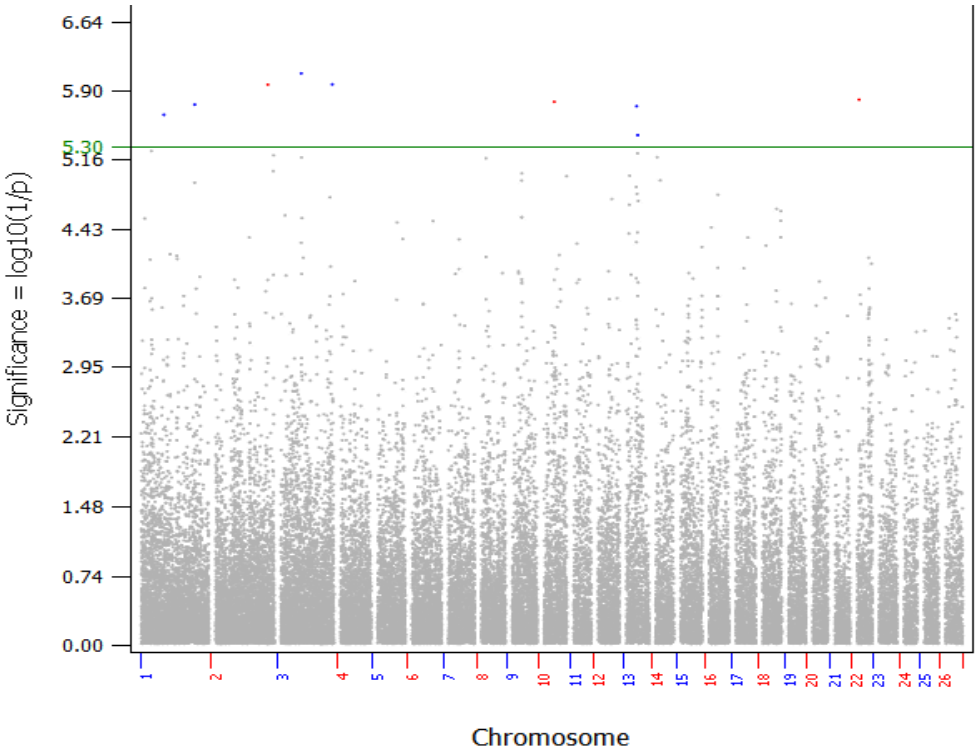
1- Identical by state

عدم وجود لایه‌بندی جمعیتی برای اجرای تجزیه و تحلیل‌های پویش کل ژنومی بود. در مطالعاتی که لامبدا کوچک‌تر از ۱/۱ یا مساوی یک است، نیازی به تصحیح اثرات ساختار جمعیتی نیست.



شکل ۱– پلات Q-Q نتایج مگاآنالیز پویش ژنومی برای کنترل کیفیت نتایج

Figure 1- Q-Q plot of mega GWAS results for assessing quality of results



شکل ۲- پلات منهتن نتایج مگاآنالیز پویش ژنومی با استفاده از مدل خطی مختلط برای شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با چندقلوزایی در گوسفند در سطح معنی‌داری ژنومی

Figure 2- Manhattan plot of mega GWAS results obtained from linear mixed model to identify genomic regions associated with prolificacy in sheep with genome-wide significance level

نتایج مگاآنالیز پویش ژنومی، نه عدد نشانگر SNP در سطح ژنومی شناسایی کرد که به‌طور معنی‌داری در سطح ژنوم با میانگین چندقلوزایی در ارتباط بودند (شکل ۲). نشانگرهای معنی‌دار به‌ترتیب روی کروموزوم‌های شماره ۱، ۳ و ۱۳ هرکدام دو نشانگر و

کروموزوم‌های ۲، ۱۰ و ۲۲ هرکدام یک نشانگر قرار داشتند. بررسی‌های بیشتر در پایگاه‌های داده نشان داد که برخی از ژن‌های موجود در نواحی ژنومی شناسایی شده نقش مؤثری در عملکرد تولیدمثلی دارند که در این بخش توضیحاتی در ارتباط با نقش‌های فیزیولوژیکی این ژن‌ها ارائه خواهد شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دو نشانگر در نواحی ژنومی ۱۸۹/۸ و ۲۴۶/۹ مگابازی روی کروموزوم شماره ۱ به‌طور معنی‌داری با چندقلوزایی ارتباط دارند. تجزیه بیشتر در پایگاه‌های داده نشان داد که این نشانگرها با ژن‌های *CLSTN2* و *DLG1* در ارتباط هستند. ژن *CLSTN2* در فرآیند تخمک‌اندازی و تبدیل سلول‌های تکا و گرانولوزا به سلول‌های لوتئال بزرگ و کوچک در جسم زرد می‌باشد (Hong *et al.*, 2006). در مطالعه پویش ژنومی در گوسفندان نژاد Pelibuey با هدف شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با دوقلوزایی ژن *CLSTN2* گزارش شده است (Hernández-(Montiel *et al.*, 2020. همچنین ژن *DLG1* نقش مؤثری در فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی Hippo دارد که نقش اساسی در فرآیند آزادسازی تخمک از طریق افزایش سطح ۱۷ بتا استرادیول (E2) دارد (Ye *et al.*, 2017).

ژن *GULP1* روی کروموزوم شماره ۲ در ناحیه ژنومی ۱۱۹/۷ مگابازی قرار دارد. نشان داده شده است که این ژن با طول دوره لوتئال در گاو در ارتباط است (Tenghe *et al.*, 2016). همچنین این ژن تنظیم‌کننده کلیدی سیگنال‌دهی فاکتور رشد تغییردهنده بتا می‌باشد. ژن *GULP1* شناسایی شده در پژوهش حاضر در مطالعه قبلی آنالیز پویش ژنومی انفرادی مرتبط با نژاد کایاس گزارش شده است که در سطح ژنومی با چندقلوزایی در این نژاد مرتبط بود (Tsartsianidou *et al.*, 2023).

ژن *INHBE* روی کروموزوم شماره ۳ در ناحیه ژنومی ۱۶۱/۹ مگابازی قرار دارد. نقش‌های تنظیمی مهمی در لانه‌گزینی و تشکیل جفت برای باروری موفق ایفا می‌کند. نتایج مطالعات نشان داده است که چندشکلی در این ژن با صفات باروری در گاوهای پرورش یافته در مناطق گرمسیری در ارتباط است (Fortes *et al.*, 2023). این ژن که در فولیکول بالغ بیان می‌شود، دیواره فولیکولی پستانداران را طی اوولاسیون تخریب می‌کند و بنابراین، فعالیت این ژن به لحاظ ژنتیکی برای اوولاسیون مورد نیاز است (Lehnert and Reverter, 2013).

ژن *RBP4* روی کروموزوم شماره ۲۲ در ناحیه ژنومی ۱۴/۷ مگابازی به‌عنوان ژن کاندیدا گزارش شده است. این ژن طی فاز توسعه سریع بلاستوسیت بیان می‌شود که دوره حیاتی برای زنده‌مانی جنین است. این ژن، پروتئینی را کد می‌کند که در رحم و در اوایل آبستنی حضور دارد. این پروتئین‌ها به رتینول متصل می‌شوند، سپس رتینول متصل شده به‌وسیله سلول‌ها پذیرفته شده و جنین‌زایی آغاز می‌شود (Messer *et al.*, 1996).

جدول ۳- نتایج مگاآنالیز پویش ژنومی با مدل خطی مختلط برای شناسایی نواحی ژنومی و ژن‌های موجود در این مناطق ژنومی مرتبط با چندقلوزایی در گوسفند

Table 3– Mega GWAS results obtained from linear mixed model to identify genomic regions and genes associated with prolificacy in sheep

شماره کروموزوم Number of chromosomes	نشانگر ID SNP ID	آلل ۱ A1	آلل۲ A2	حداقل فراوانی آلل نادر MAF	موقعیت ژنومی (جفت باز) Genomic position (bp)	ژن کاندیدای مرتبط با تولیدمثل Candidate gene related to reproductive
1	OAR1_204970872.1	T	C	0.361	189355910-190355910	*DLG1*
1	s09883.1	G	A	0.212	246413454-247413454	*CLSTN2*
2	OAR2_119795639.1	A	G	0.373	119289298-120289298	*GULP1*
3	OAR3_173173378.1	C	T	0.395	161428466-162428466	*INHBE*
10	OAR10_90315139.1	C	A	0.421	82164637-83164637	*TNFSF13B*
13	s16241.1	C	T	0.369	53751020-54751020	*TCFL5*
22	OAR22_18241256.1	G	A	0.283	14242914-15242914	*RBP4*

ترکیب کردن مجموعه‌های داده‌های چند جمعیت چالش‌های مخصوص به خود را دارد. یک از موانع اصلی عدم تجانس نمونه‌های جمعیت‌های مختلف است. این عدم تجانس‌ها ممکن است به علت‌های مختلف از جمله فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، تفاوت اندازه‌گیری صفات، محیط‌های پرورشی مختلف و آرایه‌های تعیین ژنوتیپ متفاوت باشد (Begum *et al.*, 2012). نتایج به‌دست آمده از مطالعات مختلف

آنالیز پویش ژنومی با استفاده از ادغام چندین مجموعه داده، نواحی ژنومی بیشتر و دقیق‌تری را در مقایسه با تجزیه انفرادی جمعیتی و همچنین فراتحلیل آن جمعیت‌ها گزارش کرده‌اند (Gebreyesus *et al.*, 2019).

تاکنون تعداد معدودی آنالیز پویش ژنومی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با صفت چندقلوزایی در نژادهای مختلف بومی در ایران انجام شده است که منجر به شناسایی و معرفی ژن‌های کاندیدای مختلفی شده است. در گوسفند نژاد بلوچی نشان داده شده است که واریانت‌های متفاوت ژن‌های *NTRK2*، *CTH*، *ANKRD13C*، *SRSF11*، *PTGER3*، *LDHB*، *LRRC40* و *KCNMA1* در تنوع موجود در صفت دوقلوزایی در این نژاد نقش دارند (Esmaeili-Fard *et al.*, 2021). همچنین، در مطالعه پویش ژنومی انجام شده روی گوسفندان نژاد لری- بختیاری، ژن *LHCGR* به‌عنوان ژن کاندیدای مؤثر بر دو قلوزایی معرفی شده است (Abdoli *et al.*, 2018). تفاوت در نتایج مطالعات مختلف پویش ژنومی می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های بین نژادی، روش‌های مورد استفاده در تجزیه داده‌ها و اندازه نمونه تعیین ژنوتیپ شده و دارای فنوتیپ باشد. این موضوع نشان می‌دهد که ساز و کارهای زیستی متفاوتی در تنوع موجود در صفت دوقلوزایی در بین نژادهای مختلف وجود دارد و می‌توان با آنالیز پویش ژنومی، ژن‌های کاندیدای مؤثر بر این صفت مهم اقتصادی را شناسایی کرد و از مگاآنالیز در ترکیب نتایج بهره گرفت.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، نتایج حاصل از مگاآنالیز منجر به شناسایی نه نشانگر SNP در سطح ژنوم گردید که به‌طور معنی‌داری با چندقلوزایی در گوسفند در ارتباط بودند. بررسی عملکرد ژن‌های موجود در این مناطق ژنومی نشان داد که ژن‌های *DLG1*، *CLSTN2*، *INHBE*، *TCFL5* و *RBP4* نقش مؤثری در باروری و موفقیت آبستنی دارند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرند.

References

1. Abdoli, R., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., Zamani, P., & Gondro C. (2018). Genome-wide association study to identify genomic regions affecting prolificacy in Lori-Bakhtiari sheep. *Animal Genetics*, *49*(5), 488-491. https://doi.org/10.1111/age.12700.
2. Abdoli, R., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., Zamani, P., Moradi, M. H., Ferdosi, M. H., Gondro, C., (2019). Genome-wide association study of first lambing age and lambing interval in sheep. *Small Ruminant Research*, *178*, 43–45. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.07.014
3. Begum, F., Ghosh, D., Tseng, G. C., & Feingold, E. (2012). Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis. *Nucleic Acids Research*, *40*, 3777–3784. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1255.
4. Bohlouli, M., Mohammadi, H., & Alijani, S. (2013). Genetic evaluation and genetic trend of growth traits of Zandi sheep in semi-arid Iran using random regression models. *Small Ruminant Research*, *114*, 195–201. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.005
5. Bouwman, A. C., Daetwyler, H. D., Chamberlain, A. J., Ponce, C. Sargolzaei, M., Schenkel, F. S., Sahana, G., Govignon-Gion, A., Boitard, S., Dolezal, M., Pausch, H., Brøndum, R. F., Bowman, P. J., Thomsen, B., Guldbrandtsen, B., Lund, M. S., & Hayes, B. J. (2018). Meta-analysis of genome-wide association studies for cattle stature identifies common genes that regulate body size in mammals. *Nature Genetics*, *50*, 362–367. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0056-5.
6. Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, *23*(19), 2633-2635. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308.
7. El-Halawany, N., Zhou, X., Al-Tohamy, A. F., El-Sayd, Y. A., Shawky, A. E., Michal, J. J., & Jiang, Z. (2016). Genome-wide screening of candidate genes for improving fertility in Egyptian native Rahmani sheep. *Animal Genetics*, (4), 513. https://doi.org/10.1111/age.12437.
8. Esmaeili-Fard, S. M., Gholizadeh, M., Hafezian, S. H., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021). Genes and pathways affecting sheep productivity traits: Genetic parameters, genome-wide association mapping, and pathway enrichment analysis. *Frontiers in Genetics*, *1*, 1351. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.710613.
9. Fortes, M. R. S., Reverter, A., Kelly, M., McCulloch, R., & Lehnert, S. A. (2013). Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. *Andrology*, *1*, 644–650. https://doi.org/ 10.1111/j.2047-2927.2013.00101.x.
10. Fritsche, L. G., Igl, W., Bailey, J. N., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J. L., & Heid, I. M. (2016). A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature Genetics*, 48(2), 134-143. https://doi.org/10.1038/ng.3448.
11. Gebreyesus, G., Buitenhuis, A. J., Poulsen, N. A., Visker, M. H. P. W., Zhang, Q., van Valenberg, H. J. F., & Bovenhuis H. (2019). Combining multi-population datasets for joint genome-wide association and meta-analyses:

The case of bovine milk fat composition traits. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11124-11141. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16676.

12. Gholizadeh, M., & Esmaeili-Fard, S. M. (2022). Multi-population joint genome-wide association study to detect genomic regions associated with litter size in sheep. *Animal Production Research*, *11*(3), 15-26. (In Persian) https://doi.org/10.22124/AR.2022.21763.1688
13. Gorski, M., Günther, F., Winkler, T. W., Weber, B., & Heid, I. M. (2019). On the differences between mega- and meta-imputation and analysis exemplified on the genetics of age-related macular degeneration. *Genetic Epidemiology*, *43*(5), 559-576. https://doi.org/10.1002/gepi.22204.
14. Ghiasi, H., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2021). The candidate genes and pathways affecting litter size in sheep. *Small Ruminant Research*, 205, 106546. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106546
15. Hernández-Montiel, W., Martínez-Núñez, M. A., Ramón-Ugalde, J. P., Román-Ponce, S. I., Calderón-Chagoya, R., & Zamora-Bustillos, R. (2020). Genome-wide association study reveals candidate genes for litter size traits in Pelibuey sheep. *Animals (Basel)*, *10*(3), 434. https://doi.org/10.3390/ani10030434.
16. Helms, C. (1990). Salting out procedure for human DNA extraction. retrieved april 20, 2010, from http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/dna/dna2.html
17. Hong, E. J., Park, S. H., Choi, K. C., Leung, P. C. K., & Jeung, E. B. (2006). Identification of estrogen-regulated genes by microarray analysis of the uterus of immature rats exposed to endocrine disrupting chemicals. *Reproduction Biological Endocrinology*, *4*, 1–12. https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-49.
18. Johnston, S. E., McEwan, J. C., Pickering, N. K., Kijas, J. W., Beraldi, D., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., & Slate, J. (2011). Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Molecular Ecology*, 20, 2555–2566. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05076.x.
19. Lehnert, S., & Reverter, T. (2013). Genome-wide association study of tropical composite bulls for reproduction traits. CSIRO Animal, Food and Health Sciences, Published by Meat & Livestock Australia Limited.
20. Marjanovic, J., & Calus, M. P. L. (2020). Factors affecting accuracy of estimated effective number of chromosome segments for numerically small breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *138*, 151-160. https://doi.org/10.1111/jbg.12512.
21. Messer, L. A., Wang, L., Yelich, J., Pomp, D., Geisert, R. D., & Rothschild, M. F. (1996). Linkage mapping of the retinol binding protein 4 (RBP4) gene to porcine chromosome 14. *Mammalian Genome*, *7*, 396-410. https://doi.org/10.1007/s003359900117.
22. Money, D., Gardner, K., Migicovsky, Z., Schwaninger, H., Zhong, G. Y., & Myles, S. (2015). LinkImpute: fast and accurate genotype imputation for nonmodel organisms. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *5*(11), 2383-2390. https://doi.org/10.1534/g3.115.021667.
23. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., & Sham P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, *81*(3), 559-575. https://doi.org/10.1086/519795.
24. Ramos, Z., Garrick, D. J., Blair, H. T., Vera, B., Ciappesoni, G., & Kenyon, P. R. (2023). Genomic Regions associated with wool, growth and reproduction traits in Uruguayan Merino sheep. *Genes*, 14, 167. https://doi.org/10.3390/genes14010167.
25. Tsartsianidou, V., Pavlidis, A., Tosiou, E., Arsenos, G., Banos, G., & Triantafyllidis A. (2023). Novel genomic markers and genes related to reproduction in prolific Chios dairy sheep: A genome-wide association study. *Animal*, (3), 100723. https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100723.
26. Tenghe, A. M. M., Bouwman, A. C., Berglund, B., Strandberg, E., de Koning, D. J., & Veerkamp, R. F. (2016). Genome wide association study for endocrine fertility traits using single nucleotide polymorphism arrays and sequence variants in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *99*(7), 5470-5485. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10533.
27. Wang, S., Dvorkin, D., & Da, Y. (2012). SNPEVG: A graphical tool for GWAS graphing with mouse clicks. *BMC Bioinformatics*, *13*, 319. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-319.
28. Xu, S. S., Gao, L., Xie, X. L., Ren, Y. L., Shen, Z. Q., Wang, F., & Li, M. H. (2018). Genome-wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds. *Frontiers in Genetics*, *9*, 118. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00118.
29. Ye, H., Li, X., Zheng, T., Hu, C., Pan, Z., Huang, J., Li, J., Li, W., & Zheng, Y. (2017). The hippo signaling pathway regulates ovarian function via the proliferation of ovarian germline stem cells. *Cell Physiological Biochemistry*, *41*, 1051–1062. https://doi.org/10.1159/000464113
30. Zhang, Z., Sui, Z., Zhang, J., Li, Q., Zhang, Y., Wang, C., Li, X., & Xing, F. (2022). Identification of signatures of selection for litter size and pubertal initiation in two sheep populations. *Animals*, *12*, 2520. https://doi.org/10.3390/ani12192520.

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 259-276

Evaluation of Quality Characteristics of Silk Thread in Iranian Silkworm Hybrids

Seyed Hossein Hosseini Moghaddam[1,2*], Ramin Abdoli[3], Kamran Mahfouzi[4,5]

1- Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Department of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Assistant professor, Iran Silk Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
4- Lecturer, Department of Textile Engineering, Faculty of Engineering, University of Guilan, Rasht, Iran.
5- Department of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir

Received: 25-07-2023
Revised: 06-09-2023
Accepted: 17-09-2023
Available Online: 17-09-2023

How to cite this article:
Hosseini Moghaddam, S. H., Abdoli, R., & Mahfoozi, K. (2024). Evaluation of quality characteristics of silk thread in Iranian silkworm hybrids. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 259-276. (in Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83618.1165

Introduction: Numerous studies have been conducted to compare the productivity of different silkworm hybrids in Iran, primarily based on the evaluation of cocoon traits such as cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell percentage, and pupation rate. In the present study, aiming to obtain information on the quality characteristics of silk thread in Iranian silkworm hybrids, 80 Iranian silkworm hybrids were examined for their silk thread characteristics.

Materials and Methods: 72 of the new silkworm hybrids in addition to 8 current commercial hybrids were evaluated for the six silk thread characteristics including yarn size (YS), yarn length (YL), yarn tensile strength (YTS), elongation percentage (EP), yarn weight (YW) and raw silk percentage (RSP) based on dry weight. 200 good cocoons from each hybrid were sampled at the Iran Silk Research Center and sent to the Fiber Physics Laboratory of the University of Guilan. After re-evaluating the individual cocoons based on form and size of them, 3 repetitions of 21 cocoons (based on the capacity of the spinning machine) were spun and dried. According to reciprocal crosses in this research, the data were analyzed using a completely randomized design (CRD) with two sources of variation (40 hybrids and two types of crosses) by the GLM procedure of SAS software version 4.9.

Results and Discussion: Mean comparison of the studied traits based on the combined reciprocal data (40 hybrids) showed that the highest average of the FS trait (73.3 deniers) was for the hybrid IRA3×IRA10 and the lowest average (58.2 deniers) for the commercial hybrid 153 ×154. The highest YL trait (771.4 m) was for hybrid IRA5×IRA8 and the lowest (441.18 m) for the commercial hybrid IRA2×IRA3. The highest average of the YTS (3.47 g/denier) was for commercial hybrid 104×103 and the lowest average (2.9 g/denier) was for hybrid IRA2×IRA3. The highest average for the EP trait (17.6%) was reported for the commercial hybrid 154×151 and the lowest average (12.83) was related to the hybrid IRA2×IRA3. The highest average for YW (5.59 grams) belonged to the IRA5×IRA8 hybrid and the lowest average (3.34 grams) belonged to the IRA2×IRA3 hybrid. Also, for the RSP trait (the most critical trait of silk characteristics), The IRA5×IRA8 hybrid had the highest average (41.4%) and the IRA2×IRA3 hybrid had the lowest average (25.86%). IRA5×IRA8 hybrid had superior performance than all commercial hybrids. The RSP of the IRA8×IRA9 hybrid was 39.47%, which was superior to the three commercial hybrids. The hybrids that were excellent in at least three of the six characteristics were: all commercial hybrids and three new hybrids including IRA5×IRA8, IRA11×IRA12 and IRA8×IRA9. Analysis of the variance of the traits showed that the reciprocal-cross effect

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83618.1165

was not significant for the YS and YTS traits (P>0.05). Despite the close competition of new hybrids with current commercial hybrids, many characteristics of commercial hybrids were significantly higher than new hybrids. However, the new hybrids including IRA2×IRA9, IRA2×IRA11, IRA3×IRA4, and IRA4×IRA11, which have shown superiority in terms of cocoon traits, also performed favorably in terms of all yarn characteristics. However, two hybrids were among the superior hybrids in terms of cocoon production and cocoon traits, but the results of the present research showed that they are not superior in terms of yarn characteristics and raw silk yield and productivity, including IRA2×IRA3 and IRA4×IRA7. The IRA2×IRA3 hybrid has an unfavorable performance in terms of weight, strength, and raw silk percentage and cannot provide the interests of silk spinners.

Conclusion: In the final selection of new hybrids based on the performance of both cocoons and silk thread, it is necessary to pay attention to the strength and weakness of the silk yarn obtained from the cocoons of each hybrid. But it will not be the case that hybrids with better cocoon performance are necessarily among the best in terms of all silk yarn traits or even some of them. For example, hybrids IRA2×IRA9, IRA2×IRA11, IRA3×IRA4, and IRA4×IRA11 had better cocoon performance, but they had a middle performance for yarn characteristics. In other words, if they are not among the weaker group, they can be considered. Generally, it is necessary to decide about new hybrids after rearing them in rural conditions and evaluating the produced cocoons and yarns.

K**eywords**: Raw silk percentage, Yarn length, Superior silkworm hybrid, Tensile strength test,Yarn size

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۷۶-۲۵۹

ارزیابی ویژگی‌های کیفی نخ ابریشم در آمیخته‌های کرم ابریشم ایرانی

سید حسین حسینی مقدم[۱ و ۲]*، رامین عبدلی[۳]، کامران محفوظی[۴ و ۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

چکیده

در پژوهش حاضر، با هدف دستیابی به اطلاعات کیفیت نخ آمیخته‌های کرم ابریشم ایرانی، ۷۲ هیبرید جدید به‌علاوه هشت هیبرید تجاری فعلی برای شش ویژگی نخ ابریشم شامل قطر (YS)، طول (YL)، استحکام کششی (YTS)، درصد ازدیاد طول (EP)، وزن (YW) و درصد ابریشم خام (RSP) ارزیابی شدند. ۲۰۰ عدد پیله از بین پیله‌های خوب هر هیبرید نمونه‌برداری و به آزمایشگاه ارسال شد. سه تکرار ۲۱ پیله‌ای با استفاده از پیله‌های هم‌شکل و هم‌اندازه نخ‌ریسی شدند. نتایج بر مبنای تلفیق داده‌های تلاقی دوطرفه (۴۰ آمیخته) نشان داد که بیشترین و کمترین طول و قطر نخ به‌ترتیب مربوط به آمیخته‌های IRA3×IRA10 و 154×153 بود. بیشترین میانگین استحکام کششی نخ (۳/۴۷ گرم بر دنیر) برای آمیخته تجاری 104×103 و کمترین (۲/۹۷۵ گرم بر دنیر) برای IRA2×IRA3 بود. بیشترین درصد ازدیاد طول نخ (۱۷/۶ درصد) برای آمیخته تجاری 154×151 و کمترین (۱۳/۴۶۸) مربوط به IRA2×IRA3 بود. بیشترین وزن نخ (۵/۵۹ گرم) مربوط به آمیخته IRA5×IRA8 و کمترین میانگین (۳/۴۶ گرم) به IRA2×IRA3 تعلق داشت. همچنین درصد ابریشم خام آمیخته IRA5×IRA8 بیشترین (۴۱/۴ درصد) و برای IRA2×IRA3 کمترین (۲۵/۸۶ درصد) بود. تجزیه واریانس صفات نشان داد که اثر تلاقی دوطرفه (reciprocal) برای صفات قطر و استحکام کششی معنی‌دار نبود (P>0.05). علی‌رغم رقابت نزدیک آمیخته‌های جدید با آمیخته‌های تجاری، بسیاری از ویژگی‌های نخ در آمیخته‌های تجاری تفاوت معنی‌داری نسبت به آمیخته‌های جدید داشتند. با این وجود، برخی آمیخته‌ها نظیر IRA2×IRA9، IRA2×IRA11، IRA3×IRA4 و IRA4×IRA11 از نظر تمام ویژگی‌های نخ، عملکرد قابل قبولی داشتند.

واژه‌های کلیدی: درصد ابریشم خام، طول نخ، آمیخته برتر کرم ابریشم، آزمون استحکام کششی، قطر نخ

مقدمه

مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده ابریشم در دنیا به‌ترتیب عبارتند از چین، هند، ازبکستان، ویتنام، تایلند، برزیل، کره شمالی و ایران می‌باشند. بیش از ۹۰ درصد از الیاف ابریشم طبیعی دنیا در آسیا تولید شده و برخی کشورها نظیر هند، ازبکستان، ویتنام و ایران طی پنج سال اخیر، تولیدات خود را به‌مقدار قابل توجهی افزایش داده‌اند (International Sericultural Commission, 2023). ابریشم به‌دلیل استحکام کششی بالا، درخشندگی و براق بودن به‌عنوان یک نخ برتر در صنعت نساجی محسوب می‌شود. علی‌رغم رقابت شدید الیاف مصنوعی، ابریشم به‌دلیل رنگ‌پذیری عالی همچنان برتری خود را در تولید پوشاک فاخر و با کیفیت حفظ نموده است (Giacomin *et al.*, 2017).

امروزه در کشورهای صاحب تکنولوژی تولید تخم نوغان نظیر ایران، با اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی و تلاقی لاین‌ها آمیخته‌های تجاری مختلفی ایجاد شده‌اند که با هدف افزایش تولید پیله و نخ ابریشم می‌باشد. در تولید هیبریدهای تجاری کرم ابریشم که با هدف تولید نخ ابریشمی برنامه‌ریزی می‌شود، انتفاع پرورش‌دهندگان کرم ابریشم یا نوغانداران به‌تنهایی کافی نبوده و لازم است، منافع صاحبان دستگاه‌های نخ‌ریسی و کارخانجات ابریشم‌کشی نیز مد نظر قرار گیرند (Khordadi *et al.*, 2023). برای کشاورزان میزان تولید پیله، زنده‌مانی لارو و شفیره و حتی طول دوره لاروی کوتاه مهم است. لیکن، صاحبان کارگاه‌ها وکارخانه‌های ابریشم، پیله‌هایی با قابلیت نخ‌کشی بالا، درصد ابریشم خام بالا و عیوب آراستگی کمتر را می

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- گروه پژوهشی ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳- استادیار، مرکز تحقیقات ابریشم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، ایران.
۴- مربی، گروه مهندسی نساجی، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۵- گروه پژوهشی ابریشم، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: hosseini@guilan.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83618.1165

طلبند. همبستگی مثبت وزن قشر پیله و طول تار ابریشمی، درصد قشر پیله و طول تار، وزن قشر پیله و تمیزی (neatness) و درصد نخ‌دهی با قطر نخ و همبستگی منفی قطر نخ و طول نخ از جمله مواردی است که محققین گزارش نمودند (Singh *et al*., 2011 ; Talebi and Subramanya, 2010). چنین روابطی اهمیت اندازه گیری ویژگی‌های نخ ابریشم را دو چندان می‌کند.

خواص مکانیکی الیاف یا به عبارت دیگر، مقاومت در مقابل نیروهای وارده، از مهم‌ترین خواص الیاف و نخ است. منظور از استحکام، داشتن مقاومت تار، نخ و پارچه در هنگامی است که آن‌ها در جهت محور طولی آن قدر کشیده شوند تا پاره شوند. قطر نخ نیز که جهت تعیین کیفیت نخ مورد نیاز است، به‌دلیل ارتباط با خواصی مثل استحکام، میزان تاب نخ و ظرافت محصول تولیدی اندازه‌گیری می‌شود (Hosseini Moghaddam, 2013). درجه‌بندی نخ ابریشم بر اساس قطر شامل نخ ظریف ۱۸ دنیر و ظریف‌تر، نخ متوسط ۱۹ تا ۳۳ دنیر، نخ ضخیم ۳۴ دنیر و ضخیم‌تر می‌باشد (Shams-Natery, 2005).

تاکنون، پژوهش‌های زیادی در زمینه مقایسه توان تولیدی آمیخته‌های مختلف کرم ابریشم انجام شده است که مبتنی بر اندازه‌گیری صفات پیله نظیر وزن پیله، وزن قشر پیله، درصد قشر پیله، درصد شفیرگی، تولید پیله به‌ازاء یک جعبه و غیره) بوده است (Nematollahina *et al*., 2016; Mirhoseini *et al*., 2008 ; Biabani *et al*., 2021; Khordadi *et al*., 2021; Mirhoseini *et al*., 2022). به‌علاوه در طی چند سال گذشته، همراه با واردات برخی از آمیخته‌های تجاری کرم ابریشم چینی و توزیع این آمیخته‌ها در کشور، به‌دلیل قشر ضعیف‌تر پیله، نارضایتی از عملکرد نخ‌ریسی توسط کارگاه‌ها و کارخانجات نخ‌ریسی را به‌همراه داشته است.

با توجه به اهمیت رقابت هیبریدهای داخلی با وارداتی، هدف از مطاله حاضر، ارزیابی ویژگی‌های نخ هیبریدهای جدید ایرانی و مقایسه آن‌ها با آمیخته‌های تجاری بر اساس ویژگی‌های مربوط به نخ‌ریسی و کیفیت الیاف بود، تا علاوه‌بر عملکرد پیله حاصل از یک جعبه تخم نوغان که متضمن منافع تولیدکنندگان پیله است، منافع تولیدکنندگان نخ و حتی بافندگان نیز مد نظر قرار گیرد. چون آمیخته‌های کرم ابریشم حاصل تلاقی‌های متقابل[1] والدین چینی و ژاپنی می‌باشند، در آمیخته‌گری کرم ابریشم دو آمیخته تولید می‌شود، شامل تلاقی مستقیم (والد ماده ژاپنی × والد نر چینی) و تلاقی معکوس آن (والد ماده چینی × والد نر ژاپنی). این دو نوع هیبرید به‌طور همزمان تولید شده و بین نوغانداران نیز توزیع می‌شود و در عمل، دریافت‌کننده تخم نوغان حق انتخاب بین این دو آمیخته را ندارد. در این بررسی، ضمن مقایسه آمیخته‌های تجاری و هیبریدهای جدید ایرانی از نظر ویژگی‌های نخ ابریشم، اثر تلاقی‌های متقابل نیز به شیوه‌های آماری آزمون خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۳۶ آمیخته جدید کرم ابریشم با چهار آمیخته تجاری ایرانی برای ویژگی‌های نخ ابریشم حاصل از آن‌ها ارزیابی و مقایسه شدند. ۴۰ آمیخته حاصل از تلاقی والد مادری ژاپنی شکل با والد پدری چینی شکل و ۴۰ آمیخته حاصل از تلاقی معکوس آن یعنی والد مادری چینی شکل و والد پدری ژاپنی شکل و در مجموع، ۸۰ آمیخته در سه تکرار نخ‌ریسی و ارزیابی شدند. در جدول ۱، اسامی آمیخته‌های مورد بررسی ارائه شده است. چهار آمیخته تجاری شامل آمیخته‌های والد مادری ژاپنی شکل (۳۲×۳۱، ۱۰۴×۱۰۳، ۱۵۴×۱۵۳ و ۱۵۴×۱۵۱) و آمیخته‌های والد مادری چینی شکل (۳۱×۳۲، ۱۰۳×۱۰۴، ۱۵۳×۱۵۴ و ۱۵۱×۱۵۴) بودند.

تعداد ۲۰۰ عدد پیله از بین پیله‌های درجه خوب هر آمیخته از مرکز تحقیقات ابریشم کشور برای گروه پژوهشی ابریشم دانشگاه گیلان ارسال و بقیه مراحل در آزمایشگاه کرم ابریشم و آزمایشگاه فیزیک الیاف گروه نساجی دانشگاه گیلان انجام شد. در مرحله اول، ارزیابی ظاهری و تفکیک پیله‌های هر نمونه انجام شد. پیله‌هایی که از نظر شکل ظاهری و اندازه شبیه به هم بوده و ویژگی‌های پیله نامرغوب را نداشتند، مشخص شدند و از بین آن‌ها سه تکرار ۲۱ پیله ای (بر اساس ظرفیت دستگاه نخ‌ریسی) به‌طور تصادفی انتخاب شد. در مرحله دوم، نخ ریسی پیله‌های هر تکرار به‌صورت جداگانه با استفاده از دستگاه نخ‌ریسی آزمایشگاهی (Khordadi *et al*., 2023) انجام شد. در مرحله سوم، صفات مورد بررسی شامل قطر نخ (YS)، طول نخ (YL)، استحکام کششی نخ (YTS)، درصد ازدیاد طول نخ (EP)، وزن نخ (YW) و درصد ابریشم خام یا درصد نخ‌دهی (RSP) اندازه‌گیری شد.

درصد نخ‌دهی یا درصد ابریشم خام از تقسیم وزن نخ خشک به وزن پیله خشک ضرب در ۱۰۰ محاسبه می‌شود. به این منظور، پیله های هر تکرار (۲۱ عدد) در توری‌های مخصوص به‌مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد داخل آون آزمایشگاهی خشک شدند. وزن نخ خشک در همان دمای مذکور به‌مدت ۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. پس از خشک کردن، توزین با ترازوی دیجیتال انجام شد. برای اندازه‌گیری طول و قطر نخ (Lee, 2011)، از هرکدام از دوک‌های نخ، مقدار ۵۰ متر نخ با دستگاه کلاف‌پیچ (Shirly(TC48)- England) جدا و توزین شد. قطر یا نمره نخ بر مبنای واحد دنیر سنجیده می‌شود که وزن نه هزار متر تار بر حسب گرم است. بنابراین، جهت اندازه‌گیری نمره نخ، لازم است طول و وزن تار ابریشمی را اندازه‌گیری نمود.

1- Reciprocal

جدول ۱- اسامی آمیخته‌های کرم ابریشم ایرانی در بررسی حاضر

Table 1- Names of Iranian silkworm hybrids in the present study

	آمیخته با والد مادری چینی Hybrid with Chinese maternal parent	آمیخته با والد مادری ژاپنی Hybrid with Japanese maternal parent
1	IRA2×IRA1	IRA1×IRA2
2	IRA4×IRA1	IRA1×IRA4
3	IRA6×IRA1	IRA1×IRA6
4	IRA8×IRA1	IRA1×IRA8
5	IRA10×IRA1	IRA1×IRA10
6	IRA12×IRA1	IRA1×IRA12
7	IRA2×IRA3	IRA3×IRA2
8	IRA4×IRA3	IRA3×IRA4
9	IRA6×IRA3	IRA3×IRA6
10	IRA8×IRA3	IRA3×IRA8
11	IRA10×IRA3	IRA3×IRA10
12	IRA12×IRA3	IRA3×IRA12
13	IRA2×IRA5	IRA5×IRA2
14	IRA4×IRA5	IRA5×IRA4
15	IRA6×IRA5	IRA5×IRA6
16	IRA8×IRA5	IRA5×IRA8
17	IRA10×IRA5	IRA5×IRA10
18	IRA12×IRA5	IRA5×IRA12
19	IRA2×IRA7	IRA7×IRA2
20	IRA4×IRA7	IRA7×IRA4
21	IRA6×IRA7	IRA7×IRA6
22	IRA8×IRA7	IRA7×IRA8
23	IRA10×IRA7	IRA7×IRA10
24	IRA12×IRA7	IRA7×IRA12
25	IRA2×IRA9	IRA9×IRA2
26	IRA4×IRA9	IRA9×IRA4
27	IRA6×IRA9	IRA9×IRA6
28	IRA8×IRA9	IRA9×IRA8
29	IRA10×IRA9	IRA9×IRA10
30	IRA12×IRA9	IRA9×IRA12
31	IRA2×IRA11	IRA11×IRA2
32	IRA4×IRA11	IRA11×IRA4
33	IRA6×IRA11	IRA11×IRA6
34	IRA8×IRA11	IRA11×IRA8
35	IRA10×IRA11	IRA11×IRA10
36	IRA12×IRA11	IRA11×IRA12
37	154×151	151×154
38	154×153	153×154
39	104×103	103×104
40	32×31	31×32

معادله (۱)

$$\text{قطر (دنیر)} = ۹۰۰۰ \times \frac{\text{متر}}{\text{وزن}}$$

استحکام نخ با دو شاخص درصد کشیدگی و استحکام کششی مطابق با استاندارد ملی ایران به‌شماره ۱۰-۵۱۵۷ (تعیین مقاومت کششی و ازدیاد طول) با استفاده از دستگاه مقاومت‌سنج (Shirly(Micro 250)- England) اندازه‌گیری شد.

در آزمایش حاضر، با توجه به اینکه نیمی از آمیخته‌ها حاصل تلاقی‌های مستقیم و نیمی دیگر حاصل تلاقی‌های معکوس بودند، به‌جز اثر آمیخته (۴۰ آمیخته)، اثر تلاقی دو طرفه[1] (دو نوع مستقیم و معکوس) نیز قابل بررسی است. لذا، داده‌های حاصل از این آزمایش دو عاملی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین ۴۰ آمیخته مورد بررسی برای صفات مختلف با استفاده از آزمون توکی در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی (جدول ۲) نشان داد که اثر نوع آمیخته برای تمامی صفات مورد بررسی شامل قطر نخ (YS^2) بر حسب دنیر (d^3)، طول نخ (YL^4) بر حسب متر (m)، استحکام

1- Reciprocal effect

2- Yarn Size
3- Denier
4- Yarn Length

کششی نخ (YTS[1]) بر مبنای گرم بر دنیر (gr/d)، درصد ازدیاد طول (EP[2]) برحسب درصد (%)، وزن نخ (FW[3]) برحسب گرم (g) و درصد نخ‌دهی (RSP[4]) بر مبنای درصد (%) بسیار معنی‌دار بودند (P<0.0001). اثر نوع تلاقی برای دو صفت قطر نخ و استحکام کششی نخ معنی‌دار نیست (P>0.05)، امّا برای صفت درصد ازدیاد طول و طول نخ معنی‌دار (P<0.05) و برای دو صفت وزن نخ و درصد نخ‌دهی بسیار معنی‌دار است (P<0.0001).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین عملکرد صفات مورد بررسی بر اساس داده‌های تلفیقی تلاقی‌های مستقیم و معکوس در جدول ۳ ارائه شده است. میانگین صفات در آمیخته‌های مورد بررسی (۴۰ آمیخته) به‌صورت مرتب شده و از مقادیر بالا به پایین در نمودارهای ۱ تا ۶ ارائه شده است. در این نمودارها، میانگین مقادیر هر صفت بر روی نمودار هر آمیخته مشخص شده است تا میزان برتری آمیخته‌ها مشخص شود. این نمودارها، آمیخته‌هایی که در انتها (بالاتر و کمتر) قرار گرفته‌اند را به‌خوبی مشخص می‌نماید. نتایج حاصل از مقایسه آمیخته‌ها برای صفات مختلف در زیر آمده است:

قطر نخ (YS): برای این صفت میانگین محاسبه شده در تمامی آمیخته‌ها ۶۷/۵۴ دنیر بود و آمیخته شماره ۱۵ (با ترکیب IRA3×IRA10) و ۱۲ (با ترکیب IRA3×IRA4) بیشترین میانگین را از خود نشان دادند (جدول ۳). کمترین میانگین نیز مربوط به آمیخته تجاری شماره ۳۸ (با ترکیب 153×154 و میانگین ۵۸/۲۰۰ دنیر) بود. میانگین‌های مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۱ ارائه شده‌اند. در جدول ۴ آمیخته‌هایی که قطر نخ ضخیم‌تری داشتند، عبارت بودند از : ۱۵، ۱۲، ۵، ۲۰، ۱، ۱۴، ۳۶، ۸، ۳۰ و ۲۷ که هیچ‌کدام از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند (P<0.05).

طول نخ (YL): میانگین محاسبه شده این صفت در تمامی آمیخته‌ها ۶۰۲/۴ متر بود و آمیخته تجاری شماره ۲۲ (با ترکیب IRA5×IRA8) بیشترین میانگین (۷۷۱/۴ متر) را به خود اختصاص داد. کمترین میانگین حاصله نیز مربوط به آمیخته تجاری شماره ۷ (با ترکیب IRA2×IRA3 و میانگین ۴۴۱/۲ متر) بود (جدول ۳). میانگین‌های مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۲ ارائه شده‌اند.

استحکام کششی نخ (YTS): میانگین محاسبه شده این صفت در تمامی آمیخته‌ها ۳/۲۲۸ گرم بر دنیر بود و آمیخته‌های تجاری شماره ۴۰ (با ترکیب 103×104) و ۳۸ (با ترکیب 153×154) بیشترین میانگین‌ها (به‌ترتیب ۳/۴۷۵ و ۳/۴۴۵ گرم بر دنیر) را دارا بودند. کمترین میانگین نیز مربوط به آمیخته شماره ۱۹ (با ترکیب IRA4×IRA3 و میانگین ۲/۹۳۵ گرم بر دنیر) بود (جدول ۳). میانگین‌ها مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۳ ارائه شده‌اند.

درصد ازدیاد طول (EP): متوسط درصد ازدیاد طول محاسبه شده برای تمامی آمیخته‌ها ۱۴/۸۵۵ درصد بود و آمیخته تجاری شماره ۳۷ (با ترکیب 151×154) بیشترین میانگین (۱۷/۶۱۵ درصد) را به خود اختصاص داد. کمترین میانگین نیز مربوط به آمیخته شماره ۷ (با ترکیب IRA2×IRA3 و میانگین ۱۳/۴۶۸ درصد) بود (جدول ۳). میانگین‌ها مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۴ ارائه شده‌اند.

وزن نخ (YW): میانگین محاسبه شده در تمامی آمیخته‌ها برای این صفت ۴/۵۰۱ گرم بود و آمیخته شماره ۲۲ (با ترکیب IRA5×IRA8) بیشترین میانگین (۵/۵۹۰ گرم) را دارا بود. کمترین میانگین نیز مربوط به آمیخته شماره ۷ (با ترکیب IRA2×IRA3 و میانگین ۳/۴۶ گرم) بود (جدول ۳). میانگین‌های مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۵ ارائه شده‌اند.

درصد نخ‌دهی (RSP): برای این صفت که درصد ابریشم خام (raw silk percentage) نیز گفته می‌شود، میانگین محاسبه شده در تمامی آمیخته‌ها ۳۴/۵۸۹ درصد بود و آمیخته‌های شماره ۲۲ (با ترکیب IRA5×IRA8) و ۳۸ (با ترکیب 153×154) بیشترین میانگین‌ها (به‌ترتیب ۴۱/۴۴۵ و ۴۰/۶۵۸ درصد) را دارا بودند (جدول ۳). کمترین میانگین نیز مربوط به آمیخته شماره ۷ (با ترکیب IRA2×IRA3 و میانگین ۲۵/۸۶۰ درصد) بود (جدول ۲). میانگین های مرتب شده آمیخته‌ها از مقادیر بالا به پایین در شکل ۶ ارائه شده‌اند.

1- Yarn Tensile Strength
2- Elongation Percentage
3- Yarn Weight
4- Raw Silk Percentage

جدول ۲- تجزیه واریانس ویژگی‌های نخ ابریشم در آمیخته‌های کرم ابریشم مورد بررسی

Table 2- Analysis of variance for the silk yarn characters in the studied silkworm hybrids

صفات Traits		قطر نخ (دنیر) YS (d)		طول نخ (متر) YL (m)		استحکام کششی نخ (گرم/دنیر) YTS (g/d)		درصد ازیاد طول (درصد) EP (%)		وزن نخ (گرم) YW (g)		درصد نخ‌دهی (درصد) RSP (%)	
منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی d.f	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
نوع تلاقی Reciprocal	1	2.52	0.1146	5.10	0.0252	0.06	0.8132	4.42	0.0370	7.13	0.0083	6.93	0.0093
آمیخته (نوع تلاقی) Hybrids (reciprocal)	78	11.25	<0.0001	8.18	<0.0001	4.07	<0.0001	3.37	<0.0001	5.89	<0.0001	5.77	<0.0001
ضریب تغییرات CV (%)		3.63		9.87		4.89		6.78		9.92		9.89	
ضریب تعیین R^2		0.84		0.80		0.66		0.62		0.74		0.74	

FS: Yarn Size, FL: Yarn Length, FTS: Yarn Tensile Strength, EP: Elongation Percentage, YW: Yarn Weight, RSP: Raw Silk Percentage

آمیخته‌های برتر جدید: به‌منظور معرفی آمیخته‌های برتر و ضعیف‌تر از نظر ویژگی‌های نخ ابریشم، ۱۰ آمیخته برتر (رتبه ۱ تا ۱۰) و ۱۰ آمیخته ضعیف‌تر (رتبه ۳۱ تا ۴۰) در جدول ۴ آورده شده است. آمیخته‌هایی که از نظر حداقل سه ویژگی ممتاز بودند، عبارت بودند از: ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۲۲، ۳۱ و ۳۶. بررسی تکرار شماره‌های آمیخته‌ها در هر گروه (برتر و ضعیف‌تر) و مقایسه دو گروه نشان داد که تمامی آمیخته‌های ایرانی (شماره‌های ۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰) و آمیخته‌های ۲۲ و ۳۱، از نظر استحکام و وزن نخ و درصد نخ‌دهی ممتاز بوده، لیکن قطر ضعیفی دارند، به‌عبارتی جزو گروه دوم یا آمیخته‌های ضعیف هستند. دو آمیخته ۲۰ و ۳۳ از نظر دو صفت برتر بوده و جزو شماره‌های گروه دوم (گروه ضعیف‌ترها) نیز نیستند. برخی صفات در آمیخته‌های ۱۲، ۱۵، ۸، ۱۶ و ۲۷ ممتاز بود، لیکن در این آمیخته‌ها برخی صفات دیگر جزو گروه ضعیف‌ترها بودند. بر اساس جدول ۴، آمیخته‌های ۷، ۲۶، ۵ و ۱ از نظر ویژگی‌های نخ خیلی ضعیف (حداقل سه صفت از شش صفت) و آمیخته‌های ۱۷، ۱۱، ۴، ۲۵، ۱۹و ۲۳ ضعیف (دو صفت از شش صفت) بودند.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات نخ ابریشم بر اساس داده‌های تلفیقی تلاقی‌های مستقیم و معکوس

Table 3- Mean comparison of the silk yarn characters based on an average of the reciprocal data

	آمیخته Hybrids	قطر نخ (دنیر) YS (d)	طول نخ (متر) YL (m)	استحکام کششی (گرم/دنیر) YTS (g/d)	درصد ازیاد طول (درصد) EP (%)	وزن نخ (گرم) YW (g)	درصد نخ‌دهی (درصد) RSP (%)
1	IRA1×IRA2	71.550 ABC	505.73 IJKL	3.1367 ABCDEF	14.6100 BCDE	4.0033 CDEF	29.135 EFG
2	IRA1×IRA4	61.650 IJK	643.13 ABCDEFGH	3.2650 ABCDEF	14.3467 BCDE	4.4517 BCDEF	34.210 ABCDEFG
3	IRA1×IRA6	67.050 BCDEFGHI	563.80 FGHIJKL	3.3950 ABC	15.1167 BCDE	4.1950 BCDEF	33.148 BCDEFG
4	IRA1×IRA8	65.700 DEFGHIJ	611.51 CDEFGHIJ	3.1050 BCDEF	14.2100 BCDE	4.4433 BCDEF	34.180 ABCDEFG
5	IRA1×IRA10	72.450 AB	519.10 HIJKL	3.2567 ABCDEF	14.7533 BCDE	4.1583 BCDEF	32.675 CDEFG
6	IRA1×IRA12	68.400 ABCDEFG	579.65 EFGHIJK	3.3367 ABCDE	15.0833 BCDE	4.4267 BCDEF	33.647 ABCDEFG
7	IRA2×IRA3	67.050 ABCDEFG	441.18 L	2.975 EF	13.4683 E	3.4600 F	25.860 G
8	IRA2×IRA5	71.100 ABCD	523.55 GHIJKL	3.3417 ABCD	16.3433 AB	4.1233 BCDEF	31.980 CDEFG
9	IRA2×IRA7	67.050 BCDEFGHI	563.36 FGHIJKL	3.1617 ABCDEF	15.2450 BCDE	4.2033 BCDEF	33.880 ABCDEFG
10	IRA2×IRA9	68.580 ABCDEFG	579.67 EFGHIJK	3.1483 ABCDEF	15.8717 ABCD	4.4267 BCDEF	32.643 CDEFG
11	IRA2×IRA11	66.150 CDEFGHIJ	568.05 FGHIJKL	3.2300 ABCDEF	15.7150 ABCDE	4.1717 BCDEF	31.382 DEFG
12	IRA3×IRA4	72.900 A	523.99 GHIJKL	3.2400 ABCDEF	15.8217 ABCD	4.2450 BCDEF	31.368 DEFG
13	IRA3×IRA6	69.300 ABCDEFG	558.57 FGHIJKL	3.3567 ABCD	14.8200 BCDE	4.2883 BCDEF	33.522 BCDEFG
14	IRA3×IRA8	71.550 ABC	643.16 ABCDEFGH	3.1033 BCDEF	14.6983 BCDE	5.1000 AB	36.772 ABCDE
15	IRA3×IRA10	73.350 A	461.29 KL	3.1450 ABCDEF	15.8333 ABCD	3.7633 EF	28.737 FG
16	IRA3×IRA12	70.200 ABCDE	652.67 ABCDEFGH	3.1117 BCDEF	13.9200 CDE	5.0867 AB	37.583 ABCD

17	IRA4×IRA5	61.650 IJK	655.82 ABCDEF	3.0733 CDEF	13.6850 DE	4.4833 BCDEF	34.428 ABCDEFG
18	IRA4×IRA7	65.700 EFGHIJ	643.98 ABCDEFGH	2.9983 DEF	14.2367 BCDE	4.5800 ABCDE	34.805 ABCDEF
19	IRA4×IRA9	64.350 FGHIJ	617.51 BCDEFGHIJ	2.9350 F	15.4717 ABCDE	4.4183 BCDEF	32.718 CDEFG
20	IRA4×IRA11	72.450 AB	585.52 DEFGHIJK	3.2483 ABCDEF	15.9983 ABC	4.7117 ABCDE	33.568 BCDEFG
21	IRA5×IRA6	66.150 CDEFGHIJ	590.84 DEFGHIJK	3.2667 ABCDEF	14.0950 BCDE	4.3317 BCDEF	35.243 ABCDEF
22	IRA5×IRA8	62.550 HIJK	771.39 A	3.3783 ABC	14.3850 BCDE	5.5900 A	41.445 A
23	IRA5×IRA10	69.300 ABCDEFG	566.60 FGHIJKL	3.0450 CDEF	14.1500 BCDE	4.3733 BCDEF	34.543 ABCDEFG
24	IRA5×IRA12	67.950 BCDEFGH	652.67 ABCDEFGH	3.2250 ABCDEF	14.0583 BCDE	4.9183 ABC	36.765 ABCDE
25	IRA6×IRA7	67.050 BCDEFGHI	559.23 FGHIJKL	3.2333 ABCDEF	14.3100 BCDE	4.1550 BCDEF	33.253 BCDEFG
26	IRA6×IRA9	69.750 ABCDEF	491.81 JKL	3.1867 ABCDEF	13.9200 CDE	3.8133 DEF	31.317 DEFG
27	IRA6×IRA11	70.650 ABCD	529.78 GHIJKL	3.3800 ABC	14.6400 BCDE	4.1483 BCDEF	34.390 ABCDEFG
28	IRA7×IRA8	65.700 DEFGHIJ	639.54 ABCDEFGHI	3.0467 CDEF	14.8983 BCDE	4.6583 ABCDE	34.097 ABCDEFG
29	IRA7×IRA10	65.700 DEFGHIJ	598.70 DEFGHIJ	3.1467 ABCDEF	15.2150 BCDE	4.3683 BCDEF	33.750 ABCDEFG
30	IRA7×IRA12	71.100 ABCD	606.04 DEFGHIJ	3.3217 ABCDE	14.9867 BCDE	4.8033 ABCD	37.330 ABCD
31	IRA8×IRA9	63.900 GHIJ	708.24 ABCDE	3.2750 ABCDEF	14.5117 BCDE	5.0417 AB	39.470 ABC
32	IRA8×IRA11	70.200 ABCDE	597.29 DEFGHIJK	3.2000 ABCDEF	14.2817 BCDE	4.6633 ABCDE	35.223 ABCDEF
33	IRA9×IRA10	70.200 ABCDE	627.96 BCDEFGHI	3.2300 ABCDEF	14.9367 BCDE	4.8933 ABC	37.902 ABCD
34	IRA9×IRA12	69.300 ABCDEFG	614.49 CDEFGHIJ	3.3583 ABCD	14.0083 CDE	4.7350 ABCDE	36.808 ABCDE
35	IRA10×IRA11	69.750 ABCDEF	564.98 FGHIJKL	3.2183 ABCDEF	14.3267 BCDE	4.3333 BCDEF	33.447 BCDEFG
36	IRA11×IRA12	71.550 ABC	637.05 BCDEFGHI	3.3950 ABC	14.4800 BCDE	5.0517 AB	37.818 ABCD
37	151×154	61.800 IJK	716.78 ABCD	3.4033 ABC	17.6150 A	4.9367 ABC	37.615 ABCD
38	153×154	58.200 K	750.29 AB	3.4450 AB	15.7700 ABCDE	4.8167 ABCD	40.658 AB
39	31×32	62.100 IJK	746.48 ABC	3.3867 ABC	15.3900 ABCDE	5.1450 AB	37.763 ABCD
40	103×104	61.200 JK	685.32 ABCDEF	3.4750 A	15.5767 ABCDE	4.6467 ABCDE	38.467 ABCD
میانگین Mean		67.54	602.48	3.228	14.855	4.501	34.589
خطای استاندارد میانگین‌ها SEM		1.001	24.279	0.064	0.412	0.182	1.398
مقدار معنی‌داری P value		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

میانگین های با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

Means with the same letter in each column are not significantly different.

FS: Yarn Size, FL: Yarn Length, FTS: Yarn Tensile Strength, EP: Elongation Percentage, YW: Yarn Weight, RSP: Raw Silk Percentage

مقایسه آمیخته‌های جدید با آمیخته‌های تجاری: در جدول ۵، متوسط عملکرد آمیخته‌های جدید و تجاری برای صفات مختلف ارائه شده است. تفاوت میانگین برای تمام صفات معنی‌دار بود ($P<0.05$). این نتایج که با مقایسه کلی میانگین آمیخته‌های تجاری با آمیخته‌های جدید حاصل شده نشان می‌دهد که آمیخته‌های فعلی برای صفات استحکام، طول و وزن نخ و درصد نخ‌دهی مزیت و برتری داشته، ولی آمیخته‌های جدید تنها از نظر قطر نخ بالاتر بودند. امّا نتایج مقایسه انفرادی (جدول ۳) نشان می‌دهد که برخی از آمیخته‌های جدید از آمیخته‌های تجاری برتر است. برای صفت مهم درصد نخ‌دهی، آمیخته ۲۲ از تمام آمیخته‌های تجاری عملکرد بالاتری دارد و آمیخته ۳۱ نیز با ۳۹/۴۷ درصد ضمن برتری نسبت به آمیخته‌های ۳۷، ۳۹ و ۴۰ ، تفاوت معنی‌داری با آن‌ها ندارد.

جدول ٤- رتبه و مقدار (داخل پرانتز) ده آمیخته برتر کرم ابریشم و ده آمیخته ضعیف‌تر برای صفات مورد بررسی

Table 4- The numbers and value (in parenthesis) of 10 superior silkworm hybrids and 10 inferior silkworm hybrids for the examined traits*

رتبه Rank	قطر نخ (دنیر) YS (d)	طول نخ (متر) YL (m)	استحکام کششی (گرم/دنیر) YTS (g/d)	درصد ازیاد طول (درصد) EP (%)	وزن نخ (گرم) YW (g)	درصد نخ‌دهی (درصد) RSP (%)
1	15 (73.35)	22(771.39)	40(3.47)	37(17.61)	22(5.590)	22(41.445)
2	12(72.90)	38(750.29)	38(3.44)	8(16.34)	39(5.145)	38(40.658)
3	5(72.45)	39(746.48)	37(3.40)	20(16.00)	14(5.100)	31(39.470)
4	20(72.45)	37(716.78)	3(3.39)	10(15.87)	16(5.087)	40(38.467)
5	1(71.55)	31(708.24)	36(3.39)	15(15.83)	36(5.052)	33(37.902)
6	14(71.55)	40(685.32)	39(3.39)	12(15.82)	31(5.042)	36(37.718)
7	36(71.55)	17(655.82)	27(3.38)	38(15.77)	37(4.937)	39(37.763)
8	8(71.1)	24(652.67)	22(3.38)	11(15.71)	24(4.918)	37(37.615)
9	30(71.1)	16(652.67)	34(3.36)	40(15.58)	33(4.893)	16(37.583)
10	27(70.65)	18(643.98)	13(3.36)	19(15.47)	38(4.817)	30(37.330)
31	29(65.7)	25(559.23)	1(3.14)	18(14.23)	3(4.195)	19(32.718)
32	19(64.35)	13(558.57)	16(3.12)	4(14.21)	11(4.172)	5(34.180)
33	31(63.9)	27(529.78)	4(3.10)	23(14.15)	5(4.158)	10(32.643)
34	22(62.55)	12(523.99)	14(3.10)	21(14.09)	25(4.155)	8(31.980)
35	39(62.1)	8(523.55)	17(3.07)	24(14.06)	27(4.148)	11(31.382)
36	37(61.8)	5(519.10)	28(3.05)	34(14.01)	8(4.123)	12(31.368)
37	2(61.65)	1(505.73)	23(3.04)	16(13.92)	1(4.003)	26(31.317)
38	17(61.65)	26(491.81)	18(3.00)	26(13.92)	26(3.813)	1(29.135)
39	40(61.2)	15(461.29)	7(2.97)	17(13.65)	15(3.763)	15(28.737)
40	38(58.2)	7(441.18)	19(2.93)	7(13.47)	7(3.460)	7(25.860)

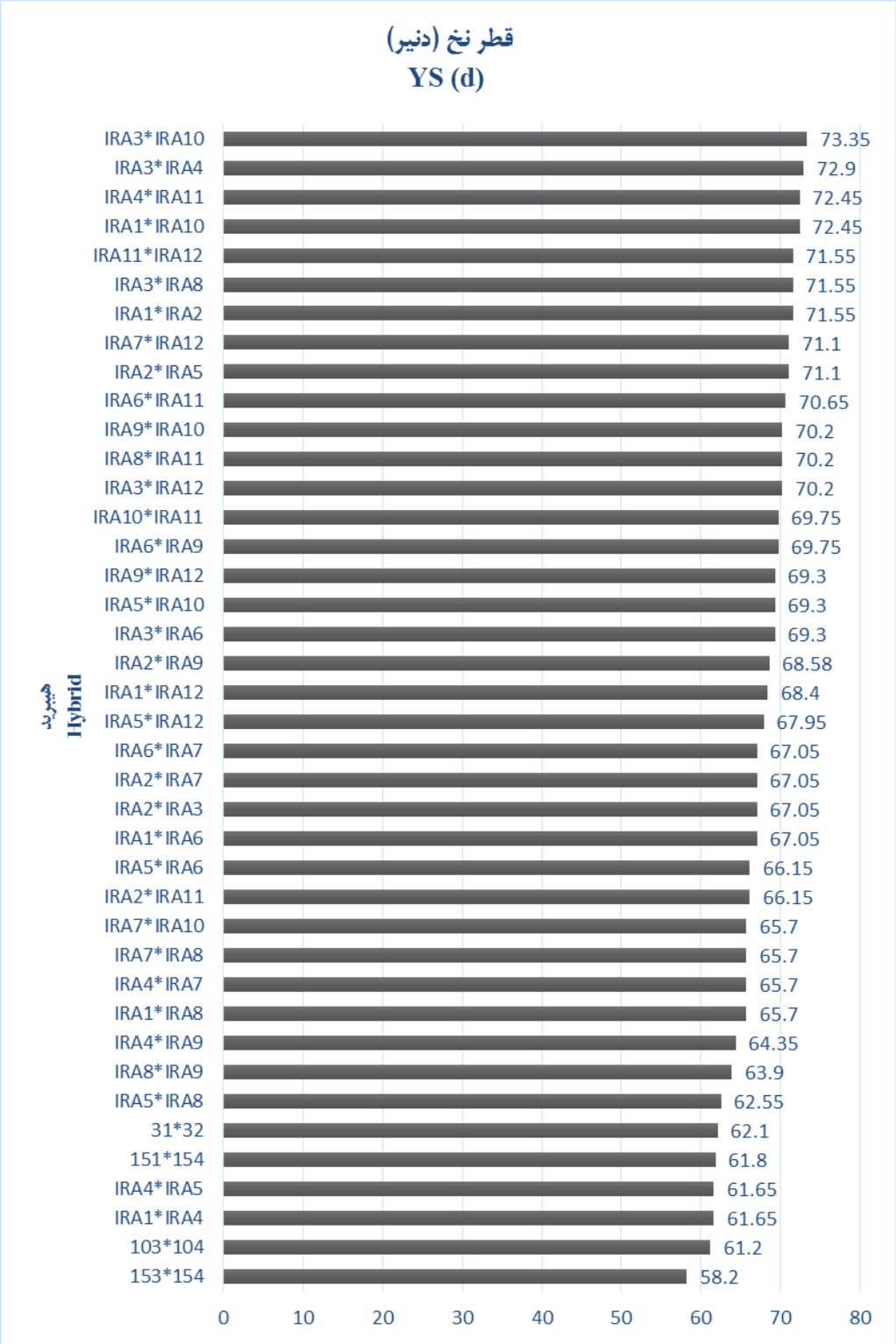
FS: Yarn Size, FL: Yarn Length, FTS: Yarn Tensile Strength, FEP: Elongation Percentage, YW: Yarn Weight, RSP: Raw Silk Percentage

جدول ٥- مقایسه میانگین صفات نخ ابریشم آمیخته‌های کرم ابریشم جدید و تجاری ایرانی

Table 5- Mean comparison of the silk yarn characters in new and commercial Iranian silkworm hybrids

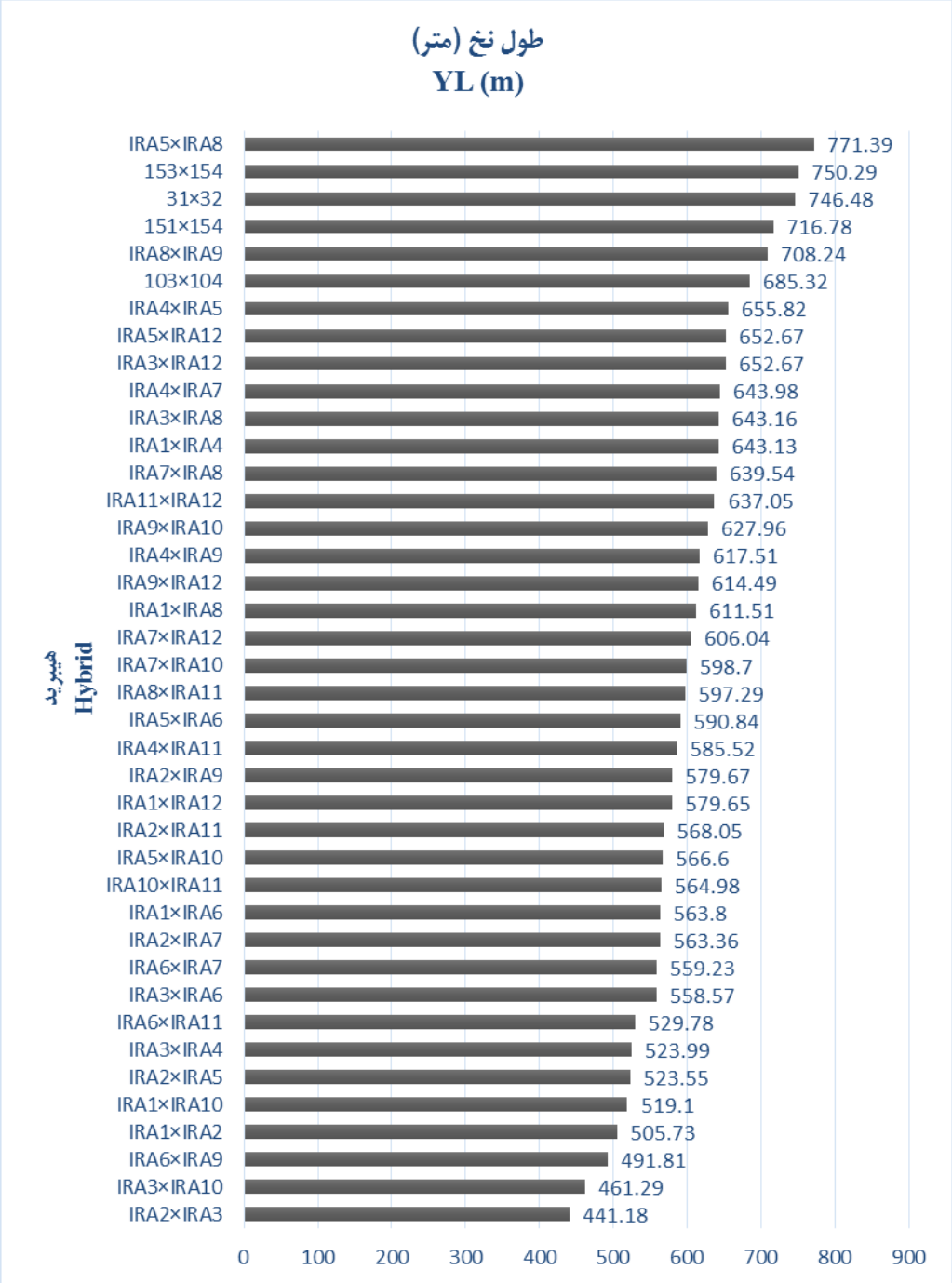
آمیخته Hybrids	قطر نخ (دنیر) YS (d)	طول نخ (متر) YL (m)	استحکام کششی (گرم/دنیر) YTS (g/d)	درصد ازیاد طول (درصد) EP (%)	وزن نخ (گرم) YW (g)	درصد نخ‌دهی (درصد) RSP (%)
هیبرید جدید New hybrid	68.320 A	588.82 B	3.207 B	14.73 B	4.461 B	34.17 B
هیبرید تجاری (قدیمی) Commercial (old) hybrid	60.825 B	724.72 A	3.427 A	16.08 A	4.886 A	38.62 A
میانگین Mean	67.57	602.40	3.229	14.87	4.504	34.61
خطای استاندارد میانگین‌ها SEM	0.33	7.04	0.014	0.087	0.046	0.355
مقدار معنی‌داری P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0062	<0.0001

FS: Yarn Size, FL: Yarn Length, FTS: Yarn Tensile Strength, FEP: Yarn Elongation Percentage, YW: Yarn Weight, RSP: Raw Silk Percentage



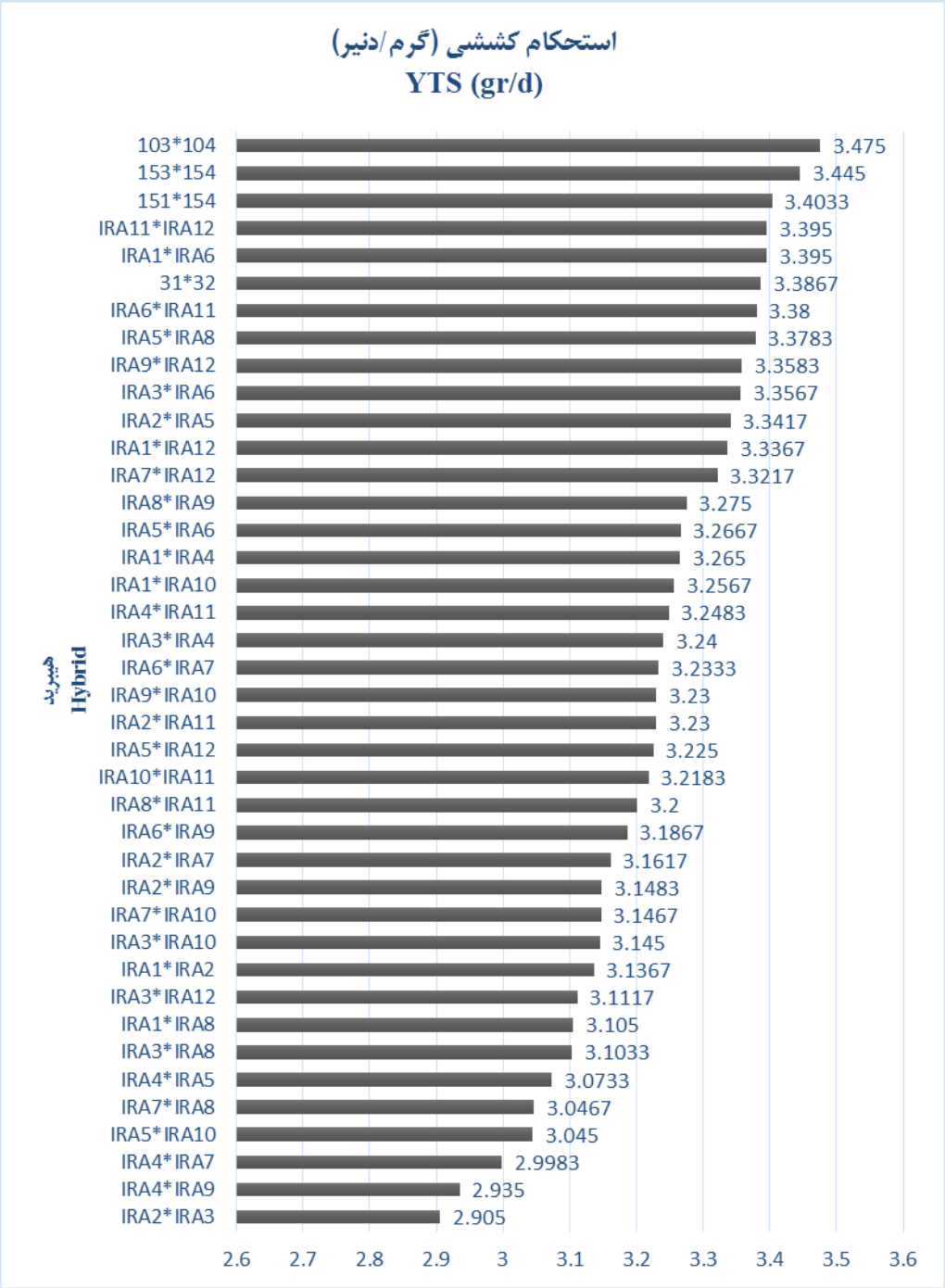
شکل ۱- میانگین‌های مرتب شده قطر نخ در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 1- Sorted averages of YS in the 40 studied hybrids



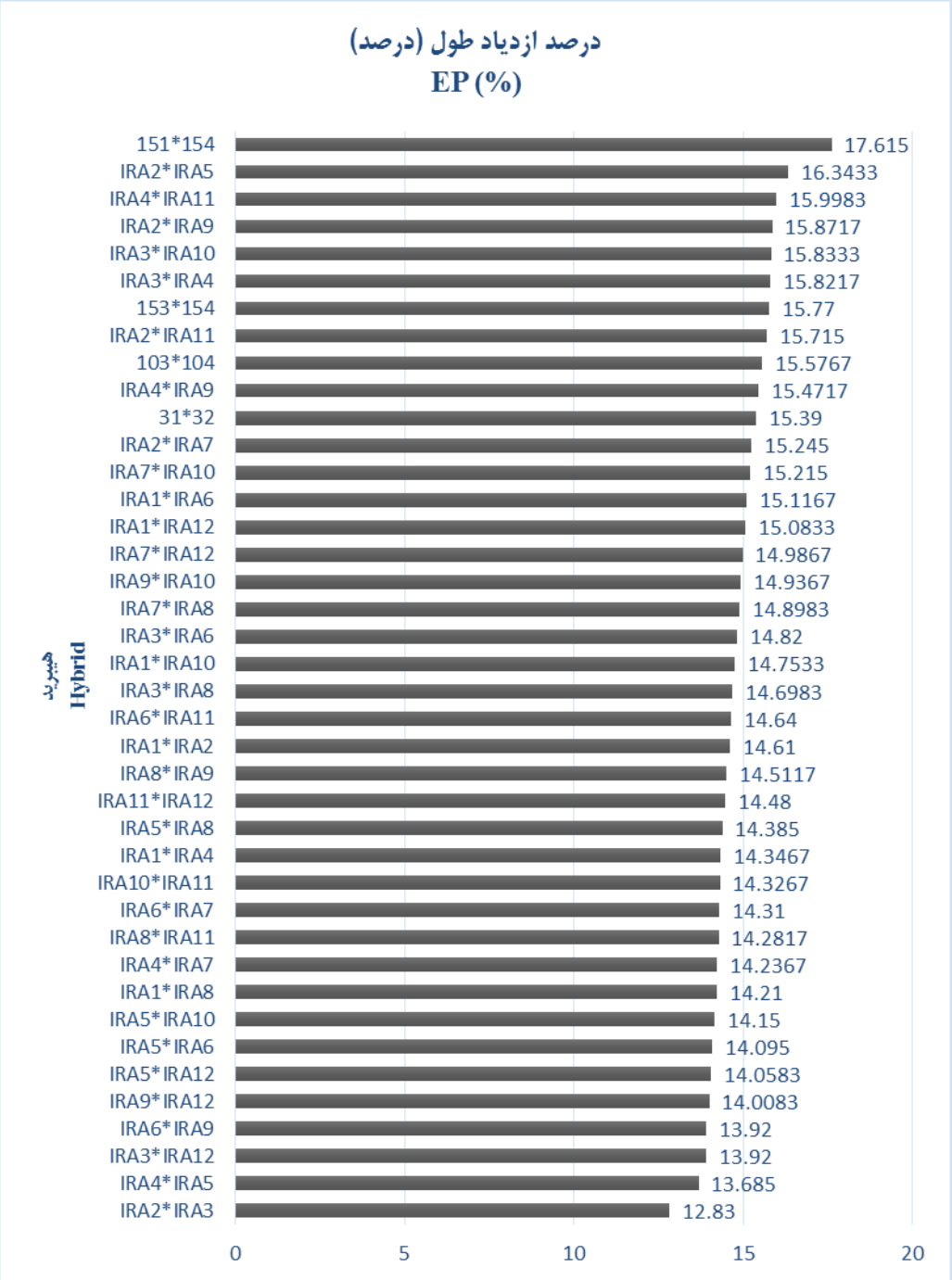
شکل ۲- میانگین‌های مرتب شده طول نخ در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 2- Sorted averages of YL in the 40 studied hybrids



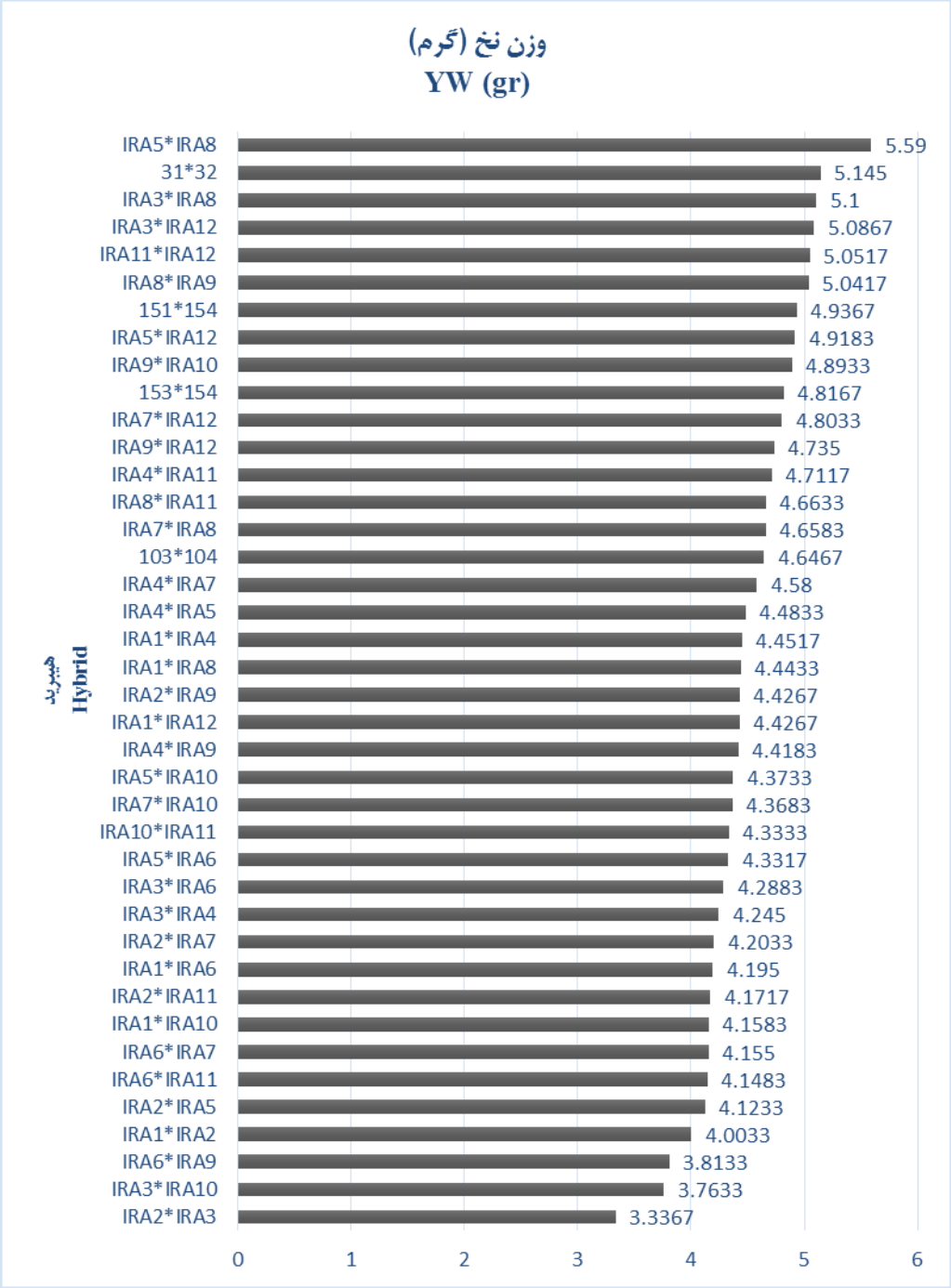
شکل ۳- میانگین‌های مرتب شده استحکام کششی نخ در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 3- Sorted averages of YTS in the 40 studied hybrids



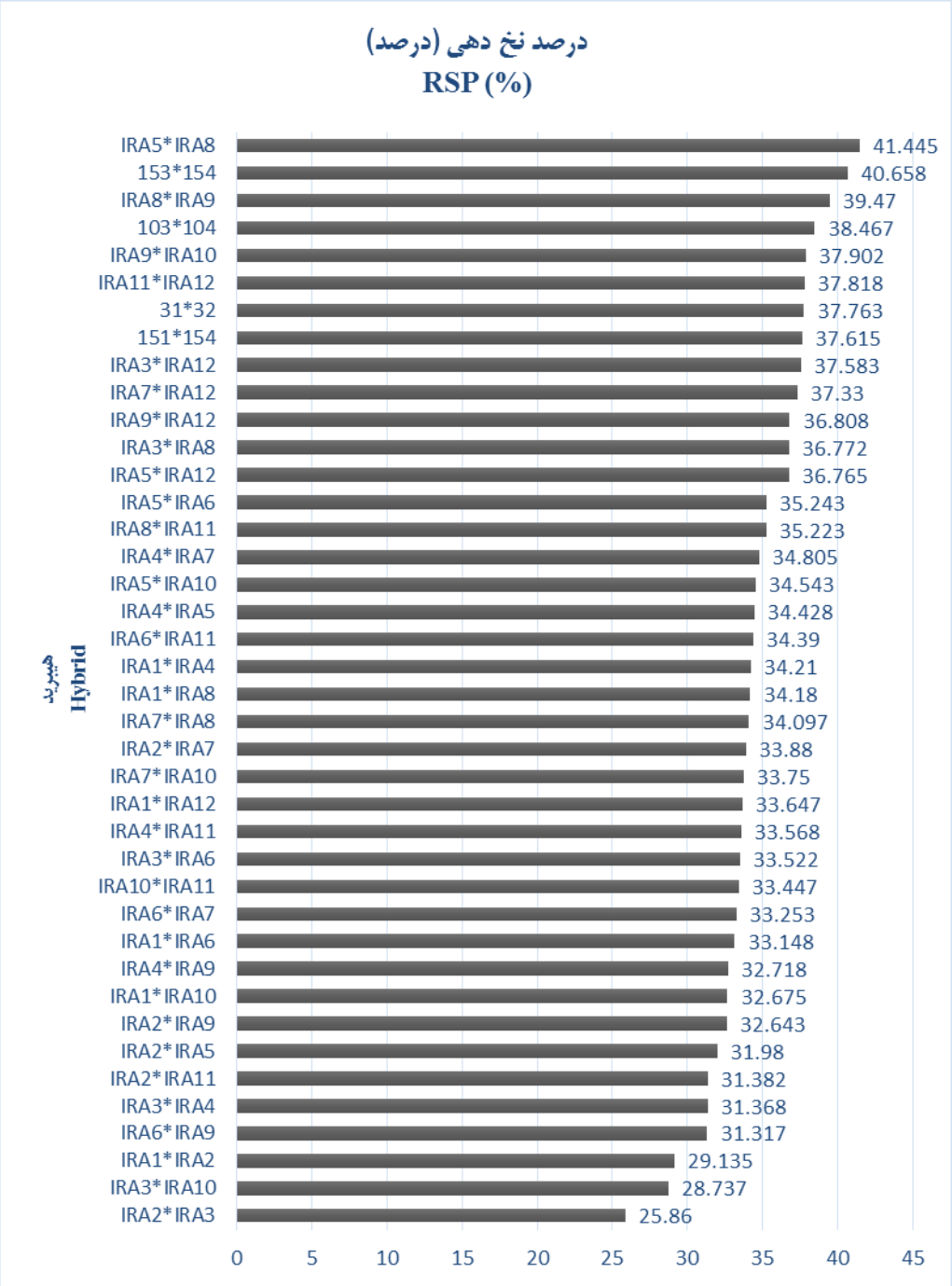
شکل ٤- میانگین‌های مرتب شده درصد ازدیاد طول نخ در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 4- Sorted averages of EP trait in the 40 studied hybrids



شکل ۵- میانگین‌های مرتب شده وزن نخ در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 5- Sorted averages of YW in the 40 studied hybrids



شکل ٦- میانگین‌های مرتب شده درصد نخ‌دهی در ۴۰ آمیخته مورد بررسی

Figure 6- Sorted averages of RSP in the 40 studied hybrids

بحث

محصول نهایی نوغانداری زمانی ارزش واقعی خود را پیدا خواهد کرد که مطلوب صنایع تکمیلی یعنی ریسندگان نخ و بافندگان آن قرار گیرد. این مهم نیز در صورتی محقق می‌شود که ضمن پرورش کرم ابریشم و تولید پیله، به ویژگی‌های نخ ابریشم متناسب با نیاز صنعت توجه شود. چنانچه نیاز صنعت الیاف ضخیم باشد، نظیر صنعت فرش و یا الیاف ظریف نظیر صنعت نساجی، تولیدکننده تخم نوغان لازم است، آمیخته‌هایی متناسب با این نیاز به نوغانداران معرفی نماید. با این وجود، میزان پیله استحصالی از یک جعبه تخم نوغان لازم است، مطلوب نظر پرورش‌دهندگان کرم ابریشم و سرمایه‌گذاران در این صنعت قرار گیرد.

بر اساس طرح مشترک مرکز تحقیقات ابریشم کشور و دانشگاه گیلان، تعدادی لاین چینی‌شکل و ژاپنی‌شکل کرم ابریشم در طی سال‌های اخیر ایجاد و معرفی شد (Mavvajpoor *et al.*, 2021 ; Mirhoseini *et al.*, 2021). از این لاین‌ها، ۳۶ آمیخته تولید و از نظر صفات پیله ارزیابی و مقایسه شدند (Mirhoseini *et al.*, 2022)؛ لیکن کیفیت نخ پیله‌ها مشخص نشدند. با توجه به اهمیت رقابت هیبریدهای داخلی با وارداتی، لازم است هیبریدهای جدید بر اساس ویژگی‌های مربوط به نخ‌ریسی و کیفیت الیاف نیز مقایسه شوند، تا علاوه‌بر عملکرد پیله حاصل از یک جعبه تخم نوغان که متضمن منافع تولیدکنندگان پیله است، منافع تولیدکنندگان نخ و حتی بافندگان نیز پیش‌بینی شود. بدون تردید، عملکرد دستگاه‌های سنتی نخ‌ریسی (در استان خراسان رضوی، استان آذربایجان شرقی، گلستان و گیلان) و کارخانجات تولید نخ ابریشم (کارخانه صنایع ابریشم گیلان در اباتر صومعه سرا، کارخانه صنایع ابریشم شرق گیلان در لنگرود و کارخانه ابریشم طوس در مشهد) متأثر از نوع آمیخته‌های کرم ابریشم اعم از داخلی و وارداتی می‌باشد.

در گزارش حاضر، کیفیت نخ آمیخته‌های جدید اندازه‌گیری و با آمیخته‌های تجاری فعلی مقایسه شده است. اولین گزارش از کیفیت نخ آمیخته‌های ایرانی توسط خردادی و همکاران (Khordadi *et al.*, 2023) گزارش شد. در آن تحقیق مشخص شد که آمیخته‌های ایرانی با متوسط وزن ۴/۸۸ گرم و قطر ۶۲/۴۲ دنیر عملکرد بیشتری نسبت به آمیخته‌های وارداتی چینی داشتند. با توجه به گزارش‌های متعدد در خصوص کیفیت مناسب پیله آمیخته‌های تجاری فعلی (Alipanah *et al.*, 2021; Biabani *et al.*, 2021; Khordadi *et al.*, 2021)، نتایج این تحقیق نیز نشان داد که کیفیت نخ آن‌ها نیز مطلوب است. متوسط قطر نخ آمیخته‌های جدید حدود هشت دنیر بیشتر از آمیخته‌های تجاری فعلی است. این موضوع با توجه به نوع مصرف نخ‌های ابریشم استحصالی که عمدتاً برای بافت فرش استفاده می‌شوند، مزیت تلقی می‌شود. یکی از نکات مهم در خصوص ویژگی‌های نخ ابریشم آمیخته‌های فعلی تجاری این است که همواره کارخانجات نخ‌ریسی ابریشم به‌دلیل قشر مناسب پیله و درصد نخ‌دهی از این آمیخته‌ها رضایت داشته‌اند. از بین آمیخته‌های جدید، پنج آمیخته دارای کیفیت نخ بهتری بودند (شماره‌های ۲۲، ۳۱، ۳۶، ۲۰ و ۳۳) و چهار آمیخته نیز عملکرد کلی ضعیفی داشتند (شماره‌های ۷، ۵، ۲۶ و ۱). آمیخته ۲۲ (IRA5×IRA8) که از نظر وزن و طول نخ نیز برتر بود، از نظر درصد نخ‌دهی نیز عملکرد بهتری نسبت به تمام آمیخته‌های تجاری داشت.

در طی چند سال گذشته که آمیخته‌های چینی در کشورمان توزیع شده‌اند، به‌دلیل قشر ضعیف‌تر پیله، نارضایتی از عملکرد نخ‌ریسی آمیخته‌های وارداتی توسط کارگاه‌های نخ‌ریسی گزارش شده است. مقایسه کیفیت نخ آمیخته‌های وارداتی با دو آمیخته ایرانی 154×153 و 104×103 (Khordadi *et al.*, 2023) نیز نشان داد که آمیخته 154×153 در تمام صفات مرتبط با نخ نسبت به ۱۲ آمیخته وارداتی برتری دارد. در پژوهش ذکر شده، بالاترین وزن نخ مربوط به آمیخته ایرانی 104×103 با مقدار ۵/۳۰ گرم بود که با آمیخته ایرانی دیگر (154×153) با میانگین ۵/۲۶ گرم اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین گزارش شده است که در مقایسه بین آمیخته‌ها ضروری است که هم صفات پیله و هم نخ ارزیابی شوند، زیرا برخی از آمیخته ها از نظر ویژگی‌های پیله ممتاز بوده و به‌خوبی منافع نوغانداران را تأمین می‌نمایند، نظیر آمیخته‌های چینی وارداتی Baiyue×Qiufeng (B×Q) و Qiufeng×Baiyue (Q×B)، لیکن از نظر وزن نخ و درصد ابریشم خام (درصد نخ‌دهی) بسیار ضعیف بوده و در عمل نمی‌توانند رضایت تولید کنندگان نخ را تأمین نمایند. این آمیخته‌ها وزن قشر پیله کمتری نسبت به آمیخته‌های ایرانی دارند.

مقایسه تلاقی دو طرفه در ۱۲ آمیخته وارداتی (Khordadi *et al.*, 2023) نشان داد که آمیخته‌های Q×B و B×Q برای دو ویژگی وزن نخ و درصد نخ‌دهی (درصد ابریشم خام) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند، لیکن برای یک جفت آمیخته دیگر (Jinysong×Haoyue (J×H) و Haoyue×Jinysong (H×J)) تنها برای صفت درصد نخ‌دهی بین تلاقی‌های مستقیم و معکوس تفاوت وجود داشت ($P<0.05$). امّا برای چهار جفت آمیخته دیگر در عمل هیچ تفاوت معنی‌داری در هیچ‌کدام از صفات مشاهده نشد. تفاوت کمتر بین عملکرد دو آمیخته حاصل از تلاقی دو طرفه در عمل یک مزیت برای آن آمیخته تلقی می‌شود. در پژوهشی روی نژادهای هندی، آمیخته‌های نسل اول حاصل از تلاقی‌های مستقیم و معکوس نژادهای دو نسله (C108 و NB4D2) و چند نسله (PM و Nistarini) کرم ابریشم برای صفاتی همچون طول الیاف و شاخص قطر نیز مورد بررسی قرار گرفتند (Talebi *et al.*, 2011). نتایج نشان

داد که در آمیخته‌گری بین نژادهای دو نسله و چند نسله، صفات طول الیاف و شاخص قطر اختلاف بسیار معنی‌داری داشته و طول الیاف بهبود قابل ملاحظه‌ای یافته است. بر همین اساس، برای صفت طول نخ، آمیخته C108×NB4D2 با ۱۲۸۱/۷ متر بلندترین، و آمیخته Nistari×PM با ۶۲۳/۷ متر کوتاه‌ترین طول لیف را نشان داده‌اند. همچنین، آمیخته‌های NB4D2×Nistari و NB4D2×PM به‌ترتیب با ۱۰۱۸/۶ و ۸۹۳/۱ متر نسبت به آمیخته‌های حاصل از تلاقی معکوس همین نژادها، اختلاف بسیار معنی‌داری (P<0.01) نشان دادند. بر اساس قطر نخ نیز به‌جز آمیخته‌های نژاد دو نسله، اختلاف بسیار معنی‌داری در مقدار این صفت بین برخی از آمیخته‌های حاصل از تلاقی مستقیم و معکوس سایر نژادها دیده شد. در نژاد چند نسله Nistari×PM، شاخص قطر با مقدار ۲/۳۷ در مقایسه با آمیخته PM×Nistari با مقدار ۲/۰۴ اختلاف بسیار معنی‌داری را نشان داد. بین آمیخته‌گری مستقیم C108×PM و NB4D2×PM و تلاقی معکوس آن‌ها نیز اختلاف بسیار معنی‌داری گزارش شد (P<0.01).

آمیخته‌های جدید کرم ابریشم لازم است در شرایط و مکان‌های متفاوت ارزیابی اولیه شوند. هم اکنون مقایسه هیبریدهای منتخب در مزارع مرکز تحقیقات ابریشم کشور، شرکت سهامی کشاورزی و دامپروی سپیدرود و مرکز توسعه نوغانداری کشور در حال انجام است. بر اساس این نتایج (گزارش‌های داخلی) تعدادی از آمیخته‌هایی که از نظر تولید پیله و صفات مرتبط با پیله عملکرد قابل قبولی داشته‌اند، دارای ویژگی‌های نخ قابل قبول بودند، نظیر IRA2×IRA9، IRA2×IRA11، IRA3×IRA4 و IRA4×IRA11. لیکن دو آمیخته نیز جزو آمیخته‌های برتر از نظر تولید پیله و صفات پیله بودند، ولی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از نظر ویژگی‌های نخ و درصد نخ‌دهی برتر نیستند، شامل IRA2×IRA3 و IRA4×IRA7. آمیخته IRA2×IRA3 از نظر وزن، استحکام و درصد نخ‌دهی عملکرد نامطلوبی داشته و نمی‌تواند منافع ریسندگان نخ را تأمین نماید. البته، لازم است که تصمیم‌گیری نهایی در خصوص آمیخته‌های جدید پس از پرورش آن‌ها در شرایط روستایی و ارزیابی پیله و نخ حاصل از آن باشد.

نتیجه‌گیری کلی

محصول نهایی زنجیره ارزش نوغانداری نخ ابریشم است که ویژگی‌های آن به‌دلیل نیازمندی به امکانات خاص اعم از ریسندگی آزمایشگاهی و تجهیزات تخصصی به‌راحتی قابل اندازه‌گیری نیست. از سوی دیگر، چون هیبریدهای کرم ابریشم مختلفی از سوی مراکز توزیع تخم نوغان عرضه می‌شود که کیفیت پیله استحصالی می‌تواند منافع ریسندگان نخ ابریشم را متأثر نماید. لذا، در انتخاب نهایی آمیخته‌های کرم ابریشم ضروری است، عملکرد پیله و نخ ابریشم توامان ارزیابی شود. به‌علاوه الیاف ابریشمی از نظر تمام ویژگی‌های نخ اعم از وزن، قطر، طول، استحکام و درصد نخ‌دهی رکوردگیری و به قوت و ضعف مرتبط با کیفیت نخ حاصل از پیله‌های هر آمیخته توجه شود. زیرا آمیخته‌های با عملکرد پیله بهتر الزاماً ممکن است از نظر تمام صفات نخ و یا حتی تعدادی از آن‌ها جزو برترین‌ها نباشند.

سپاسگزاری

این تحقیق بر اساس قرارداد همکاری پژوهشی فی مابین دانشگاه گیلان و مرکز تحقیقات ابریشم کشور (به‌شماره ۴۹۰۲۵/ پ۱۵ مورخ ۱۴۰۰/۵/۱۷) انجام شد که بدینوسیله از ریاست محترم مرکز تحقیقات ابریشم کشور و معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه گیلان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Alipanah, M., Abedian, Z., Nasiri, A., & Sarjamei, F. (2021). Study of seven silkworm varieties performance in Torbat Heydarieh region. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *12*(3), 399-409. https://doi.org/ 10.22067/ijasr.v12i3.75418 (In Persian with English Summary)
2. Biabani, M. R., Khezrian, A., Kheirkhah Rahimabad, Y., Shahbazi, F., Tayeb Naeimi, S. K., Sourati Zanjani, R., Jelveh Zideh Saraei, B., Seidavi, A., & Poorghasemi, M. (2021). Comparison about import and inner silkworm's hybrids. *Journal of Animal Environment*, *13(1)*, 387-396. https://doi.org/10.22034/aej.2021.134160 (In Persian with English Summary)
3. Giacomin, A., Garcia, J., Zonatti, W., Silva-Santos, M., Costa Laktim, M., & Baruque-Ramos, J. (2017). Brazilian silk production: Economic and sustainability aspects. *Procedia Engineering*, *200*, 89-95.
4. Hosseini Moghaddam, S. H. (2013). Priciples of Silkworm Rearing. 2nd Edition. University of Guilan Press, Guilan, Iran. (In Persian).
5. International Sericultural Commission (2023). Statistics: Global silk industry. from https://www.inserco.org
6. Khordadi, M. R., Hosseini Moghaddam, S. H., Sabouri, A., & Mahfoozi, K. (2023). Commercial silkworm hybrids comparison based on cocoons and silk thread performance of Guilan sericulturists. *Animal Production Research*, *12(4)*, 88-103. https://doi.org/ 10.22124/ar.2024.7392 (In Persian with English Summary)
7. Khordadi, M. R., Hosseini Moghaddam, S. H., Sabouri, A., & Mahfoozi K. (2021). Introducing superior silkworm hybrids for different geographical regions of Guilan province. *Animal Production Research*, *10*(2), 25-38.

https://doi.org/10.22124/ar.2021.17506.1556 (In Persian with English Summary)
8. Lee, Y. W. (2011) Silk reeling and testing manual. FAO, Agricultural Service Bulletin. Rome, Italy.
9. Mavvajpoor, M., Mirhosseini, S. Z., Hosseini Moghaddam, S. H., Nematollahian, S., Rafiee, F., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Kheirkhah Rahimabad, Y. (2021). Rejuvenation and multiple-trait selection in the five Chinese-shape of parental silkworms. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *13*(3), 463-474. https://doi.org/10.22067/ijasr.2021.38311.0 (In Persian with English Summary)
10. Mirhoseini, S. Z., Mawajpoor, M., Nematollahian, S., Hosseini Moghaddam, S. H., Rafeie, F., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Kheirkhah Rahimabad, Y. (2021) .Study of multiple-trait selection in new Iranian silkworm genotypes- Chinese-shape parents. Animal Production Research, *10*(1), 1-11. https://doi.org/10.22124/ar.2021.15342.1487 (In Persian with English Summary)
11. Mirhoseini, S. Z., Nematollahian, S., Hosseini Moghaddam, S. H., Ghavi Hossein-Zadeh, N., Abdoli, R., & Kheirkhah Rahimabad, Y. (2022). Comparison of performance of hybrids obtained by crossbreeding of new lines of Iranian silkworm and identification of superior hybrids. *Animal Production*, *24*(1), 1-11. https://doi.org/10.2205/jap.2022.329135.62 (In Persian with English Summary)
12. Mirhoseini, S. Z., Seidavi, A., Ghanipoor, M., Vishkaei, S., & Bizhannia, A. (2008). Performance of new hybrids of silkworm (*Bombyx mor* L) in spring and autumn seasons. *Journal of Agricultural Knowledge*, *17*(4), 135-141. (In Persian)
13. Nematollahian, S., Torfeh, A., Mavvajpour, M., Hosseini Moghadam, S. H., & Seidavi, A. (2016). Study of production potential of Iranian and non-Iranian different silkworm hybrids. *Journal of Animal Environment*, *8*(1), 85-94. https://doi.org/20.1001.1.27171388.1395.8.1.11.0 (In Persian with English Summary)
14. Shams-Natery, A. (2005). Textile fibers properties (silk). Jahad Daneshgahi Publication, Amirkabir University of Technology. Tehran, Iran. (In Persian).
15. Singh, T., Bhat, M. M., & Ashraf, M. K. (2011). Critical analysis of correlation and heritability phenomenon in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *2*(5), 347-353.
16. Talebi, E., & Subramanya G. (2010). Estimation of genetic parameters for some quantitative traits in mulberry silkworm. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, (2), 225-229.
17. Talebi, E., Khademi, M., Subramanya, G., & Mahesha, H. B. (2011). A study on straight and reciprocal crossing in F1 hybrids using bivoltine and multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. (Lep., Bombycidae) races. *Journal of Entomological Research*, *3*(1), 43-50. (In Persian)

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 277-286

Expression Analysis of Candidate Genes in White and Black Spots of Skin Tissue in Lori Bakhtiari Sheep

Khadijeh Moradi [1], Mustafa Muhaghegh Dolatabady [2*], Javad Habibizad [3]

1- M.Sc. Graduate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
3- Assistance Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj, Yasouj, Iran.
*Corresponding author: mmuhaghegh@yu.ac.ir

Received: 01-08-2023
Revised: 07-10-2023
Accepted: 18-10-2023
Available Online: 18-10-2023

How to cite this article:
Moradi, K., Muhaghegh Dolatabady, M., & Habibizad, J. (2024). Expression analysis of candidate genes in white and black spots of skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 277-286. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

Introduction: Sheep are the main source of wool and its fiber characteristics, such as diameter, length, and color, which are determined by genetics and environmental factors, are key features in the economic value of sheep wool. In sheep, white wool has the highest economic value due to its dyeability. Therefore, identifying the mechanisms responsible for coat color determination is very important from an economic perspective.In general, the coat color is determined based on the amounts and types of melanin produced and released by the melanocytes in the skin tissue (Ito *et al*., 2000). The genetic basis and genes involved in coat color are well understood in rodents, although many of these genes are incorporated in coat color regulation in other species; including Sheep also have a common role. In Iran, the Lori Bakhtiari sheep is one of the most important breeds of sheep in terms of the use of its wool in the textile and carpet industries. In his breed, the dominant coat of the wool is white, although sometimes a percentage of dark brown and pale brown is also observed (Saadat Nouri, M. & Siah Mansour, 1368). However, in this breed, some animals have black spots on their coat, which leads to a decrease in wool quality. Since MC1R, ASIP, KLF4 and MITF genes play an important role in controlling and determining coat color in mammals, the purpose of this study was to investigate the expression of these genes in two phenotypes of white and black spots in the skin tissue of Lori Bakhtiari sheep.

Materials and Methods: Skin samples were obtained from both white and dark parts of 14 white-coated sheep with black spots and total RNA was extracted. The quality and quantity of extracted RNAs were evaluated by agarose gel electrophoresis and spectrophotometer. Extracted RNA samples were exposed to DNase1 enzyme digestion to remove the possible contamination of genomic DNA. Also, the quality of synthesized cDNA was evaluated using 1% agarose gel. In this research, in order to amplify a fragment of the studied genes, using the mRNA sequence of these genes in the GenBank database, appropriate primers were designed by Primer3plus software. To evaluate the relative expression of the target genes, β-actin and GAPDH genes were used as reference genes to normalize the data. Finally, BestKeeper and REST 2009 V2.0.13 software were used for the analysis of gene expression data.

Results and Discussion: Based on the descriptive results of Ct values, MC1R and MITF genes revealed minimum and maximum expression stability among the target genes in skin samples with standard deviations of 1.34 and 3.62, respectively. In addition, the reference genes (β-actin and GAPDH) showed the highest stability among all the studied genes. No significant differences were observed in mRNA levels of MC1R, ASIP, KLF4, and MITF genes in the spotted skin tissue compared to the white part of the skin ($p>0.05$). However, the expression of the ASIP gene was more than 2 times in the spotted part compared to the white skin, but this difference was not significant ($p=0.21$). In addition, the MC1R gene showed minimum expression differences in black spots and white parts of the skin tissue. In addition, the MITF and MC1R genes showed the highest and

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

lowest levels of expression in skin samples of Lori Bakhtiari breed sheep with average Ct of 25.86 and 30.42, respectively. However, among all the studied genes, the lowest mRNA level was observed for the GAPDH gene with an average Ct of 35.96.

Conclusion: Mammalian coat color results from various factors such as the degree and distribution of melanin pigment and the interaction between genotype and environment (B. Li *et al*., 2018). In addition, melanogenesis is a complex process that includes melanocyte growth, melanosome formation, melanin synthesis, melanin transport, and melanosome release (Ito & Wakamatsu, 2011). According to the conducted studies, a large number of genes are involved in the mechanism of coat color determination, but two genes, MC1R and ASIP, play an essential role in the regulation and control of coat color (Searle, 1968). In our study, no significant difference was observed in the expression of MC1R, ASIP, KFL4, and MITF genes in the spotted compared to the white part of the skin tissue in Lori Bakhtiari sheep. These results showed that the development of skin spots is not under the control of the studied genes in Lori Bakhtiari sheep, and genes or other factors can play roles in the creation of dark spots in this breed.

Keywords: Black spot, Coat color, Gene expression, Sheep

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۸۶-۲۷۷

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های کاندیدا در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفند لری بختیاری

خدیجه مرادی[۱]، مصطفی محقق دولت آبادی[۲*]، جواد حبیبی زاد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۷/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶

چکیده

در گوسفندان نژاد لری بختیاری، وجود لکه‌های سیاه بر روی پوست منجر به کاهش کیفیت پشم استحصالی می‌شود. اساس مولکولی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش برخی از دام‌ها از جمله گوسفندان تا حدودی شناسایی شده است. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱ (MC1R)، پروتئین سیگنال‌دهی آگوتی (ASIP)، فاکتور شبه‌کروپل۴ (KLF4)، و فاکتور رونویسی القاکننده ملانوسیت (MITF) در بخش‌های سفید و تیره بافت پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری بود. برای این منظور، از تعداد ۱۴ رأس گوسفند با رنگ پوشش سفید دارای لکه‌های تیره (سیاه)، نمونه پوست از هر دو بخش سفید و تیره تهیه و RNA کل استخراج گردید. برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد نظر، از ژن‌های β-actin و GAPDH به‌عنوان ژن مرجع جهت نرمال کردن داده‌ها استفاده گردید. همچنین، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA موجود برای این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی (GenBank)، آغازگرهای مناسب توسط نرم‌افزار Primer3plus طراحی شدند. در نهایت، از نرم‌افزارهای BestKeeper و REST 2009 V2.0.13 برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن استفاده شد. بر اساس نتایج توصیفی، ژن‌های MC1R وMITF با میانگین ۳۰/۴۲ و ۲۵/۸۶ برای مقادیر Ct، به‌ترتیب کمترین و بیشترین مقدار بیان را در بین ژن‌های هدف در نمونه‌های پوستی داشتند. علاوه‌براین، ژن‌های مرجع (β-actin و GAPDH) بیشترین پایداری بیان را در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه داشتند. تفاوت معنی‌داری در سطوح mRNA ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF در بافت تیره پوست نسبت به بخش سفید پوست مشاهده نشد. اگرچه، بیان ژن ASIP در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست بیش از دو برابر بود، امّا این تفاوت ازنظر آماری معنی‌دار نبود. علاوه‌براین، ژن MC1R کمترین تفاوت بیان را در بخش‌های سیاه و سفید بافت پوست از خود نشان داد. این نتایج نشان می دهد که سطح بیان این چهار ژن مورد مطالعه نقشی در ایجاد لکه‌های پوستی سیاه رنگ در گوسفند نژاد لری بختیاری نداشته باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، رنگ پوشش، گوسفند، لکه سیاه پوست

مقدمه

گوسفندان، مهم‌ترین حیوانات تولیدکننده الیاف در سراسر جهان هستند. قطر، طول و رنگ الیاف از ویژگی‌های کلیدی در ارزش اقتصادی گوسفندان است که توسط ژنتیک و محیط تعیین می‌شود. به‌طور کلی، فاکتورهای تعیین‌کننده رنگ پوشش از نظر اقتصادی از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند. در ایران، یکی از نژادهای مهم گوسفند از نظر کاربرد پشم آن در صنایع نساجی و قالیبافی، گوسفند نژاد لری بختیاری می‌باشد. پوشش غالب پشم این نژاد رنگ سفید می‌باشد، البته گاهی درصدی قهوه‌ای تیره (قنقر) و قهوه‌ای کم‌رنگ نیز مشاهده می‌شود. علاوه‌براین، برخی از گوسفندان این نژاد دارای لکه‌هایی بر روی پوشش خود هستند که از نظر رنگ می‌تواند قهوه‌ای تیره و یا روشن، و در مواردی کم لکه سیاه باشد (Saadat Nouri and Siah Mansour, 1368)، که وجود این لکه‌ها منجر به کاهش کیفیت پشم استحصالی می‌شود. به‌طور کلی، در گوسفند، پشم سفید به‌دلیل توانایی رنگ‌پذیری دارای بالاترین ارزش اقتصادی بوده، در حالی که علاقه به رنگ‌های طبیعی به‌دلیل انقلاب سبز و ترجیح مصرف‌کننده به محصولات طبیعی در حال افزایش است. رنگ پوشش بر اساس مقادیر و انواع ملانین تولید شده و آزاد شده توسط

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mmuhaghegh@yu.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83699.1166

ملانوسیت‌های موجود در پوست تعیین می‌شود (Ito and Wakamatsu, 2008; Ito *et al*., 2000). اساس ژنتیکی و ژن‌های دخیل در رنگ پوشش جوندگان به‌خوبی شناسایی شده است (Slominski *et al*., 2004; Steingrímsson *et al*., 2006)، البته بسیاری از این ژن‌ها در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های دیگر، از جمله گوسفندان نیز نقش مشترکی دارند. به‌عنوان مثال، ژن‌های گیرنده ملانوکورتین-۱[1] (MC1R)، پروتئین سیگنال‌دهی آگوتی[2] (ASIP)، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی رنگ پوشش در موش‌ها شناخته می‌شوند و در گوسفند نیز، ژنوتیپ‌های این ژن‌ها از نظر عملکرد با فنوتیپ‌های متفاوت رنگ پوشش در ارتباط هستند (Gratten *et al*., 2007; Norris and Whan, 2008; Våge *et al*., 1999). با وجود دانش قابل توجه در مورد تنظیم ژنتیکی رنگ پوشش در موش‌ها و شناسایی ژن‌های دخیل در تنظیم رنگ پوشش در گونه‌های تولیدکننده الیاف، تاکنون سازوکارهای مولکولی در سطح بیان ژن، مرتبط با تفاوت‌ها در فنوتیپ رنگ پوشش به‌خوبی شناخته نشده است. این اطلاعات نه تنها به‌منظور افزایش درک اساسی از تنظیم ملانوژنز، بلکه برای شناسایی رویکردهای جدید دارویی و روش‌های ژنتیک مولکولی جهت تنظیم یا انتخاب رنگ پوشش در گونه‌های تولیدکننده الیاف ضروری می‌باشد. از این رو، پروفایل رونویسی یک رویکرد قدرتمند برای شناسایی ژن‌های بیان شده در سطح کلی و عملکردی در بافت‌های مختلف از جمله پوست محسوب می‌شود (Kim *et al*., 2006). در مطالعات اولیه در گوسفند، به‌منظور درک سازوکارهای مولکولی دخیل در تشکیل رنگ پوشش، از تولید برچسب‌های توالی بیان شده[3] (EST) پوست گوسفند و تکنیک تعیین توالی استفاده می‌شد (Hu *et al*., 2009;Fan *et al*., 2011). سپس، با استفاده از فناوری ریزآرایه، تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با لکه‌های سیاه پوست در گوسفندان از جمله نژاد کوریدال بررسی شدند (Peñagaricano *et al*., 2012). امروزه، معمولاً جهت بررسی ژن-های مؤثر در رنگ پوشش گوسفند، به‌ویژه در الیاف و رنگدانه‌های پوشش، از تکنیک RNA-seq استفاده می‌شود. در حال حاضر، اطلاعات محدودی در مورد تفاوت در پروفایل رونویسی پوست مرتبط با رنگ پوشش در گونه‌های مختلف پستانداران در دسترس است. برای بررسی ژن‌هایی که ممکن است نقش مهمی در تنظیم رنگ پوشش در پوست گوسفندان داشته و همچنین افزایش اطلاعات در مورد سازوکارهای مولکولی مسئول بیوشیمی پوست و الیاف (از جمله رنگدانه‌سازی) در حیوانات تولیدکننده پشم مانند گوسفند، بررسی پروفایل رونویسی در پوست گوسفندان با رنگ پوشش سیاه و سفید، می‌تواند اطلاعات بسیار مهمی فراهم کند. نتایج این مطالعات، بینش جدیدی را در مورد تفاوت بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش، از جمله ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر ملانوژنز را در دسترس قرار می-دهد. در مطالعه‌ای بر اساس روش RNA-seq، تعداد ۳۷۷۶۸ ژن بیان شده در پوست گوسفند شناسایی شدند که از این بین، میزان بیان تعداد ۲۲۳۵ ژن در بخش‌های سیاه و سفید گوسفند متفاوت بودند. از این تعداد، ژن شناسایی شده با بیان متفاوت، MC1R، ASIP، DCT، TYR، TYRP1 و MATP مهم‌ترین ژن‌هایی بودند که بیان آن‌ها در بخش‌های سیاه و سفید پوست گوسفند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشتند (Fan *et al*., 2013). از آنجایی که ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF نقش مهمی در کنترل و تعیین رنگ پوشش در پستانداران بر عهده دارند، هدف از انجام این مطالعه، بررسی بیان این ژن‌ها در بخش‌های سفید و تیره پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، نمونه‌های پوست از کشتارگاه دام شهر یاسوج و از حیوانات بالغ نژاد لری بختیاری تهیه گردید تا تغییرات مربوط به سن کاهش یابد. تعداد ۱۴ راس گوسفند نژاد لری بختیاری قبل از کشتار علامت‌گذاری شدند تا بلافاصله پس از کشتار فرآیند نمونه‌برداری بر روی آن‌ها صورت گیرد، به‌طوری‌که از هر گوسفند، یک نمونه از قسمت سفید پوست و یک نمونه از قسمت لکه‌های موجود برداشته شد. پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند و بلافاصله به تانک ازت منتقل گردیدند. استخراج RNA از ۵۰ میکروگرم بافت پوست طبق دستورالعمل کیت استخراج Total RNA (شرکت آزما ژن) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید. برای حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی، نمونه‌های RNA استخراجی در معرض هضم آنزیم DNase1 قرار گرفتند. برای سنتز cDNA از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. همچنین، کیفیت cDNA سنتز شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد ارزیابی شدند. در این تحقیق، جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از توالی mRNA این ژن‌ها در بانک اطلاعاتی GenBank، آغازگرهای مناسب توسط نرم‌افزار Primer3plus طراحی شدند (جدول ۱). در روش تعیین کمّی بیان ژن، تصحیح تغییرات آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از دو ژن کنترل داخلی β-actin و GAPDH به‌عنوان ژن‌های مرجع جهت نرمالیزه کردن داده‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌ها طی واکنش Real Time PCR در دستگاه Bio Rad مدل CFX 96 و با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین بر پایه روش استاندارد نسبی صورت گرفت. برای واکنش

1-Melanocortin 1 receptor (MC1R)
2- Agouti signaling protein (ASIP)
3-Expressed sequence tag (EST)

Real Time PCR از مستر میکس سایبرگرین امپلیکون فراهم شده توسط شرکت آزماژن استفاده شد. برای این منظور، برای هر نمونه در هر میکروتیوب، مقدار پنج میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، یک میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت پنج پیکومول، یک میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت پنج پیکومول، یک میکرولیتر cDNA سنتز شده (۵۰ نانوگرم) و دو میکرولیتر آب عاری از DNase اضافه شد که در کل حجم نهایی هر واکنش به ۱۰ میکرولیتر رسید. همچنین، برای کاهش خطا برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های مورد مطالعه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه،۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه بود که دو مرحله آخر، ۴۰ بار تکرار شدند. همچنین، بلافاصله پس از آخرین چرخه تکثیر، تجزیه و تحلیل منحنی ذوب شروع شد که این فرآیند شامل افزایش دما از ۶۵ درجه سانتی‌گراد به ۹۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش ۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر مرحله بود. در روش Real Time PCR، تکثیر قطعه مورد نظر با تجمع یک سیگنال فلورسنت تشخیص داده می‌شود. مقدار Ct یا چرخه آستانه به‌عنوان تعداد چرخه‌های مورد نیاز برای عبور سیگنال فلورسنت از آستانه (یعنی فراتر از سطح پس زمینه) تعریف می‌شود. در انتهای واکنش RT-PCR، نرم‌افزار دستگاه به‌طور خودکار خط آستانه را رسم و نتایج را به‌صورت چرخه آستانه (Ct) گزارش می‌کند. آمار توصیفی داده‌ها با استفاده از Ctهای به‌دست آمده برای هر ژن سیتوکین توسط برنامه BestKeeper بررسی شدند. نتایج Real-time PCR با برنامه REST, 2009, V2.0.13 برای مقایسه تفاوت بیان ژن‌ها در دو بخش سفید و تیره پوست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرم‌افزار REST یک نرم‌افزاری است که قادر است دو گروه با بیش از ۱۶ نقطه‌ی اطلاعاتی در یک نمونه و ۱۶ نقطه در یک گروه کنترل برای ژن مرجع را مقایسه کند (Pfaffl *et al*., 2002).

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای ژن‌های هدف و مرجع

Table 1- Primers characteristics of target and references genes

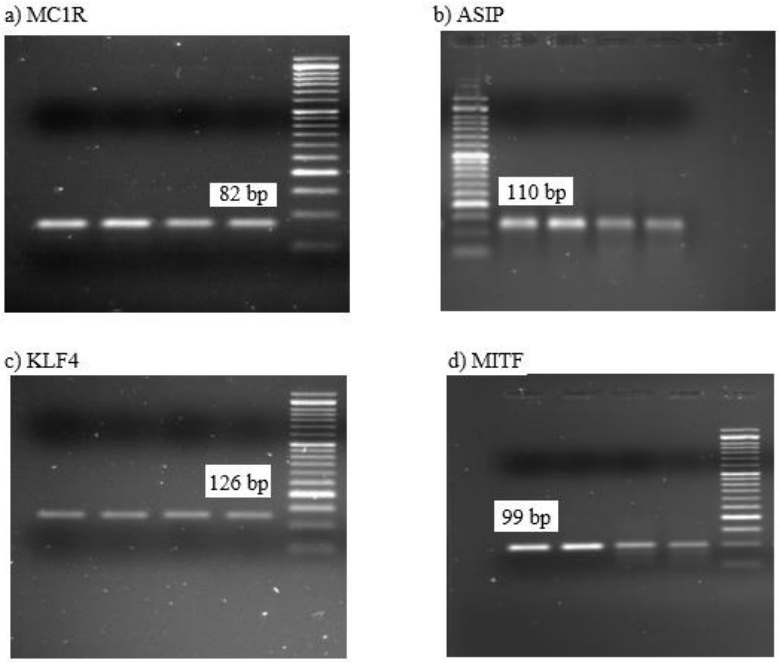
ژن Gene	توالی Sequence	طول قطعه (جفت باز) Length (bp)	شماره دسترسی Accession number
MC1R	F: 5'- CAATCGGACAGGGCCCCAGTGC -3' R: 5'- TGAGGGCCAGGAAGAGGTTGAAGT -3'	82	NM_001282528.1
ASIP	F: 5'-GATTTCCCTTCTGTCTCTATCGTGG-3' R: 5'-TTCTTCATCGGAGCCTTTCTCTTG-3'	110	NM_001134303.1
KLF4	F: 5'-CGACCTGGAGAGTGGAGGAG-3' R: 5'-GACAGCGAGTTGGAGAGGATAAAG-3'	126	NM_001164219
MITF	F: 5'-ATGGACGATACCCTTTCTCCTGTTG-3' R: 5'-GCTCATACTGCTCCTTCGGCT-3'	99	JN208147.1
β-actin	F: 5'- CAATGTGGCCGAGGACTTTGAC-3' R: 5'- CTTAGAGAGAAGGAGGGTGGCTTT-3'	125	NM_001009784.3
GAPDH	F: 5'- AGGAGCACGAGAGGAAGAGAGAG-3' R: 5'- GATGGAAATGTATGGAGGTCGGGAG-3'	96	NM_001190390.1

نتایج و بحث

جهت تأیید اندازه قطعات تکثیر شده، محصولات روی ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر ۵۰ جفت باز الکتروفورز شدند (شکل ۱). اندازه قطعات تکثیر شده برای ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF به‌ترتیب ۸۲، ۱۱۰، ۱۲۶ و ۹۹ جفت باز بود که بیانگر صحت قطعات تکثیر یافته برای هر ژن است. داده‌های توصیفی حاصل از نرم‌افزار BestKeeper برای مقادیر Ct ژن‌های هدف و مرجع در جدول ۲ آمده است. یکی از مهم‌ترین اطلاعات این جدول، مقادیر انحراف معیار برای داده‌های Ct هر ژن است، به‌طوری‌که در بین ژن-های هدف دو ژن MC1R و MITF به‌ترتیب با انحراف معیارهای ۱/۳۴ و ۳/۶۲ دارای حداقل و حداکثر پراکندگی بیان در نمونه‌های پوست بودند. از آنجایی که در ژن‌های مرجع، هر چه پایداری ژن در نمونه‌های کنترل و تیمار بیشتر باشد، ژن مناسب‌تری برای نرمال کردن مقادیر Ct محسوب می‌شود، بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، هردو ژن β-actin و GAPDH دارای بالاترین پایداری در بین همه ژن‌های مورد بودند (شکل ۲).

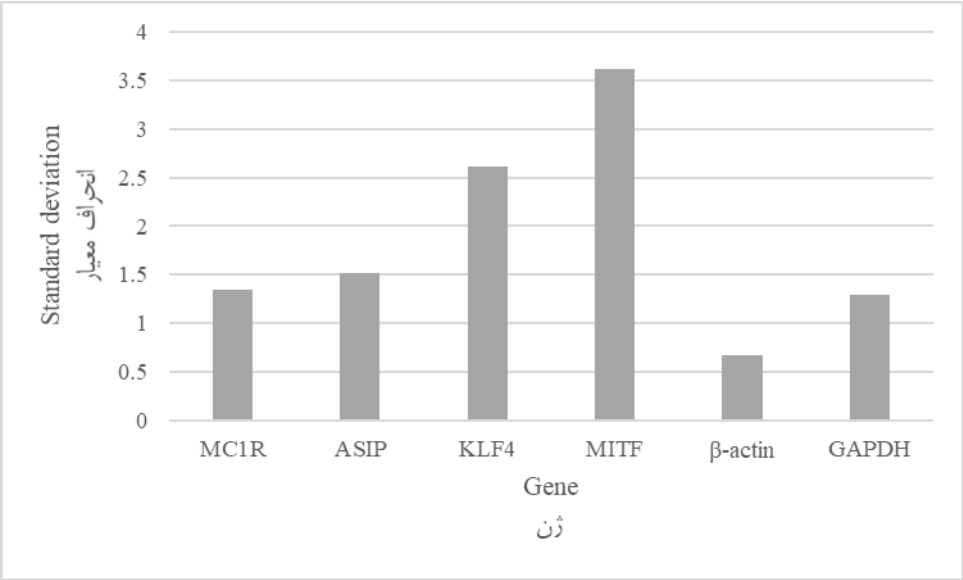
از آنجایی که مقدار چرخه آستانه (Ct) رابطه معکوسی با سطح بیان نسبی ژن در بافت مورد نظر دارد، ژن‌های MITF و MC1R به‌ترتیب با میانگین چرخه آستانه ۲۵/۸۶ و ۳۰/۴۲ دارای بیشترین و کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست گوسفند نژاد لری بختیاری بودند. البته، در بین تمام ژن‌های مورد مطالعه، ژن GAPDH با میانگین چرخه آستانه ۳۵/۹۶ کمترین میزان بیان در نمونه‌های پوست را نشان داد. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در بخش‌های تیره و سفید پوست در شکل ۳ آمده است. همان‌طور که در شکل مشخص شده، ژن‌های ASIP و MC1R به‌ترتیب دارای حداکثر و حداقل تفاوت بیان در بخش سیاه نسبت به بخش سفید پوست را دارا می-

باشند. البته از نظر آماری تفاوت بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت تیره نسبت به بافت سفید پوست در گوسفندان نژاد لری بختیاری معنی‌دار نبود (p>0.05)، به‌طوری‌که مقادیر p برای مقایسه بیان ژن‌های MC1R، ASIP، KLF4 و MITF در قسمت تیره نسبت به بخش سفید پوست به‌ترتیب ۰/۸۳، ۰/۲۱، ۰/۷۶ و ۰/۶۰ بودند.



شکل ۱– قطعات تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌همراه نشانگر ۵۰ جفت باز

Figure 1– Amplified fragments using specific primers along with 50 bp ladder



شکل ۲– میزان پراکندگی بیان ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های پوستی بر اساس انحراف معیار

Figure 2- The expression distribution of the studied genes in skin samples based on standard deviation (SD)

رنگ پوشش پستانداران محصول چندین عامل از جمله درجه و توزیع رنگدانه ملانین و همچنین برهم‌کنش بین ژنوتیپ و محیط است (Li *et al*., 2018). علاوه‌براین، ملانوژنز فرآیندی پیچیده بوده که شامل رشد ملانوسیت، تشکیل ملانوزوم، سنتز ملانین، انتقال ملانین و آزادسازی ملانوزوم می‌باشد (Ito and Wakamatsu, 2011). بر اساس مطالعات انجام شده، تعداد زیادی ژن در سازوکار

تعیین رنگ پوشش دخالت دارند، ولی دو ژن MC1R و ASIP نقش اساسی در تنظیم وکنترل رنگ پوشش بر عهده دارند (Searle, 1968). علاوه‌بر این دو ژن، ژن‌های دیگری مانند فاکتور رونویسی القاکننده ملانوسیت (MITF) و فاکتور شبه کروپل ۴ (KLF4)، در تعیین رنگ پوشش نقش مؤثری دارند (Bellei *et al.*, 2012). به‌طور کلی در پستانداران، نوع رنگدانه تولید شده و رنگ پوشش توسط سیگنال رسانی MC1R کنترل می‌شود. در این فرآیند، MC1R به دو لیگاند α-MSH و ASIP پاسخ می‌دهد. α-MSH به‌عنوان آگونیست MC1R با افزایش سطح cAMP داخل سلولی و فعال کردن فاکتورهای رونویسی مختلف از جمله فاکتور رونویسی MITF، منجر به تشکیل یوملانین می‌شود (Levy *et al.*, 2006).

از طرف دیگر، تعامل MC1R با ASIP با کاهش سطح cAMP باعث تولید فوملانین در سلول خواهد شد. در ملانوزوم‌ها نیز، بیان ژن‌های مرتبط با رنگدانه به‌طور خاص پروتئین‌های ۱ و ۲ مرتبط به تیروزیناز (TRP1 و TRP2) توسط فاکتور رونویسی MITF تنظیم می‌شوند (Bellei *et al.*, 2012). همچنین، فاکتور شبه کروپل۴ (KLF4) یک فاکتور رونویسی می‌باشد که در سلول‌های تمایز یافته نهایی روده و پوست بیان می‌شود (Segre *et al.*, 1999). این فاکتور در تمایز سلول‌های اپیتلیال (Chen *et al.*, 2020)، برنامه‌ریزی مجدد فیبروبلاست‌ها (Takahashi *et al.*, 2007) و ملانوسیت‌ها نقش اساسی دارد (Utikal *et al.*, 2009).

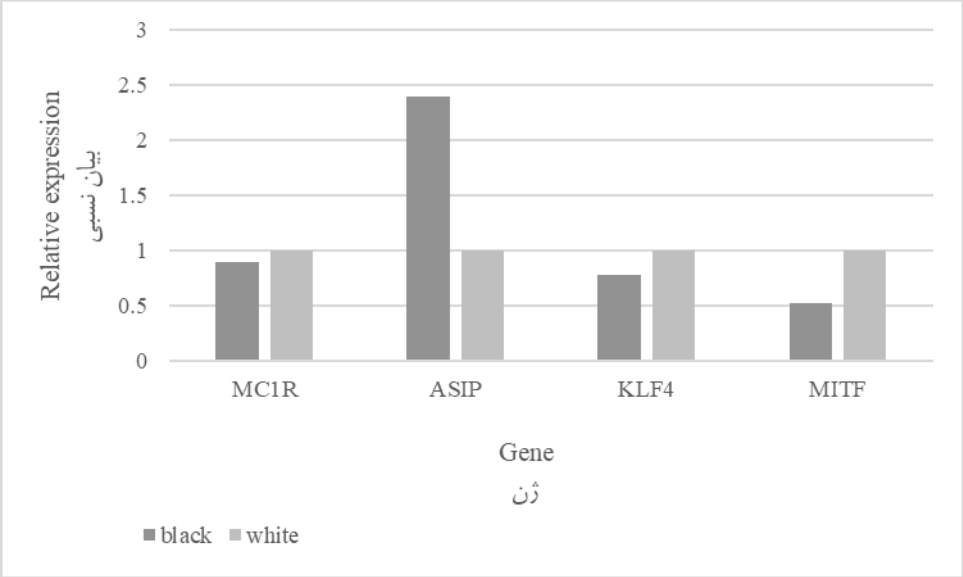
جدول ۲- آمار توصیفی مقادیر Ct برای ژن‌های مورد مطالعه

Table 2- Descriptive statistics of Ct values for the studied genes

	MC1R	ASIP	KLF4	MITF	β-actin	GAPDH
تعداد N	28	28	28	28	28	28
میانگین جغرافیایی [Ct] Geo Mean [Ct]	30.35	27.76	28.80	25.52	29.81	35.92
میانگین حسابی [Ct] Ar Mean [Ct]	30.42	27.85	28.97	25.86	29.82	35.96
حداقل [Ct] Min [Ct]	24.66	20.07	22.32	19.13	27.18	32.17
حداکثر [Ct] Max [Ct]	32.06	30.95	34.82	30.99	31.01	39.63
انحراف معیار [± Ct] Std dev [± Ct]	1.34	1.52	2.61	3.62	0.67	1.29
ضریب تغییر [% Ct] CV [% Ct]	4.41	5.47	9.02	14.00	2.24	3.59

در این مطالعه، بیان چهار ژن (MC1R، ASIP، KFL4 و MITF) دخیل در تعیین رنگ پوشش، در بخش تیره پوست نسبت به بافت سفید پوست در گوسفند نژاد لری بختیاری تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد. مطالعات متعددی ارتباط بیان ژن‌های مرتبط با رنگ پوشش در دام‌های متفاوت اهلی را بررسی و گزارش کرده‌اند. برای مثال، در مطالعه‌ای در گوسفند قزاقستانی، سطح بیان MC1R در پوست سیاه به‌طور قابل توجهی با موهای سفید و موهای قهوه‌ای متفاوت بود، در حالی که بیان ژن ASIP با موهای با رنگ مختلف ارتباطی نداشت (Li *et al.*, 2013)، در مطالعه دیگری بر روی گوسفند زالدا، نتایج متناقضی در بررسی تفاوت بیان ژن ASIP در گوسفندان با پوشش سیاه رنگ و سفید مشاهده شد، به‌طوری‌که سطح بیان ASIP در گوسفند نژاد زالدا با رنگ پوشش سیاه به‌طور قابل توجهی کمتر از سطوح ارزیابی شده در پوشش سفید رنگ بود (Royo *et al.*, 2008).

در مطالعه‌ای بر روی گوسفند مرینوس، تغییر در سطح بیان ژن ASIP منجر به ایجاد فنوتیپ‌های سفید غالب و یا سیاه مغلوب می‌شود (Norris and Whan, 2008). در تحقیق انجام شده بر روی گوسفند تبتی، هر دو سطح mRNA و پروتئین MITF در هر دو بافت پوست سیاه و بافت لکه سیاه در مقایسه با بافت سفید رنگ پوست به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. علاوه‌براین، بیان mRNA و پروتئین KIT بین بافت پوست سفید و سیاه متفاوت بود (Han *et al.*, 2015). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های ASIP، MC1R و C-KIT، بین بخش سفید و تیره پوست در گوسفند کوریدال مشاهده نشد. البته، ژن‌های C-FOS، KLF4 و UFC1، بیان متفاوتی را در بخش سیاه از خود نشان دادند که بیانگر نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد لکه‌های سیاه در پوست گوسفند کوریدال می‌باشد (Peñagaricano *et al.*, 2012).



شکل ۳- بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بخش لکه دار و سفید پوست

Figure 3- The relative expression of the studied genes in the spotted and white part of the skin

با استفاده از فناوری تراشه ژنی مشخص گردید که سطوح بیانی ژن KLF4 در پوست تیره به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از پوست روشن در گوسفند نژاد کوریدال است (Peñagaricano *et al.*, 2012) که نشان می‌دهد این ژن با تشکیل رنگدانه مرتبط بوده، ولی عملکرد آن ناشناخته است. همچنین، بیان متفاوت KLF4 در سطوح RNA و پروتئین در رنگ‌های مختلف پوشش گوسفند گزارش شد (Qin *et al.*, 2022). در این مطالعه با تیره شدن رنگ پوشش، بیان mRNA ژن KLF4 افزایش یافت و سطح پروتئین KLF4 نیز روند مشابهی را نشان داد، به‌طوری‌که نمونه‌های پوست گوسفند با پوشش سیاه حاوی بالاترین سطح KLF4 بودند (Qin *et al.*, 2022). بیان متفاوتی از ژن‌های SLC45A2 و GPR143 در پوست گوسفند با رنگ‌های مختلف پوشش گزارش شده است (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). ژن GPR143 یک گیرنده جفت شده با پروتئین G اختصاصی، رنگدانه GPCR را کد می‌کند که به‌صورت درون سلولی در ملانوزوم‌ها قرار دارد، جایی که بیوژنز ملانوزوم و اندازه اندامک‌ها را در سلول‌های رنگدانه تنظیم می‌کند (De Filippo *et al.*, 2017). ژن SLC45A2 پروتئین ناقل مرتبط با غشا (MATP) را کد می‌کند که سنتز ملانین را از طریق انتقال تیروزیناز و انتقال پروتون به ملانوزوم‌ها تعدیل می‌کند (de Aguiar *et al.*, 2017). در مطالعه رنگ پوشش در بزهای پشمینا، افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ASIP، KIT، KITLG و MITF در بخش سفید پوست گزارش گردید. همچنین، بیان ژن ASIP در رنگ پوشش سفید و قهوه‌ای بزهای پشمینا در مقایسه با رنگ پوشش سیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. از طرف دیگر، در این مطالعه، بیان α-MSH و MC1R در رنگ‌های مختلف پوشش از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشتند (Bhat *et al.*, 2019). علاوه‌بر تفاوت در میزان بیان ژن‌های دخیل در تعیین رنگ پوشش، جهش در این ژن‌ها نیز می‌تواند مکانیسمی در تفاوت رنگ پوشش قلمداد گردد. برای مثال، جهش‌های عملکردی ژن MC1R که باعث ایجاد تنوع در رنگ پوشش می‌شود، در حیوانات اهلی، مانند گوسفند (Fontanesi *et al.*, 2011; Våge *et al.*, 1999) و بز (Fontanesi *et al.*, 2009) توصیف شده است. در مطالعه‌ای بر روی چندین گوسفند نژاد غرب آفریقا، برای چگونگی انتقال لکه‌های تیره به نسل آینده، میزان مشارکت آلل‌های ژن‌های MC1R و ASIP در هر فنوتیپ مشخص شد و چنین نتیجه‌گیری شد که آلل E^D ژن MC1R عامل رنگ تیره بوده و در حیوانات با رنگ سفید آلل وحشی این ژن وجود دارد. به همین دلیل، لکه‌داری این نژاد به‌طور جزئی به ژن MC1R نسبت داده می‌شود (Traoré *et al.*, 2012). در نژاد گوسفند پرامنکا مشخص شده است که فقدان آلل غالب ژن ASIP منجر به ایجاد یک فنوتیپ کاملاً سیاه می‌شود، در حالی که در حضور یک نسخه آلل از این ژن فنوتیپ سفید مشاهده خواهد شد (Fontanesi *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، شناسایی ژن‌های دخیل در ایجاد لکه‌های تیره پوست در گوسفند امکان تشخیص مکانیسم‌های مولکولی دخیل در این فرآیند را فراهم کرده و از این رو، درک بیولوژی ملانوسیت و رنگدانه‌های پوست افزایش می‌یابد. در گوسفند، درک این پدیده اولین

قدم به‌سمت توسعه و استفاده از ابزارهای مولکولی برای کمک به انتخاب در برابر حضور الیاف رنگی در پشم سفید است. در مطالعه حاضر، مقایسه بیان ژن‌های MC1R، ASIP، KFL4 و MITF در بخش تیره پوست گوسفندان لری بختیاری نسبت به بخش سفید پوست تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اگرچه ژن ASIP در بخش تیره در مقایسه با بخش سفید پوست، بیانی بیش از دو برابری داشت، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود (p=0.21). این نتایج نشان می‌دهد که ایجاد لکه‌های پوست در گوسفند لری بختیاری در کنترل ژن‌های مورد مطالعه نبوده و ژن‌ها و یا عوامل دیگری می‌توانند در ایجاد این لکه‌ها نقش داشته باشند که شناسایی آن‌ها نیازمند مطالعات بیشتری است.

References

1. Bellei, B., Pitisci, A., Izzo, E., & Picardo, M. (2012). Inhibition of melanogenesis by the pyridinyl imidazole class of compounds: Possible involvement of the Wnt/β-catenin signaling pathway. *PLoS One*, *7*(3), e33021. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033021
2. Bhat, B., Singh, A., Iqbal, Z., Kaushik, J. K., Rao, A., Ahmad, S. M., Bhat, H., Ayaz, A., Sheikh, F.D., Kalra, S., & Kalra, S. (2019). Comparative transcriptome analysis reveals the genetic basis of coat color variation in Pashmina goat. *Scientific Reports*, *9*(1), 6361. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42676-y
3. Chen, T., Zhao, B., Liu, Y., Zhao, Y., Wang, H., Fan, R., Wang, P., & Dong, C. (2016). Expression and localization of GPR143 in sheep skin. *Yi Chuan= Hereditas*, *38*(7), 658-665. https://doi.org/10.16288/j.yczz.16-068
4. Chen, Z., Gao, Y., Gao, S., Song, D., & Feng, Y. (2020). MiR-135b-5p promotes viability, proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by targeting Krüppel-like factor 4 (KLF4). *Archives of Medical Science*, *16*(1), 167-176. https://doi.org/10.5114/aoms.2019.87761
5. de Aguiar Fracasso, N. C., de Andrade, E. S., Wiezel, C. E. V., Andrade, C. C. F., Zanao, L. R., da Silva, M. S., Marano, L. A., Donadi, E. A., Castelli, E. C., Simoes, A. L., & Simoes, A. L. (2017). Haplotypes from the SLC45A2 gene are associated with the presence of freckles and eye, hair and skin pigmentation in Brazil. *Legal Medicine*, *25*, 43-51. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2016.12.013
6. De Filippo, E., Manga, P., & Schiedel, A. C. (2017). Identification of novel G protein–coupled receptor 143 ligands as pharmacologic tools for investigating X-linked ocular albinism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *58*(7), 3118-3126. https://doi.org/10.1167/iovs.16-21128
7. Fan, R., Dong, Y., Cao, J., Bai, R., Zhu, Z., Li, P., Zhang, J., He, X., Lü, L., Yao, J., & Yao, J. (2011). Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *Animal*, *5*(8), 1157-1161. https://doi.org/10.1017/S1751731111000280
8. Fan, R., Xie, J., Bai, J., Wang, H., Tian, X., Bai, R., Jia, X., Yang, L., Song, Y., Herrid, M., & Herrid, M. (2013). Skin transcriptome profiles associated with coat color in sheep. *BMC Genomics*, *14*(1), 1-12. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/389
9. Fontanesi, L., Beretti, F., Riggio, V., Dall'Olio, S., González, E. G., Finocchiaro, R., Davoli, R., Russo, V., & Portolano, B. (2009). Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: Association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC Genetics*, *10*(1), 1-12. https://bmcgenomdata.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-10-47
10. Fontanesi, L., Dall'Olio, S., Beretti, F., Portolano, B., & Russo, V. (2011). Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signalling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. *Animal*, *5*(1), 8-17. https://doi.org/10.1017/S1751731110001382
11. Gratten, J., Beraldi, D., Lowder, B., McRae, A., Visscher, P., Pemberton, J., & Slate, J. (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1610), 619-626. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3762
12. Han, J. L., Min, Y., Guo, T. T., Yue, Y. J., Liu, J. B., Niu, C. E., Wang, C. F., & Yang, B. H. (2015). Molecular characterization of two candidate genes associated with coat color in Tibetan sheep (Ovis arise). *Journal of Integrative Agriculture*, *14*(7), 1390-1397. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60928-X
13. Hu, X., Gao, Y., Feng, C., Liu, Q., Wang, X., Du, Z., Wang, Q., & Li, N. (2009). Advanced technologies for genomic analysis in farm animals and its application for QTL mapping. *Genetica*, *136*(2), 371-386. https://doi.org/10.1007/s10709-008-9338-7
14. Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis-pivotal roles of dopaquinone. photochemistry and photobiology, *84*(3), 582-592. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x
15. Ito, S., & Wakamatsu, K. (2011). Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(1), 63-74. https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00755.x

16. Ito, S., Wakamatsu, K., & Ozeki, H. (2000). Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Research, 13*, 103-109. https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.19.x
17. Kim, T. H., Kim, N. S., Lim, D., Lee, K. T., Oh, J. H., Park, H. S., Jang, G. W., Kim, H. Y., Jeon, M., Choi, B. H., & Choi, B. H. (2006). Generation and analysis of large-scale expressed sequence tags (ESTs) from a full-length enriched cDNA library of porcine backfat tissue. *BMC Genomics, 7*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-36
18. Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine, 12*(9), 406-414. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008
19. Li, B., He, X., Zhao, Y., Bai, D., Shiraigo, W., Zhao, Q., & Manglai, D. (2018). Regulatory pathway analysis of coat color genes in Mongolian horses. *Hereditas, 155*, 1-10. https://doi.org/10.1186/s41065-017-0048-y
20. Li, H., Zeng, X., Zhang, W., Zhao, H., Hui, W., Liu, G., Luo, Y., Ban, Q., Zhao, Z. S., & Jia, B. (2013). Analysis of the relationship between polymorphism/mRNA expression levels of MC1R and ASIP and coat color phenotype in Kazakh sheep. *Acta Vet Et Zootech Sin, 44*(3), 366-375. http://www.xmsyxb.com/EN/Y2013/V44/I3/366
21. Norris, B. J., & Whan, V. A. (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Research, 18*(8), 1282-1293. https://doi.org/10.1101/gr.072090.107
22. Peñagaricano, F., Zorrilla, P., Naya, H., Robello, C., & Urioste, J. I. (2012a). Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep. *Journal of Applied Genetics, 53*, 99-106. https://doi.org/10/1997/s13353-011-0066-9
23. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research, 30*(9), e36-e36. https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36
24. Qin, H., Chen, Y., Wang, S., Ge, S., & Pang, Q. (2022). The role of KLF4 in melanogenesis and homeostasis in sheep melanocytes. *Acta Histochemica, 124*(1), 151839. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151839
25. Royo, L. J., Alvarez, I., Arranz, J., Fernández, I., Rodríguez, A., Pérez-Pardal, L., & Goyache, F. (2008). Differences in the expression of the ASIP gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: Evidence from the rare Xalda sheep breed. *Animal Genetics, 39*(3), 290-293. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01712.x
26. Saadat Nouri, M., & Siah Mansour, P. (1368). Principles of maintenance and raising sheep. Fourth edition, Tehran, Farhang Publications. Iran. (In Persian)
27. Searle, A. G. (1968). Comparative genetics of coat colour in mammals. *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals.* London, Logos Press Ltd.
28. Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nature Genetics, 22*(4), 356-360.
29. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., & Wortsman, J. (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews, 84*(4), 1155-1228. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2003
30. Steingrímsson, E., Copeland, N. G., & Jenkins, N. A. (2006). Mouse coat color mutations: From fancy mice to functional genomics. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 235*(9), 2401-2411. https://doi.org/10.1002/dvdy.20840
31. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell, 131*(5), 861-872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019
32. Traoré, A., Royo, L., Kaboré, A., Pérez-Pardal, L., Álvarez, I., Fernández, I., Sawadogo, L., Tamboura, H.H., & Goyache, F. (2012). Allelic and genotypic frequencies of ASIP and MC1R genes in four West African sheep populations. *African Journal of Biotechnology, 11*(78), 14287-14291. https://doi.org/10.5897/AJB11.4031
33. Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., & Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *Journal of Cell Science, 122*(19), 3502-3510. https://doi.org/10.1242/jcs.054783
34. Våge, D. I., Klungland, H., Lu, D., & Cone, R. D. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome, 10*(1), 39-43. https://doi.org/10.1007/s003359900939
35. Wang, H., Xue, L., Li, Y., Zhao, B., Chen, T., Liu, Y., Chang, L., & Wang, J. (2016). Distribution and expression of SLC45A2 in the skin of sheep with different coat colors. *Folia Histochemica et Cytobiologica, 54*(3), 143-150. https://doi.org/10.5603/FHC.a2016.0015

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 287-302

Effect of Administration of Acepromazine Combined with Multi vitamin and Amino Acids Complex on Fertility Outcome, Blood Hematological and Biochemical Alterations and the Oxidative Stress Generated by Laparoscopic AI in Ewes

Abbas Farahavar[1*], Hamed Ahmadinejad[2], Daryush Aliour[3] Hasan Aliarabi[4]

1, 2, 3 and 4- Assistant Professor, M.Sc. Graduate, Associated Professor and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: a.farahavar@basu.ac.ir; Farahavar@gmail.com

Received: 03-01-2023
Revised: 28-02-2023
Accepted: 01-03-2023
Available Online: 01-03-2023

How to cite this article:
Farahavar, A., Ahmadinejad, H., Aliour, D., & Aliarabi, H. (2023). Effect of administration of acepromazine combined with multi vitamin and amino acids complex on fertility outcome, blood hematological and biochemical alterations and the oxidative stress generated by laparoscopic AI in ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 287-302. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

Introduction: Farm animals face different types of abiotic stresses due to many management activities. Stress has adverse consequences on the animal's health and welfare. Laparoscopic artificial insemination (LAI) in sheep is also one of the mini surgery activities that associated with the use of sedatives, catching and fettering the animal, the insertion of instruments into the abdomen, and manipulation of the reproductive tract. All these actions are stressful and may impact stress axis, hematological and biochemical alterations, antioxidant status and fertility outcome. The administration of acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex may be a useful strategy for reducing stress in sheep undergoing laparoscopic AI.

Materials and Methods: In this experiment, 50 non-pregnant Afshar breed ewes, aged 3-4 years, with almost the same body weight and score, were used. The estrous cycle of the ewes was synchronized by flurogestone acetate loaded sponges and eCG hormone. At the time of sponge removal, the ewes were divided into two groups (n = 25). All of the ewes, 54 h after sponge removal, were exposed to stress caused by LAI. In the first group (treatment), with sponge removal, each ewe was received 10 ml of the Multiaminoject intramuscularly. Also, 20 min before LAI, in addition to Multiaminoject, each animal also received 0.0834 mg aspromazine (i.v) per kg of body weight. At the same time, the ewes of the second group were injected with physiological saline and were considered as control. Changes in plasma cortisol concentration and its kinetics were measured from zero (20 min before LAI) to 180 min after through serial blood sampling. Changes of hematological and biochemical parameters of jugular vein blood were evaluated 20 min before and 40 min after LAI. The plasma antioxidant status was measured at the times of sponge removal, LAI and 3 days after LAI. The pregnancy rate was recorded by ultrasound at 45 days.

Results and Discussion: Laparoscopic artificial insemination (AI) induced a stress response in the ewes, evidenced by a significant increase in cortisol concentration 20 minutes after the procedure compared to baseline levels ($P< 0.05$). In this study, the injection of acepromazine combined with a multivitamin and amino acid complex did not inhibit cortisol secretion during laparoscopic surgery, leading to the rejection of the research hypothesis. The reason for this discrepancy is related to the type of sedative used to reduce or eliminate pain during surgery. It has been reported that plasma cortisol response is reduced by ketoprofen and completely removed by detomidine. As a result, after LAI, the number of white blood cells and the plasma concentration of malodaldehyde increased and the hematocrit, hemoglobin and total antioxidant capacity decreased ($P< 0.05$), but the concentration of plasma proteins did not change ($P> 0.05$). Acute stressors cause a transient increase in the number of blood cells in the blood circulation. The cause of this phenomenon is the contraction of the spleen due to the stimulation of catecholamines. In addition, with the increase in cortisol secretion, blood cells are released

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

from the bone marrow into the bloodstream. In a study, the use of supplements containing various vitamins and minerals, one week before and one week after laparoscopic surgery, improved the antioxidant status of patients after surgery and the level of plasma malodaldehyde decreased significantly. The reason for not seeing a significant effect on antioxidant parameters in this research may be the type of supplement containing antioxidants and the time of its use before and after surgery. Injection of aspromazine combined with Multiaminoject increased plasma proteins and decreased the level of aspartate aminotransferase enzyme ($P< 0.05$). Stress, depending on its intensity and type, can cause tissue damage and the release of liver enzymes into the blood. Research has shown that transportation stress in pigs leads to increased plasma concentrations of aspartate aminotransferase and creatine kinase. Previous studies have reported the protective effects of vitamin and amino acid supplements in preventing liver damage. The decrease in enzyme concentration after laparoscopy in the treatment receiving aspromazine and multi amino acids may be related to its protective effects. The results of the study showed that there was no significant difference in fertility outcomes between the two groups ($P< 0.05$). The pregnancy rate for the acepromazine and Multiaminoject-treated group was 50%, while the pregnancy rate for the control group was 45%. This result is probably caused by the lack of interference or partial interference of aspromazine with uterine contractions around ovulation and conception.

Conclusion: The authors concluded that acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex, did not have a significant effect on fertility outcome, blood hematological and biochemical alterations and the oxidative stress generated by laparoscopic AI in ewes, but the severity of tissue damage reduce and plasma globulin concentration increase in response to acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex injection. It is important to note that this is just one study and that more research would be needed to confirm these findings.

Keywords: Acepromazine, Antioxidant status, Cortisol, Multiaminoject, Stress

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۰۲-۲۸۷

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند

عباس فرح آور*[۱]، حامد احمدی نژاد[۲] ، داریوش علیپور[۳]، حسن علی عربی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۹
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۱

چکیده

آسپرومازین یک داروی آرام‌بخش است که معمولاً در حیوانات مزرعه‌ای برای کمک به کاهش اضطراب و تنش استفاده می‌شود. همچنین، مکمل‌های حاوی ترکیبی از انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه نیز می‌توانند علاوه‌بر حمایت از سلامت کلی حیوان، به کاهش اثرات منفی تنش کمک نمایند. مطالعات کمی در مورد استفاده از ترکیب آسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر کاهش اثرات تنش القا شده هنگام انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند وجود دارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه یک مکمل تجاری حاوی ترکیبی از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه (مولتی-آمینوجکت) بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند بود. پنجاه راس میش غیر آبستن نژاد افشار با سن ۳-۴ سال، وزن زنده ۵۷/۷۵±۵/۲۴ کیلوگرم و نمره بدنی حدود ۴-۳/۵ توسط اسفنج حاوی فلوجستون استات و هورمون eCG همزمان شدند. برای این منظور، اسفنج به‌مدت ۱۴ روز در واژن میش‌ها قرار داده شد. در روز خارج‌سازی اسفنج به هر راس دام ۵۰۰ واحد بین‌المللی eCG تزریق شد. میش‌ها هنگام خارج‌سازی اسفنج به دو گروه ۲۵ راسی تقسیم و ۵۴ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، تحت تأثیر تنش تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی قرار گرفتند. به میش‌های گروه اول (شاهد) فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. به میش‌های گروه دوم هنگام خارج‌سازی اسفنج، ۱۰ میلی‌لیتر مکمل مولتی‌آمینوجکت (عضلانی) تزریق شد. همچنین، هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی علاوه‌بر مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴میلی‌گرم آسپرومازین به‌ازای هر کیلوگرم وزن زنده (داخل‌رگی) نیز دریافت کرد. تغییرات غلظت کوتیزول پلاسما و کینتیک آن از ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی تا ۱۸۰ دقیقه بعد از آن اندازه‌گیری شد. تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما قبل و بعد از لاپاراسکوپی در خون وداجی ارزیابی و میزان آبستنی در ۴۵ روزگی تعیین شد. غلظت کورتیزول ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه افزایش یافت. متعاقب پاسخ کورتیزول، تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید پلاسما افزایش و هماتوکریت، هموگلوبین و توان آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت، امّا غلظت پروتئین‌های پلاسما تغییر نکرد. میزان آبستنی تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت، اما پروتئین پلاسما افزایش و آنزیم آسپارتات آمینوتراسفراز را کاهش داد. به‌طور کلی، تزریق آسپرومازین به‌همراه مکمل تجاری مولتی‌آمینوجکت هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی تأثیری بر نتیجه باروری و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی پس از لاپاراسکوپی ندارد، امّا با کاهش غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، شدت آسیب بافتی را کاهش و با افزایش غلظت گلبولین پلاسما سامانه ایمنی حیوان را تقویت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آسپرومازین، تنش، کورتیزول، مولتی‌آمینوجکت، وضعیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

حیوانات مزرعه‌ای به‌خاطر بسیاری از فعالیت‌های مدیریتی با انواع مختلف تنش‌های غیرزیستی مواجه هستند. تنش دارای پیامدهای نامطلوب بر وضعیت سلامت و رفاه حیوان است (Yardimci *et al.*, 2013). پاسخ حیوان به تنش نه تنها به ماهیت عوامل تنش‌زا و شدت

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب استادیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: a.farahavar@basu.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

آن بستگی دارد، بلکه به استعداد ذاتی حیوان و خلق‌وخوی آن نیز مرتبط است. کنترل پاسخ تنش در حیوانات مزرعه‌ای این امکان را فراهم می‌کند تا درک بهتری از وضعیت رفاه حیوان داشته باشیم و شرایط نگهداری و پرورش مناسب‌تری را برای بازدهی بیشتر و یا تولید با کیفیت‌تر فراهم نماییم (Grandin, 2021). هنگام تنش، سیستم درون‌ریز تحریک شده و کورتیکواستروئیدهای خون افزایش می‌یابد که پیامد آن تغییر در وضعیت ایمنی، دفاع آنتی‌اکسیدانی، باروری و فراسنجه‌های بیوشیمیایی و هماتولوژیکی است (Arfuso et al., 2022; Damián and Ungerfeld, 2011; Laher, 2014; Önder et al., 2023; Priskas et al., 2022). آرفوسو و همکاران (Arfuso et al., 2022) نشان دادند که پشم چینی در گوسفند باعث کاهش غلظت آلبومین و افزایش پروتئین‌های فاز حاد بویژه گلبولین‌ها می‌شود. دومیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که در قوچ اسپرم‌گیری به‌وسیله الکترواجاکلاتور باعث افزایش غلظت کورتیزول، کاهش تستوسترون، تغییر در تعداد ضربان قلب و فراسنجه‌های هماتولوژیکی و و بیوشیمیایی خون می‌شود. اوندر و همکاران (Önder et al., 2023) نشان دادند که در گوسفند در برنامه‌های تلقیح مصنوعی به‌روش گذار از گردن رحم و انتقال جنین، تلاش برای عبور دادن ابزارهای کمک تولیدمثلی از دهانه رحم باعث افزایش غلظت کورتیزول خون و کاهش توان آنتی‌اکسیدانی می‌گردد.

تلقیح مصنوعی یک ابزار کارآمد برای بهبود ژنتیکی حیوانات است. با این حال، کاربرد آن در گوسفند به‌دلیل نتایج متناقض نسبتاً محدود است، زیرا موفقیت روش به عوامل زیادی بستگی دارد. تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) نسبت به تلقیح مصنوعی به‌روش سنتی دارای برتری است، از جمله افزایش دقت و نرخ لقاح بالاتر دارد (Lone, 2022)، و معایب قابل توجهی نیز دارد که قبل از تصمیم به استفاده از این روش در برنامه‌های پرورش گوسفند باید مورد توجه قرار گیرد. تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی می‌تواند برای گوسفند تنش‌آفرین باشد، زیرا کاربرد این روش مستلزم مقید کردن حیوان، استفاده از داروهای آرام‌بخش، قرار دادن ابزارهای لاپاراسکوپی در داخل محوطه شکمی و دستکاری دستگاه تناسلی است (Stafford et al., 2006). سطح تنش بسته به هر گوسفند، مهارت تکنسین تلقیح، کیفیت آرام‌بخش و مراقبت‌های بعد از تلقیح می‌تواند متفاوت باشد (Small et al., 2021). در شرایط مزرعه، استفاده از آرام‌بخش‌ها، الکترولیت‌ها یا مکمل‌های حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها برای کاستن از اثرات نامطلوب ناشی از انواع مختلف تنش توصیه می‌شود (Ali and Al-Ali et al., 2006; Qarawi, 2002; Danyer et al., 2021). آسپروموازین، یک داروی آرام‌بخش است که معمولاً در دامپزشکی برای کمک به کاهش اضطراب و تنش در حیوانات استفاده می‌شود. مکمل‌های حاوی ترکیبی از انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه نیز می‌تواند به حمایت از سلامت کلی حیوان و کاهش اثرات منفی تنش بر بدن کمک کند (Danyer et al., 2021) اما، در مورد نقش تجویز آسپروموازین همراه با انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه بر پاسخ محور تنش، تغییرات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و نتیجه باروری پس از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی مستندات علمی کمی وجود دارد. براساس فرضیه این پژوهش، تجویز آسپروموازین همراه با انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ممکن است یک راهکار مفید برای کاهش تنش در گوسفندان تحت لاپاروسکوپی باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی تزریق آسپروموازین همراه با یک مکمل تجاری حاوی ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه (مولتی‌آمینوجکت) هنگام LAI بر پاسخ محور تنش، تغییرات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و نتیجه باروری بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و آماده‌سازی حیوانات

در فصل غیر تولیدمثلی پنجاه راس میش غیرآبستن نژاد افشار با سن ۳-۴ سال وزن زنده ۵/۲۴ ±۵۷/۷۵ کیلوگرم و نمره بدنی حدود ۳/۵-۴ انتخاب و در شرایط تغذیه‌ای و مدیریتی مشابه در طول آزمایش نگهداری شدند. برای همزمان‌سازی فحلی از اسفنج آغشته به ۶۰ میلی‌گرم فلوجستون استات (هیپرای اسپانیا) به‌مدت ۱۴ روز و ۵۰۰ واحد بین‌المللی eCG (هیپرای اسپانیا) در زمان خارج‌سازی اسفنج استفاده گردید. همه میش‌ها ۵۴ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، تحت تأثیر تنش ناشی از جراحی لاپاراسکوپی برای انجام تلقیح مصنوعی قرار گرفتند. در گروه اول هنگام خارج‌سازی اسفنج، به هر حیوان ۱۰ میلی‌لیتر از یک مکمل تجاری حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین (مولتی آمینوجکت، رویان دارو، ایران) به‌صورت عضلانی تزریق شد. همچنین هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی، علاوه‌بر دریافت مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴ میلی‌گرم آسپروموازین (به‌شکل آسپروموازین مالات، شرکت Pasteur رومانی) به‌ازای هر کیلوگرم وزن زنده به‌صورت داخل‌رگی دریافت کردند. همزمان به میش‌های گروه دوم سرم فیزیولوژی تزریق و به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ترکیب ویتامینی و اسید آمینه‌ای هر میلی‌لیتر مکمل تزریقی مولتی‌آمینوجکت براساس گزارش شرکت داروسازی مربوطه در جدول ۱ نشان داده شده است.

انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی

قبل از انجام لاپاراسکوپی ابتدا همه میش‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت از آب و خوراک محروم شدند. سپس هر میش بر روی تخت لاپاراسکوپی (کریدل) مقید و پس از ضدعفونی موضع تلقیح، دو سوراخ توسط تروکار در طرفین خط شکمی و نزدیک به پستان ایجاد

و محوطه شکمی توسط گاز CO_2 باز گردید. شاخ‌های رحمی با استفاده از تلسکوپ لاپاراسکوپی (لنز صفر درجه با قطر پنج میلی‌متر ولف، آلمان) متصل به منبع نور سرد (Aesculap، آمریکا) رویت و ۰/۵ میلی‌لیتر منی توسط پیپت تلقیح لاپاراسکوپی آسپیره و به دو بخش تقسیم و هر بخش به یک شاخ رحمی تلقیح گردید. عملیات مهار کردن هر گوسفند و بستن آن روی کریدل، انجام لاپاراسکوپی و آزادسازی آن، کمتر از پنج دقیقه طول کشید.

جدول ۱- ترکیب هر میلی‌لیتر مولتی آمینوجکت (براساس گزارش شرکت تولیدکننده دارو)

Table 1– The composition of each milliliter of multiaminoject (according to the report of the drug manufacturing company)

ویتامین A	۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی	دی پانتنول	۲۵ میلی‌گرم
Vitamin A	15000 IU	D-panthenol	25 mg
ویتامین D_3	۷۵۰۰ واحد بین‌المللی	نیکوتینامید	۵۰ میلی‌گرم
Vitamin D3	7500 IU	Nicotinamide	50 mg
ویتامین E	۲۰ میلی‌گرم	اسیدفولیک	۱۵۰ میکروگرم
Vitamin E	20 mg	Folic Acid	150 µg
ویتامین B_1	۱۰ میلی‌گرم	بیوتین	۱۲۵ میکروگرم
Vitamin B_1	10 mg	Biotin	125 µg
ویتامین B_2	۵ میلی‌گرم	کولین کلراید	۱۲/۵ میلی‌گرم
Vitamin B_2	5 mg	Choline chloride	12.5 mg
ویتامین B_6	۳ میلی‌گرم	اسیدهای آمینه (لیزین، متیونین، آرژنین و گلایسین)	۱۲ میلی‌گرم
Vitamin B_6	3 mg	Amino acids (lysine, methionine, arginine and glycine)	12 mg
ویتامین B_{12}	۶۰ میکروگرم		
Vitamin B_{12}	60 µg		

۱- شرکت داروسازی رویان داور، تهران، ایران

1- Rooyan Darou Pharmaceutical Co. Tehran, Iran

برای تلقیح لاپاراسکوپی از تکنسین کاملاً باتجربه استفاده شد. برای تلقیح از منی تازه انزال شده یک قوچ افشار- بروله که باروری آن قبلا به اثبات رسیده بود استفاده شد. قوچ مورد استفاده در این پژوهش، دو ماه قبل از شروع آزمایش سه ایمپلنت ۱۸ میلی‌گرمی ملاتونین (ریگولین، شرکت Ceva، فرانسه) در زیر گوش آن کاشته شده بود. اسپرم‌گیری با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. منی اخذ شده پس از ارزیابی مقدماتی، توسط رقیق‌کننده بر پایه شیر خشک (DNAbiotech) و پنج درصد زرده تخم مرغ و۵۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۵۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (DNAbiotech) در هر میلی‌لیتر رقیق شد. غلظت نهایی اسپرم برای تلقیح ۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر بود. منی رقیق شده در زمان تلقیح، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بلافاصله تلقیح انجام شد (Fierro *et al.*, 2011).

ارزیابی پاسخ محور تنش

برای بررسی پاسخ محور تنش و خصوصیات پاسخ کورتیزول پس از لاپاراسکوپی، از هر گروه پنج راس میش به‌طور تصادفی جدا و درون باکس‌های انفرادی قرار داده شد. ابتدا ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی، ۱/۵ میلی‌لیتر خون از طریق وردید وداج اخذ و سپس جراحی لاپاراسکوپی برای انجام تلقیح مصنوعی انجام شد. میش‌ها پس از لاپاراسکوپی از کریدل پیاده و به داخل باکس‌های انفرادی هدایت شد. سپس خونگیری‌های سریالی در زمان‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی انجام گردید. خون های اخذ شده به داخل لوله‌های حاوی K_2EDTA تخلیه و پس از سانتریفیوژ و جداسازی پلاسما و تا زمان اندازه‌گیری غلظت کورتیزول در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت کورتیزول پلاسما به‌روش الایزای رقابتی و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (ایده‌آل تشخیص) اندازه‌گیری شد. حداقل میزان قابل اندازه‌گیری برای کوتیزول µg/dl ۰/۴ و مقدار ضریب تغییرات دورن سنجش آن ۴/۵ درصد بود. خصوصیات پاسخ کورتیزول شامل غلظت پایه، غلظت پیک، میزان تغییر نسبت به پایه، طول مدت پاسخ و مساحت زیر منحنی ۰ تا ۹۰ و ۰ تا ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان ملاک پاسخ یکپارچه کورتیزول به‌روش محاسبه مساحت ذوزنقه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون

برای ارزیابی فراسنجه‌های هماتولوژی، ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نمونه خون سیاهرگ وداج به درون لوله‌های حاوی $K_2.EDTA$ جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، درصد هماتوکریت و غلظت

هموگلوبین، MCV و MCH توسط دستگاه سل کانتر اتوماتیک هماتولوژی (Sysmex-KX21N، ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نمونه خون سیاهرگ وداج به درون لوله حاوی ضد انعقاد هپارین و سدیم فلورایـد جمع‌آوری و به‌کمک سانتریفیوژ (OSK ژاپن، با قدرت g ۱۷۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه) پلاسمای آن جدا گردید. پلاسمای تهیه شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در فریز ۲۰- نگهداری شد. غلظت گلوکز پلاسما به‌روش آنزیمی- کالریمتری، پروتئین کل به‌روش فتومتریک بیوره، آلبومین به روش فتومتریک بروم کروزول گرین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز براساس روش توصیه شده IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و علوم آزمایشگاهی) و توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) و به‌کمک دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی آلدهید پلاسما

میزان توان آنتی‌اکسیدانی کل و غلظت مالون دی آلدهید پلاسما در زمان خارج‌سازی اسفنج، ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی و همچنین سه روز بعد از لاپاراسکوپی اندازه‌گیری شد. برای این منظور، نمونه خون سیاهرگ وداج در زمان‌های ذکر شده به داخل لوله حاوی هپارین جمع‌آوری و پلاسمای تهیه شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در فریز ۸۰- نگهداری شد. وضعیت آنتی اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما به‌روش فراپ (Hsieh and Rajashekaraiah, 2021) و غلظت مالون دی-الدهید پلاسما از طریق ارزیابی غلظت ترکیبات واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید (De Leon and Borges, 2020) تعیین شد.

تشخیص آبستنی

آبستنی میش‌ها ۴۵ روز پس از تلقیح لاپاراسکوپی با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی مجهز به پروب کانوکس ۳/۵ مگاهرتز (Sonosite، اسپانیا) به‌روش معاینه شکمی تشخیص داده شد.

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به خصوصیات پاسخ کورتیزول به‌روش آنالیز واریانس و در قالب طرح کاملاً تصادفی و داده‌های مربوط به توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما، غلظت مالون دی آلدهید پلاسما، فراسنجه‌های متابولیکی و هماتولوژی و غلظت کورتیزول در خونگیری‌های سریالی در قالب طرح کاملاً تصادفی با اندازه گیری های تکرار شده در زمان به‌کمک نرم افزار SAS (ورژن ۹/۴) و رویه GLM تجزیه و تحلیل شد. درصد آبستنی در ۴۵ روزگی با استفاده از آزمون کای مربع و رویه Freq و به‌کمک نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید. به‌دلیل احتمال اثرات منفی تنش ناشی از خونگیری های سریالی، داده‌های آبستنی میش‌های جداسازی شده برای تعیین کینتیک کورتیزول پلاسما در آنالیز آماری مورد استفاده قرار نگرفت. اختلاف بین میانگین زمان‌های نمونه‌گیری با استفاده از آزمون دانکن با احتمال خطای کمتر از پنج درصد ($p<۰/۰۵$) مقایسه شد. همچنین از آزمون t- student برای مقایسه بین دو تیمار استفاده گردید.

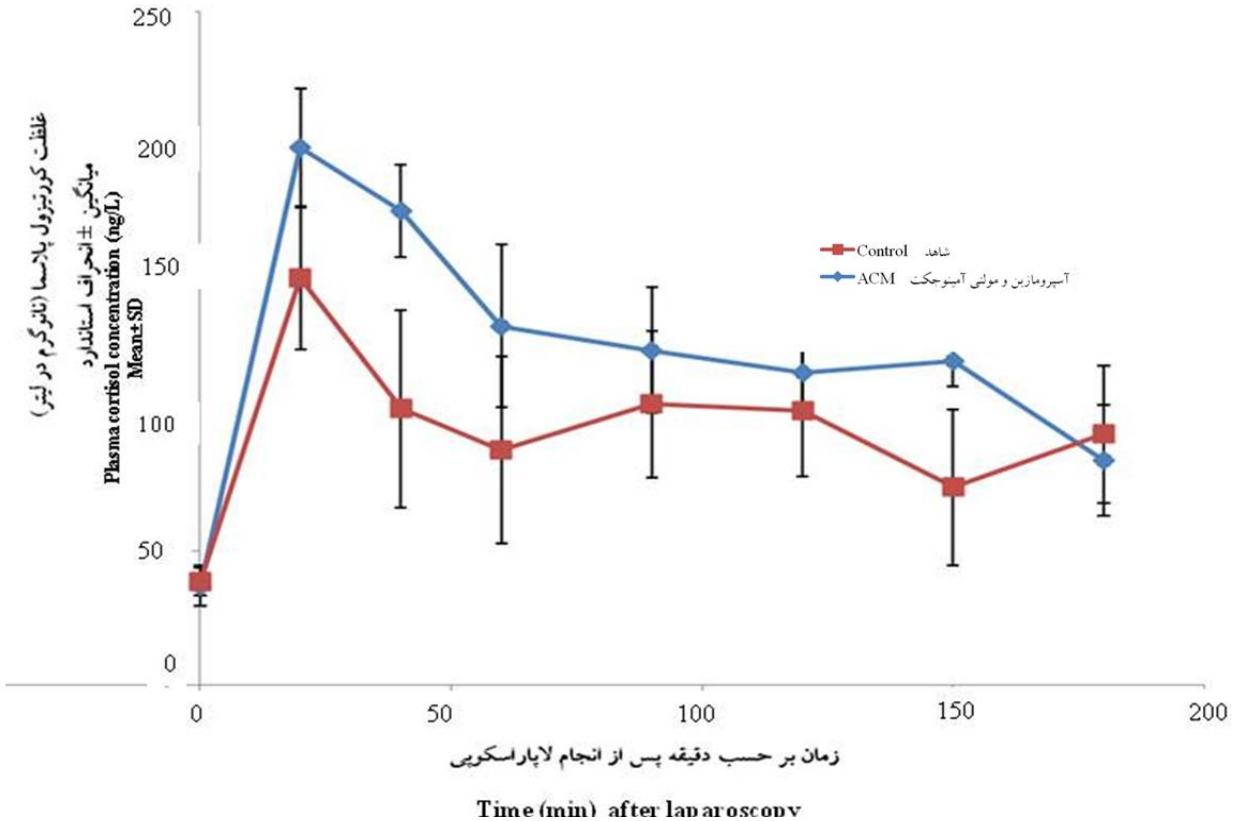
نتایج و بحث

پاسخ محور تنش

نتایج مربوط به تغییرات غلظت کورتیزول پلاسما از ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی تا ۱۸۰ دقیقه بعد از آن در شکل ۱ و کینتیک کورتیزول پلاسما در جدول ۲ نشان داده شده است. غلظت پایه کورتیزول پلاسما بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت. انجام عمل لاپاراسکوپی باعث افزایش غلظت کورتیزول پلاسمای میش‌ها شد، به‌طوری‌که پیک کوتیزول ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی مشاهده گردید و غلظت کوتیزول در این زمان به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه بالاتر بود ($P< ۰/۰۵$).

غلظت کورتیزول در پیک تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت و تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیری بر غلظت کورتیزول در پیک نداشت، امّا از نظر عددی میانگین غلظت کورتیزول در میش های تیمار شده بیشتر از میش‌های گروه شاهد بود. مدت زمان پاسخ و همچنین مساحت زیر منحنی، ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی بین تیمارها تفاوتی نداشت. این نتیجه با نتایج استافورد و همکاران (Stafford *et al.*, 2006) هم‌خوانی داشت. آن‌ها نشان دادند که مقید کردن گوسفند روی کریدل و انجام لاپاراسکوپی باعث افزایش قابل توجه سطح کورتیزول پلاسما می‌گردد و استفاده از آسپرومازین نمی‌تواند ترشح کورتیزول را مهار نماید. همچنین مشابه نتایج این پژوهش در مطالعه‌ای نشان داده شد که در گاوهایی که تحت تنش حمل و نقل قرار داشتند، تزریق آسپرومازین قبل از شروع تنش، غلظت پلاسمایی کورتیزول را نسبت به گاوهای گروه شاهد که فقط سرم فیزیولوژی دریافت کرده بودند، کاهش نداد (Brearley *et al.*, 1990). آماده‌سازی گوسفند برای تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی شامل اقداماتی از قبیل محروم‌سازی آن از آب و خوراک به‌مدت حداقل ۱۸ ساعت قبل از لاپاراسکوپی، گرفتن و مقید کردن حیوان روی تخت لاپاراسکوپی، سوراخ کردن پوست ناحیه شکمی توسط تروکار، تزریق گاز CO_2 به محوطه شکمی و دستکاری اندام-های داخلی به‌منظور یافتن دستگاه تولید مثلی و تلقیح است. همه این اقدامات منابع بالقوه القاء تنش هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی هستند. تنش باعث فعال شدن محور هیپوتالاموس-

هیپوفیز–آدرنال (HPA) می‌شود که نتیجه آن، ترشح کوتیزول و کاته‌کولامین‌ها به داخل خون است. در این پژوهش، تزریق مولتی آمینوجکت به‌همراه آرام‌بخش آسپرومازین نتوانست ترشح کورتیزول را هنگام جراحی لاپاراسکوپی مهار نماید و باعث رد فرضیه این پژوهش گردید. تأثیر آرام‌بخش‌های مختلف بر کاهش سطح تنش و کنترل پاسخ کورتیزول با هم متفاوت است و علت این تناقض به نوع آرام‌بخش مورد استفاده برای کاهش یا رفع احساس درد در هنگام جراحی مربوط است. گزارش شده است که پاسخ کورتیزول پلاسما هنگام استفاده از کتوپروفن کاهش می‌یابد و توسط دتومیدین به‌طور کامل رفع می‌گردد (Stafford *et al.*, 2006).



[1] شاهد: فقط سرم فیزیولوژی تزریق گردید. تیمار ACM (آسپرومازین و مولتی آمینوجکت): هنگام خارج‌سازی اسفنج، به هر حیوان ۱۰میلی‌لیتر مکمل مولتی آمینوجکت (عضلانی) تزریق شد. همچنین، هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی علاوه‌بر مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴میلی‌گرم آسپرومازین به ازای هر کیلوگرم وزن زنده (داخل‌رگی) نیز دریافت کرد. تغییرات غلظت کوتیزول پلاسما در بازه زمانی صفر (۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی) تا ۱۸۰+ (۱۸۰ دقیقه بعد از انجام لاپاراسکوپی) اندازه‌گیری شده است.

[1] Control: received only saline. ACM group: with sponge removal, each ewe was received 10 ml of the Multiaminoject (IM). Also, 20 min before LAI, in addition to Multi Aminoject, each animal received 0.0834 mg Aspromazine (i.v) per kg of body weight. Changes in plasma cortisol concentrations were measured from zero (20 min before LAI) to 180 min after.

شکل ۱– تغییرات غلظت کورتیزول پلاسما در میش‌ها پس از انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه یک مکمل تجاری حاوی مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه (مولتی آمینوجکت).[1]

Figure 1- Changes of plasma cortisol concentration of ewes after performing laparoscopic artificial insemination (LAI) and the effect of Acepromazine combined with a commercial supplement contained multi-vitamins and amino acids (Multi Aminoject). [1]

در مطالعه دیگری، نشان داده شد که زایلازین و دتومیدین باعث کاهش سطح تنش در بزها هنگام انتقال جنین‌های کلون شده به‌روش لاپاراسکوپی می‌گردد (Aghamiri *et al.*, 2022) دتومیدین معمولاً به‌عنوان یک آرام‌بخش برای تسهیل روش‌های جراحی و به‌عنوان یک داروی بیهوشی در اسب استفاده می‌شود. این ماده معمولاً در گوسفند استفاده نمی‌شود، امّا نشان داده شده است که در این گونه حیوانی حالت ضد درد ایجاد می‌کند (Stafford *et al.*, 2006). در این پژوهش، غلظت پلاسمایی کورتیزول در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت به‌طور جزئی (غیر معنی‌دار) بیشتر از شاهد بود. استافورد و همکاران (Stafford *et al.*, 2006) که نشان دادند که تسکین درد با استفاده از آسپرومازین باعث تحریک جزئی محور HPA و افزایش کوتاه‌مدت کورتیزول پلاسما هنگام

لاپاراسکوپی در گوسفند می‌شود. نتایج این پژوهش با نتایج آن‌ها هم‌خوانی داشت. همچنین نشان داده شده است که تزریق آسپرومازین هنگام تنش حمل و نقل، کورتیزول پلاسما را افزایش می‌دهد (Brearley *et al.*, 1990) که با نتیجه این پژوهش مطابقت دارد. علت افزایش کورتیزول پلاسما (هایپرکوتیزولیمیا) پس از تزریق آسپرومازین، به‌مدت اثر این دارو مربوط است. آسپرومازین نسبتاً طولانی اثر بوده و پس از تزریق باعث تحریک ترشح هورمون‌های آدرنالین و آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) می‌شود که می‌تواند باعث افزایش کورتیزول پلاسما گردد (Ali and Al-Qarawi, 2002). نشان داده شده است که تزریق آسپرومازین و همزمان شروع تنش حمل و نقل، کورتیزول پلاسما را بیشتر از زمانی که تنش وجود ندارد افزایش می‌دهد (Brearley *et al.*, 1990).

جدول ۲- کینتیک کورتیزول پلاسما (بر حسب نانوگرم در لیتر) در پاسخ به به انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی و تأثیر استفاده از آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه (مولتی آمینوجکت) بر فراسنجه‌های پاسخ در میش‌های نژاد افشار[1]

Table 2- Plasma cortisol kinetic (ng/L) to perform laparoscopic artificial insemination (LAI) and the effect of administration of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on response parameters in Afshar ewes[1]

تیمارها Treatments	غلظت پایه Basal concentration	غلظت پیک Peak concentration	میزان تغییر (پیک - پایه) Change (peak- Basal)	مساحت زیر منحنی (۹۰-۰)[۲] $AUC_{(0-90)}$[2] (nmol/min/L) $10^3\times$	مساحت زیر منحنی (۱۸۰-۹۰) $AUC_{(0-180)}$ $10^3\times$(nmol/min/L)
شاهد Control	38.65	151.27	112.61	9.21	17.44
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[3]	37.02	199.39	162.37	13.07	23.27
SEM	5.090	23.341	19.712	2.033	3.601
P-value	0.8614	0.1915	0.1208	0.2164	0.2852

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-AUC: مساحت زیر منحنی نمودار کورتیزول است که برای بازه‌های زمانی صفر تا ۹۰ و صفر تا ۱۸۰ محاسبه شده است و به‌عنوان پاسخ یکپارچه کورتیزول در نظر گرفته شده است.

۳-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2- AUC is area under curve for cortisol which is calculated for the time period 0 to 90 and 0 to 180 and considered as integrated cortisol response.3-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject.

علاوه‌بر آرام‌بخش‌ها، تأثیر استفاده از انواع مکمل‌های حاوی الکترولیت‌ها، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه برای مهار ترشح کورتیزول هنگام مواجه با عوامل تنش‌زا در مطالعات مختلف گزارش شده است (Tsuda *et al.*, 2020). استفاده از مکمل‌های حای انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه در مواقع استرس ناشی از واکسیناسیون، حمل و نقل، رطوبت بالا، درجه حرارت بالا، تغییرات ناگهانی درجه حرارت باعث کاهش اثرات نامطلوب تنش می‌گردد (Nayyar and Jindal, 2010). در این پژوهش، استفاده از تزریق همزمان مولتی آمینوجکت با آسپرومازین تأثیری بر مهار ترشح کورتیزول نداشت (جدول ۲). نشان داده شده‌است که گرسنگی کوتاه مدت باعث تخلیه بدن از گلیکوژن و کاهش گلوکز خون می‌شود که باعث تحریک ترشح کورتیزول می‌گردد (Kiyma *et al.*, 2004). همسو با نتایج این پژوهش، گزارش شده‌است که در انسان استفاده از اسیدهای آمینه شاخه‌دار قبل‌از انجام تمرینات ورزشی مقاومتی و طولانی‌مدت پاسخ کورتیزول را تحت تأثیر قرار نداد (Tsuda *et al.*, 2020). در مطالعه دیگری، مصرف مکمل‌های حاوی اسیدهای آمینه شاخه‌دار ضروری و تائورین تأثیر معنی‌داری بر ترشح کورتیزول نداشت (Hoffman *et al.*, 2008). بر خلاف نتایج این پژوهش، در مطالعه‌ای استفاده از آرژنین باعث افزایش متابولیسم لیپید در جوندگان و انسان و حفظ سطح گلوکز خون و گلیکوژن کبد گردید و پیشنهاد گردید که احتمالاً آرژنین می‌تواند باعث مهار ترشح کورتیزول شود (Jobgen *et al.*, McKnight *et al.*, 20102009). توانایی سرکوب ترشح کورتیزول توسط نوع مکمل‌های ویتامینی و اسید آمینه‌ای متفاوت است و بستگی به ترکیب و غلظت آن در هر مکمل دارد. ترکیب اسیدآمینه‌ای مورد استفاده در این پژوهش حاوی لیزین، متیونین، آرژنین و گلایسین بود که می‌تواند علت مغایر بودن نتایج این پژوهش با مطالعات سایر محققین باشد. البته شایان ذکر است که علت عدم تأثیر تزریق مولتی آمینوجکت بر مهار ترشح کورتیزول ممکن است به شدت و نوع عامل تنش زا، نوع و ترکیب اسید آمینه و نوع گونه حیوانی نیز بستگی داشته باشد.

فراسنجه‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات فراسنجه‌های هماتولوژیکی ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۳ نشان داده شده است. تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت گلوکز پلاسما ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نسبت به

۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری بیشتر و درصد هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) کمتر بود (P< ۰/۰۵)، امّا تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیری بر این فراسنجه‌ها نداشت. اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۴ نشان داده شده است. غلظت پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسما ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی تفاوت معنی‌داری با قبل از لاپاراسکوپی نداشت، امّا غلظت فراسنجه‌های ذکر شده در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بیشتر از شاهد بود (P< ۰/۰۵).

گزارش شده‌است که عوامل تنش‌زای حاد باعث افزایش گذرای تعداد سلول‌های خونی در گردش خون می‌شود. این پدیده ناشی از انقباض طحال در اثر تحریک کاته‌کولامین‌هاست. همچنین، هنگام تنش، با میانجی‌گری کورتیزول، یک نوع رهاسازی سلول‌های خونی از مغز استخوان به جریان خون نیز رخ می‌دهد (Arfuso *et al.*, 2023). براساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، برخی از فراسنجه‌های هماتولوژیکی ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری نسبت به قبل از لاپاراسکوپی متفاوت بود (P< ۰/۰۵). در این پژوهش، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی پس از تنش ناشی از لاپاراسکوپی، با یافته‌های مطالعات پیشین همسو بود (Arfuso *et al.*, 2023). گزارش شده است که تنش‌های روانی و همچنین احساس درد، سیستم هماتولوژیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی می‌شود (Ballou *et al.*, 2013). MCH در میش‌ها ۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از عملیات پشم‌چینی تفاوت معنی‌داری با قبل از آن ندارد. همسو با نتایج پژوهش حاضر، علی و همکاران (Ali *et al.*, 2006) نشان دادند که تزریق زایلازین و سدیم بتائین قبل از حمل و نقل تأثیری بر تغییرات هماتولوژیکی رخ داده در اثر تنش حمل و نقل ندارد. علت نتایج متناقض به زمان نمونه‌گیری مربوط است.

جدول ۳- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر تغییرات فراسنجه‌های هماتولوژیک در گوسفندان نژاد افشار[1].

Table 3- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on hematologic parameters alterations in Afshar ewes.[1]

تیمارها Treatments	WBC×(10^3 µl)[2]	RBC×(10^6 µl)[2]	Hct (%)[4]	Hb (g/dl)5[4]	MCV (fl)[6]	MCH (Pg)[7]
شاهد Control	8.70	9.64	31.90	10.38	34.09	11.12
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[8]	8.46	9.75	32.63	10.86	34.99	11.48
SEM	0.563	0.452	1.075	0.375	1.791	0.638
Time						
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	8.04	9.80	34.13	11.58	39.40	13.10
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	9.50	10.11	29.89	9.55	29.71	9.47
SEM	0.480	0.573	1.162	0.341	1.801	0.595
P-value						
Treat	0.8703	0.8554	0.7331	0.6650	0.8967	0.8952
Time	0.0467	0.7021	0.0121	0.0003	0.0005	0.0001
Treat×time	0.2740	0.4313	0.4928	0.4597	0.9765	0.7981

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-WBC: تعداد گلبول‌های سفید خونی (بر حسب تعداد در هر میکرولیتر خون)، ۳-RBC: تعداد گلبول‌های قرمز خونی (بر حسب تعداد در هر میکرولیتر خون)، ۴- Hct: هماتوکریت (بر حسب درصد)، ۵-Hb: غلظت هموگلوبین خون (بر حسب گرم در دسی‌لیتر)، ۶- MCV: حجم متوسط گلبول‌های قرمز (بر حسب فمتولیتر)، ۷- MCH: مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (بر حسب پیکوگرم)، ۸- ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-WBC: white blood cells (cells number per micro liter of blood), 3-RBC: red blood cells (cells number per micro liter of blood), 4-Hct: Hematocrit, 5- Hb: hemoglobin concentration, 6- MCV: mean corpuscular volume (femtolitter), 7- MCH: mean corpuscular hemoglobin (picogram), 8-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject.

در این پژوهش، تیمار آسپروموازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تعداد گلبول‌های سفید خونی را تحت تأثیر قرار نداد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار یاد شده نتواست افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی و افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را مهار کند که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش بالوآ و همکاران (Ballou *et al.*, 2013) مغایرت داشت، آن‌ها نشان دادند که اخته کردن و شاخ‌بری باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی می شود و استفاده از آرام‌بخش افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را مهار می‌کند (Ballou *et al.*, 2013). همسو با این پژوهش، دامیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که اسپرم‌گیری از قوچ با استفاده از الکترواجاکولاتور باعث افزایش گلوکز پلاسما و کاهش هماتوکریت و هموگلوبین می‌شود. علی و همکاران (Ali *et al.*, 2006) نیز نشان دادند که حمل جاده‌ای گوسفند و بز باعث کاهش هماتوکریت و افزایش هموگلوبین می‌گردد. برخلاف یافته این پژوهش، ۴۰ ساعت حمل نقل باعث افزایش درصد هماتوکریت و هموگلوبین در تلیسه‌ها شد (Avila-Jaime *et al.*, 2021). همچنین پارکر و همکاران (Parker *et al.*, 2004) تغییری در درصد هماتوکریت گاوهای گوشتی پس از ۹۰ ساعت محرومیت از آب مشاهده نکردند. آرفوسو و همکاران (Arfuso *et al.*, 2022) نشان دادند که تعداد گلبول‌های سفید خونی، درصد هماتوکریت و هموگلوبین، MCV و باتوجه به گذرا بودن تغییرات هماتولوژیکی ناشی از تنش، ممکن است نمونه گیری‌های دیر هنگام باعث محو شدن تغییرات نسبت به مقادیر پایه گردد (Arfuso *et al.*, 2022). علاوه‌بر آن، درصورت بروز دهیدراتاسیون در حیوان، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین افزایش می‌یابد. بنابراین، تغییرات هماتولوژیکی در مطالعات مختلف به نوع تنش، تفاوت‌های ژنتیکی و شرایط آب و هوایی در حین آزمایش نیز مرتبط است. افزایش مشاهده شده در گلوکز پلاسما ناشی از افزایش ترشح کاته‌کولامین‌ها و کورتیزول پس از لاپاراسکوپی است که منجر به تحریک گلوکونئوژنز و افزایش گلوکز خون می‌گردد (Arfuso *et al.*, 2022).

اثر تزریق آسپروموازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۴ نشان داده شده است. در پاسخ به تنش‌های حاد، واسطه‌های پیش التهابی باعث تحریک پاسخ فاز حاد شده و کبد را وادار به تولید پروتئین‌های فاز حاد می‌کند و غلظت پروتئین‌های پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این پژوهش، غلظت آلبومین، گلوبولین و پروتئین کل تحت تأثیر جراحی لاپاراسکوپی قرار نگرفت (جدول ۴).

همسو با این پژوهش، در مطالعه‌ای در بره‌های مقید شده و محروم از آب و خوراک، غلظت سرمی کورتیزول نسبت به بره‌هایی که تحت تنش نبودند افزایش یافت اما، غلظت سرمی آلبومین و پروتئین کل تحت تأثیر قرار نگرفت (Apple *et al.*, 1993). مغایر با نتایج این پژوهش، تنش ناشی از حمل و نقل جاده‌ای در اسب‌ها باعث افزایش غلظت پروتئین کل گردید (Arfuso *et al.*, 2023). همچنین آرفوسو و همکاران (Arfuso *et al.*, 2022) نشان دادند که پس از پشم چینی در گوسفند غلظت آلبومین خون کاهش و غلظت گلوبولین‌های آلفا و بتا-۲ افزایش می‌یابد. همچنین دامیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تنش الکترواجاکولاتور در قوچ، غلظت پروتئین کل پلاسما افزایش می‌یابد، امّا تغییری در غلظت آلبومین رخ نمی‌دهد. تأثیر عوامل تنش‌زا بر غلظت پلاسمایی پروتئین را نمی‌توان به همه نوع عوامل تنش‌زا تعمیم داد و ممکن است توسط نوع عامل تنش زا و سایر شرایط محیطی تحت تأثیر قرار گیرد. افزایش سرعت انجام تلقیح لاپاراسکوپی توسط تکنسین حرفه‌ای و با تجربه باعث کاهش طول مدت تلقیح شده و ممکن است تغییر برخی فراسنجه‌ها مانند پروتئین‌های پلاسما نسبت به غلظت پایه آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نشود. در این پژوهش، افزایش مشاهده شده در غلظت پروتئین‌های پلاسما ممکن است به‌علت محتوای آسیدآمینه‌ای مکمل مولتی آمینوجکت و تأثیر ویتامین‌ها بر سیستم ایمنی بدن باشد. همسو با این پژوهش، هامان و ابوزینا (Hamam and Abou-Zeina, 2007) نشان دادند که استفاده از ویتامین E در گوسفند باعث افزایش سطح گاماگلوبولین‌ها و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌گردد.

نتایج تأثیر تزریق آسپروموازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت بر غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در جدول ۵ نشان داده شده است. در این پژوهش، اثر متقابل تیمار × زمان گرایش به معنی‌داری داشت (P = ۰/۰۶۶). غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی تفاوت معنی‌داری بین شاهد و تیمار دریافت‌کننده آسپروموازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت نداشت، امّا ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز به‌طور معنی‌داری در تیمار دریافت‌کننده آسپروموازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت کمتر از شاهد بود (P< ۰/۰۵). افزایش غلظت آنزیم‌های کراتین کیناز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز در پلاسما نشان‌دهنده آسیب‌های قلبی و کبدی است. آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در عضلات قلبی، کبد و عضلات اسکلتی وجود دارد، امّا این آنزیم به‌طور عمده در عضلات قلبی متمرکز است (Han *et al.*, 1995). در مطالعه‌ای، نشان داده شد که در خوک‌های مینیاتوری چینی تنش منجر به افزایش غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز می‌شود که نشان می‌دهد، این آنزیم می‌تواند به‌عنوان شاخص تنش مورد استفاده قرار گیرد (Han *et al.*, 1995). تنش بسته به شدت و نوع آن، باعث آسیب و رهاسازی آنزیم‌های بافتی و

کبدی به داخل خون می‌شود. در پژوهشی، نشان داده شد کـه در اثـر تـنش حمـل و نقـل در خـوک غلظـت پلاسـمایی آنـزیم آسـپارتات آمینوترانسفراز و کـراتین کینـاز افـزایش مـی‌یابـد، امّـا آلانـین آمینـو ترانسفراز تغییری نمی‌کند (Yu *et al.*, 2007).

جدول ٤- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسما در گوسفندان نژاد افشار[۱]

Table 4- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multi Aminoject) on alterations of biochemical parameters in Afshar ewes[1].

تیمارها Treatment	گلوکز Glucose (mg/dl)	پروتئین کل Total protein (g/dl)	آلبومین Albumin (g/dl)	گلوبولین Globulin (g/dl)	آسپارتات آمینوترانسفراز (U/L)[2] AST
شاهد Control	87.16	8.05[b]	1.66[b]	6.42[b]	89.32
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[3]	91.29	9.25[a]	1.87[a]	7.38[a]	74.43
SEM	6.086	0.248	0.058	0.198	6.261
Time (زمان)					
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	72.89	8.59	1.73	6.86	81.38
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	106.85	8.80	1.80	7.01	82.37
SEM	4.483	0.261	0.054	0.208	7.222
P-value					
Treat	0.6239	0.0005	0.0053	0.0005	0.1422
Time	0.0001	0.5971	0.4170	0.5971	0.9231
Treat× TIME	0.2621	0.5170	0.2971	0.5170	0.0660

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).
۲-AST: فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (بر حسب واحد در لیتر)،
۳-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).
2-AST: aspartate aminotransferase activity (unit/ litter)
3-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject

جدول ۵- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر غلظت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (AST) قبل و پس از لاپاراسکوپی[۱].

Table 5- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multi Aminoject) on plasma aspartateaminotransferase activity before and after LAI in Afshar ewes[1].

تیمارها Treatments	۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 20 min after laparoscopy
شاهد Control	79.40	99.25[a]
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[2]	83.37	65.50[b]
SEM	10.21	7.452
P- value	0.8009	0.0096

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).
۲-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).
2-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject

در بره‌های مقید شده و محروم از آب و خوراک غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز ۳۰-۲۰ برابر افزایش یافت (Apple *et al.*, 1993) علاوه‌براین، فراسنجه‌های کبدی و کلیوی ممکن است در پاسخ به تزریق انواع مختلف آرام‌بخش‌ها تغییر کنند. نشان داده شده است که تغییر در غلظت آنزیم‌های AST و ALT پلاسما می‌تواند ناشی از اثرات سمی آرام‌بخش بر سلول‌های کبدی و یا تحت تأثیر قرار گرفتن فشار خون کبدی باشد (Dujovne and Zimmerman, 1969) در آزمایشی، غلظت AST پلاسمای خرگوش‌های دریافت‌کننده کتامین-زایلازین، ۱۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق افزایش یافت (Gil *et al.*, 2002). اثرات محافظتی مکمل‌های ویتامینی و آمینواسیدی در جلوگیری از آسیب‌های کبدی در مطالعات پیشین گزارش شده است (Raza *et al.*, 2021). در این پژوهش، کاهش غلظت AST ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت ممکن است به اثرات محافظتی ترکیبات ویتامینی و آمینواسیدی موجود در مکمل مولتی‌آمینوجکت مربوط باشد.

توان آنتی‌اکسیدانی و غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما

نتایج مربوط به اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما و غلظت مالون دی آلدهید در زمان‌های خارج‌سازی اسفنج، ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی و همچنین سه روز پس از آن در جدول ۶ نشان داده شده است. سه روز بعد از لاپاراسکوپی غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما افزایش و توان آنتی‌اکسیدانی کل در هر دو تیمار کاهش یافت (P<۰/۰۵). تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما و غلظت مالون دی آلدهید را تحت تأثیر قرا نداد و همچنین اثر متقابل تیمار × در زمان نیز معنی‌دار نبود. جراحی لاپاراسکوپی از طریق تحریک واکنش‌های التهابی و آندوکرینی، منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود که به نوبه خود ممکن است باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، ایجاد التهاب و چسبندگی پریتونیوم گردد (Laher, 2014).

همسو با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Önder و همکاران (Önder *et al.*, 2023) نشان دادند که در گوسفند در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و انتقال جنین از طریق سرویکس، تلاش برای عبور دادن ابزارهای کمک تولیدمثلی از دهانه رحم باعث افزایش غلظت کورتیزول خون و کاهش توان آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. همچنین، برخی از مطالعات انسانی نشان داده‌اند که جراحی لاپاراسکوپی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) می‌شود (Laher, 2014). رهیافت استفاده از انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها قبل از جراحی لاپاراسکوپی برای جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو در برخی مطالعات پیشنهاد شده است (Yiannakopoulou *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای، استفاده از مکمل‌های حاوی انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی مؤثر بر سیستم آنتی اکسیدانی، یک هفته قبل و یک هفته بعد از جراحی لاپاراسکوپی باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی پس از جراحی در بیماران شد و سطح TBARS پلاسما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Laher, 2014). علت عدم مشاهده اثر معنی‌دار بر فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش ممکن است نوع مکمل حاوی آنتی‌اکسیدان و زمان استفاده از آن قبل و بعد از جراحی باشد.

نرخ آبستنی

نتایج مربوط به اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر نرخ آبستنی در ۴۵ روزگی در جدول ۷ نشان داده شده است. میزان آبستنی در ۴۵ روزگی بین تیمارها تفاوتی نداشت و تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تغییری در نرخ آبستنی ایجاد نکرد. هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی معمولاً استفاده از دو دسته دارو برای تسکین‌بخشی توصیه شده است. دسته اول آلفا-۲ آگونیست‌ها (مانند زایلازین، ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و دسته دوم آرام‌بخش‌ها (مانند آسپرومازین، ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پیشنهاد شده است (Sathe, 2018). استفاده از برخی از آرام‌بخش‌ها و آگونیست‌های آلفا-۲ ممکن است از نظر فیزیولوژیک در برخی از فرایندهای تولیدمثلی مداخله نماید (Sciorsci *et al.*, 2018GibbsIII and Troedsson, 1995; . نشان داده شده است که تزریق زایلازین در اسب‌هایی که دچار آتونی (atony) عضلانی رحم بودند، باعث افزایش انقباضات تتانیک میومتریوم می‌گردد، امّا تزریق آسپرومازین تأثیری بر انقباضات رحمی ندارد (De Lille *et al.*, 2000). در مورد تأثیر تزریق انواع مختلف آرام‌بخش‌ها هنگام تلقیح مصنوعی بر نرخ آبستنی و باروری، مستندات علمی کافی وجود ندارد. با این وجود، باتوجه به اینکه انقباضات رحمی در زمان نزدیک به لقاح نقش مهمی در انتقال تخمک و اسپرم به محل لقاح دارند، ممکن است نوع آرام‌بخش در زمان تلقیح، نرخ لقاح و آبستنی را تحت تأثیر قرار دهد. نتایج نرخ آبستنی در پژوهش حاضر نشان داد که تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیر منفی بر نرخ آبستنی ندارد که این نتیجه احتمالاً ناشی از عدم تداخل و یا تداخل جزئی آسپرومازین با انقباضات رحمی در حوالی تخمک‌ریزی و لقاح است.

جدول ٦- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین (مولتی آمینوجکت) بر توان آنتی‌اکسیدانی کل و غلظت مالون دی آلدهید پلاسما قبل و بعد از لاپاراسکوپی در گوسفندان نژاد افشار[1]

Table 6- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on antioxidant status in before and after AI in Afshar ewes

فراسنجه‌ها Parameters	توان آنتی‌اکسیدانی کل (بر حسب میکرومولار در میلی‌لیتر) Total antioxidant capacity (µmol/ml)	مالون دی آلدهید (بر حسب میکرومولار در میلی‌لیتر) Malondialdehyde (µmol/ml)
تیمارها Treatments		
شاهد Control	241.43	1.41
آسپرومازین و آمینوجکت ACM[2]	253.15	1.35
SEM	8.025	0.062
Time(زمان)		
زمان خارج سازی اسفنج Day of sponge withdrawal	228.49[b]	1.29[b]
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	272.85[a]	1.26[b]
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	256.61[ab]	1.38[ab]
۳ روز بعد از لاپاراسکوپی 3 days after laparoscopy	233.02[b]	1.64[a]
[3]SEM	10.95	0.085
P-value		
Treat	0.3064	0.4921
Time	0.0265	0.0016
Treat × time	0.9553	0.2122

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

۳- SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها است.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject.

3- SEM: standard error of means.

جدول ۷- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر نرخ آبستنی [1]

Table 7- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids complex (Multi Aminoject) on pregnancy rate

مورد Item	Control شاهد	ACM[1] آسپرومازین و مولتی آمینوجکت	*P-value*
تعداد میش‌های تلقیح شده Number of inseminated ewes	20	20	-
تعداد میش‌های آبستن در سونوی ۴۵ روزگی Number of pregnant ewes on d-45	9	10	-
درصد آبستنی در ۴۵ روزگی Percentage of pregnancy on d-45	45.00	50.00	0.7515

۱- ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت

1-ACM: Acepromazine combined with Multi Aminoject.

نتیجه‌گیری کلی

عملیات تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی باعث القاء تنش به گوسفندان شد، به‌طوری‌که ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی غلظت کورتیزول به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه افزایش یافت. متعاقب پاسخ کورتیزول، برخی از فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر قرار گرفت. به‌طوری‌که پس از لاپاراسکوپی تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما افزایش و در هماتوکریت، هموگلوبین و توان آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت، امّا غلظت پروتئین‌های پلاسما تحت تأثیر قرار نگرفت. تزریق مولتی آمینوجکت و آسپرومازین باعث افزایش پروتئین‌های پلاسما و کاهش سطح آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز گردید، امّا میزان آبستنی در ۴۵ روزگی را تحت تأثیر قرار نداد. به‌طور کلی، هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی نیازی به استفاده از آرام‌بخش به‌همراه مولتی آمینوجکت نیست و استفاده از آن ممکن است باعث افزایش هزینه‌های تلقیح و تحمیل استرس اضافی به حیوان گردد و به‌جای آن افزایش سرعت هر تلقیح با بهره‌گیری از تکنسین با تجربه پیشنهاد می‌شود.

References

1. Aghamiri, S. M., Samimi, A. S., Hajian, M., Samimi, A. M., & Oroumieh, A. (2022). Effect of xylazine, detomidine, medetomidine and dexmedetomidine during laparoscopic SCNT embryo transfer on pregnancy rate and some physiological variables in goats. *BMC Veterinary Research, 18*(1), 98. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03194-8
2. Ali, B., Al-Qarawi, A., & Mousa, H. (2006). Stress associated with road transportation in desert sheep and goats, and the effect of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Research in Veterinary Science, 80*(3), 343-348. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.012
3. Ali, B. H., & Al-Qarawi, A. (2002). Evaluation of drugs used in the control of stressful stimuli in domestic animals: A review. *Acta Veterinaria Brno, 71*(2), 205-216.
4. Apple, J., Minton, J., Parsons, K., & Unruh, J. (1993). Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *Journal of Animal Science, 71*(1), 71-77. https://doi.org/10.2527/1993.71171x
5. Arfuso, F., Fazio, F., Chikhi, L., Aymond, G., Piccione, G., & Giannetto, C. (2022). Acute stress response of sheep to shearing procedures: Dynamic change of cortisol concentration and protein electrophoretic pattern. *Animals, 12*(7), 862. https://doi.org/10.3390/ani12070862
6. Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Piccione, G., Fazio, F., Cirincione, R., Cassata, G., & Cicero, L. (2023). Inflammatory-like status and acute stress response in horses after road transport. *Scientific Reports, 13*(1), 9858. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37069-1
7. Avila-Jaime, B., Ramos-Zayas, Y., Franco-Molina, M. A., Alvarado-Avila, R., Zamora-Avila, D. E., Fimbres-Durazo, H., Zárate-Ramos, J. J., & Kawas, J. R. (2021). Effects of transportation stress on complete blood count, blood chemistry, and cytokine gene expression in heifers. *Veterinary Sciences, 8*(10), 231.
8. Ballou, M., Sutherland, M., Brooks, T., Hulbert, L., Davis, B., & Cobb, C. (2013). Administration of anesthetic and analgesic prevent the suppression of many leukocyte responses following surgical castration and physical dehorning. *Veterinary Immunology and Immunopathology, 151*(3-4), 285-293. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.018
9. Brearley, J., Dobson, H., & Jones, R. (1990). Investigations into the effect of two sedatives on the stress response in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 13*(4), 367-377. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00791.x
10. Damián, J., & Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals, 46*(4), 646-650. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01722.x
11. Danyer, E., Bilal, T., Altiner, A., Aytekin, İ., & Atalay, H. (2021). The effect of vitamin E treatment on selected immune and oxidative parameters in Kivircik ewes suffering from transport stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 105*, 34-41. https://doi.org/10.1111/jpn.13560
12. De Leon, J. A. D., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (159), e61122. https://doi.org/10.3791/61122
13. De Lille, A., Silvers, M., Cadario, M., Tran, T., Cage, C., & LeBlanc, M. (2000). Interactions of xylazine and acepromazine with oxytocin and the effects of these interactions on intrauterine pressure in normal mares and mares with delayed uterine clearance. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, (56), 373-379.
14. Dujovne, C. A., & Zimmerman, H. J. (1969). Cytotoxicity of phenothiazines on Chang liver cells as measured by enzyme leakage. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 131*(2), 583-587. https://doi.org/10.3181/00379727-131-33931
15. Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., & Viñoles, C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian

follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology, 76*(4), 630-639. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.016
16. GibbsIII, H. M., & Troedsson, M. H. (1995). Effect of acepromazine, detomidine, and xylazine on myometrial activity in the mare. *Biology of Reproduction, 52*(monograph_series1), 489-493. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.489
17. Gil, A. G., Illera, J. C., Silván, G., Lorenzo, P. L., & Illera, M. (2002). Changes in hepatic and renal enzyme concentrations and heart and respiratory rates in new zealand white rabbits after anesthetic treatments. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 41*(6), 30-32.
18. Grandin, T. (2021). How to improve livestock handling and reduce stress. *Improving Animal Welfare: A Practical Approach* (Ed. 3), 84-112.
19. Hamam, A., & Abou-Zeina, H. (2007). Effect of vitamin E and selenium supplements on the antioxidant markers and immune status in sheep. *Journal of Biological Sciences, 7*(6), 870-878. https://doi.org/10.3923/jbs.2007.870.878
20. Han, B., Gao, D., & Wang, Q. (1995). Study on the mechanism of conirol high temperature transport stress in china experimental miniature pig with supplement compound sodium chlobide power. *Acta Vet Zootech Sinica, 26*, 261-267.
21. Hoffman, J. R., Ratamess, N. A., Ross, R., Shanklin, M., Kang, J., & Faigenbaum, A. D. (2008). Effect of a pre-exercise energy supplement on the acute hormonal response to resistance exercise. *The Journal of Strength and Conditioning Research, 22*(3), 874-882. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31816d5db6
22. Hsieh, C., & Rajashekaraiah, V. (2021). Ferric reducing ability of plasma: A potential oxidative stress marker in stored plasma. *Acta Haematologica Polonica, 52*(1), 61-67. https://doi.org/10.5603/AHP.2021.0009
23. Jobgen, W., Meininger, C. J., Jobgen, S. C., Li, P., Lee, M. J., Smith, S. B., Spencer, T. E., Fried, S. K., & Wu, G. (2009). Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *The Journal of nutrition, 139*(2), 230-237. https://doi.org/10.3945/jn.108.096362
24. Kiyma, Z., Alexander, B., Van Kirk, E., Murdoch, W., Hallford, D., & Moss, G. (2004). Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *Journal of Animal Science, 82*(9), 2548-2557. https://doi.org/10.2527/2004.8292548x
25. Laher, I. (2014). Systems biology of free radicals and antioxidants (First Ed.). Springer.
26. Lone, F. (2022). Artificial insemination in sheep-a breakthrough in offing. *Applied Veterinary Research, 1*(1), e2022001-e2022001. https://doi.org/10.31893/avr.2022001
27. McKnight, J. R., Satterfield, M. C., Jobgen, W. S., Smith, S. B., Spencer, T. E., Meininger, C. J., McNeal, C. J., & Wu, G. (2010). Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids, 39*, 349-357. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0598-z
28. Nayyar, S., & Jindal, R. (2010). Essentiality of antioxidant vitamins for ruminants in relation to stress and reproduction. *Iranian Journal of Veterinary Research, 11*(1), 1-9.
29. Önder, N. T., Batı, Y. U., Gökdemir, T., Kılıç, M. C., Şahin, O., Öğün, M., Akyüz, E., Kuru, M., Kırmızıgül, A. H., & Yıldız, S. (2023). Oxidative response of sheep to transcervical applications. *Reproduction in Domestic Animals*. https://doi.org/10.1111/rda.14361
30. Parker, A., Hamlin, G., Coleman, C., & Fitzpatrick, L. (2004). Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in Bos indicus steers. *Journal of Animal Science, 82*(4), 1037-1045. https://doi.org/10.2527/2004.8241037x
31. Priskas, S., Valergakis, G., Tsakmakidis, I., Vouraki, S., Papanikolopoulou, V., Theodoridis, A., & Arsenos, G. (2022). The role of housing conditions on the success of artificial insemination in intensively reared dairy ewes in greece. *Animals, 12*(19), 2693. https://doi.org/10.3390/ani12192693
32. Raza, S., Tewari, A., Rajak, S., & Sinha, R. A. (2021). Vitamins and non-alcoholic fatty liver disease: A molecular insight. *Liver Research, 5*(2), 62-71. https://doi.org/10.1016/j.livres.2021.03.004
33. Sathe, S. R. (2018). Laparoscopic Artificial insemination technique in small ruminants—A procedure review. *Frontiers in Veterinary Science, 5*, 266. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00266
34. Sciorsci, R., Piccinno, M., & Rizzo, A. (2018). Scopolamine butylbromide decreases the xylazine-mediated contractility in bovine pregnant uteri. *Theriogenology, 108*, 348-353. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.033
35. Small, A., Fisher, A. D., Lee, C., & Colditz, I. (2021). Analgesia for sheep in commercial production: Where to next? *Animals, 11*(4), 1127. https://doi.org/10.3390/ani11041127
36. Stafford, K., Chambers, J., Sylvester, S., Kenyon, P., Morris, S., Lizarraga, I., & de Nicolo, G. (2006). Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. *New Zealand Veterinary Journal, 54*(3), 109-113. https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36621
37. Tsuda, Y., Murakami, R., Yamaguchi, M., & Seki, T. (2020). Acute supplementation with an amino acid mixture suppressed the exercise-induced cortisol response in recreationally active healthy volunteers: A randomized,

double-blinded, placebo-controlled crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition, 17*(1), 39. https://doi.org/10.1186/s12970-020-00369-2

38. Yardimci, M., Sahin, E., Cetingul, I., Bayram, I., Aslan, R., & Sengor, E. (2013). Stress responses to comparative handling procedures in sheep. *Animal, 7*(1), 143-150. https://doi.org/10.1017/S1751731112001449
39. Yiannakopoulou, E. C., Nikiteas, N., Perrea, D., & Tsigris, C. (2013). Effect of laparoscopic surgery on oxidative stress response: Systematic review. *Surgical Laparoscopy Endoscopy and Percutaneous Techniques, 23*(2), 101-108. https://doi.org/10.1097/SLE.0b013e3182827b33
40. Yu, H., Bao, E. D., Zhao, R. Q., & Lv, Q. X. (2007). Effect of transportation stress on heat shock protein 70 concentration and mRNA expression in heart and kidney tissues and serum enzyme activities and hormone concentrations of pigs. *American Journal of Veterinary Research, 68*(11), 1145-1150. https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1145

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

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 303-315

Effect of Coconut Milk in Extender on Ram Sperm Quality Post Freezing and Thawing Process

Sara Rahmati[1], Seyyed Mojtaba Mousavi[2*], Ali Forouharmehr[2]

1 and 2- M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: Mousavi.sym@lu.ac.ir

Received: 26-05-2023
Revised: 06-04-2024
Accepted: 26-05-2024
Available Online: 04-08-2024

How to cite this article:
Rahmati, S., Mousavi, S. M., & Forouharmehr , A. (2024). Effect of coconut milk in extender on ram sperm quality post freezing and thawing process. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 303-315. (In Persian with English Abstract).
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

Introduction١: Sperm cryopreservation is a highly effective technique utilized in reproductive procedures, particularly in artificial insemination, as it enables the transfer of superior genes to the subsequent generation of animals. However, the exposure of sperm cells to low temperatures during the freezing process can have detrimental effects on their integrity, morphology, and viability (Gangwar et al., 2020). To counteract these negative impacts, cryoprotectants are added to the sperm extender. The primary purpose of incorporating cryoprotectants is to fulfill the energy requirements of the sperm, shield them from the adverse consequences of temperature fluctuations, mitigate the physical and chemical stresses associated with cooling, freezing, and thawing, and create an environment conducive to enhancing sperm survival (Barbas and Mascarenhas, 2009). In recent years, plant-based extenders have emerged as a viable alternative to animal-based extenders for semen preservation in various species. Coconut milk, in particular, has garnered attention due to its rich composition of fatty acids (including polyunsaturated fatty acids), amino acids, sugars, antioxidants, vitamins, and minerals. These components not only provide essential nutrients for maintaining cell function but also serve as a suitable medium for sperm extension and culture (dos Reis *et al.*, 2023; Vasconcelos *et al.*, 2009; Yong *et al.*, 2009). Consequently, this research aims to explore the impact of coconut milk on the quality of ram sperm following cryopreservation.

Materials and Methods: Twice a week, semen samples were obtained from five Lori-Bakhtiari rams using an artificial vagina. The collected semen from these five rams was then combined and divided into six different treatments. These treatments consisted of five variations with varying levels of coconut milk (5%, 10%, 15%, 20%, and 25%) and one treatment with egg yolk (15%). Various parameters such as sperm velocity, membrane integrity and activity, morphology, lipid peroxidation rate, and sperm DNA fragmentation were assessed both before and after the process of cryopreservation. The obtained data was subsequently analyzed using the SAS statistical software.

Results and Discussion: Prior to cryopreservation, the results indicated that, with the exception of the BCF parameter, there were no disparities in the various aspects of sperm kinetics, viability, functionality, and morphology. However, a notable decline in sperm motility parameters was observed after thawing across all treatments. This detrimental impact following the freezing process was more pronounced ($P<0.05$) when using the extender containing coconut milk compared to the extender containing egg yolk. Consequently, in terms of other motility parameters, the egg yolk treatment exhibited significantly higher values ($P<0.05$) than the other treatments, except for VCL (94.36±10.41%) and BCF (5.83±0.70 Hz). The findings of Wojtusik et al. (2018) were consistent with the results obtained in this study. It was observed that using coconut water and coconut milk as substitutes for egg yolk in rhinoceros sperm extenders led to a decrease in both sperm motility and viability. Similarly, the use of powdered coconut water as an extender for cryopreservation of cat sperm resulted in a significant reduction in sperm movement quality compared to a tris extender (de Sousa Barbosa *et al.* 2020).

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

Furthermore, when comparing different alternatives to egg yolk in the extender of rhinoceros sperm, such as soy lecithin (1 and 2%), coconut water (20%), and coconut milk (20%), it was found that the extenders containing coconut milk or water led to a loss of sperm mobility and viability. However, the extenders containing soy lecithin showed more promise as substitutes for egg yolk, as they maintained sperm viability, morphology, and acrosome integrity better than coconut milk and water (Wojtusik *et al.*, 2018). In contrast to the findings of this investigation, the utilization of extenders comprising powdered coconut water for the cryopreservation of sperm in various animal species, including dogs, boars, horses, goats, and fish, resulted in well-preserved sperm morphological and motility parameters following the freeze-thaw process. Furthermore, studies have demonstrated that freezing goat sperm with coconut milk, bull sperm with coconut oil, and equine and boar sperm with coconut water led to enhanced sperm viability and quality compared to control groups. The ineffectiveness of the extender may be attributed to the presence of salts and ions, such as calcium, potassium, and sodium, in coconut water, which could potentially interact with the channel proteins of the sperm cell plasma membrane. It is important to note that the precise mechanism by which coconut products in the extender maintain sperm characteristics remains unknown. Previous research by Toniolli *et al.* (1996) suggested that coconut water may serve as a protective agent for sperm due to its content of 3-indoleacetic acid. Furthermore, the replacement of glycerol with dimethylformamide in the boar sperm extender resulted in better preservation of sperm quality after the freezing and thawing process compared to other treatments (Silva *et al.* 2015). This suggests that each ingredient present in an extender could have a significant impact on enhancing extender efficiency. It is worth noting that coconut milk contains high levels of polyunsaturated fatty acids, which can make sperm more vulnerable to oxidative stress (dos Reis *et al.*, 2023; Vasconcelos *et al.*, 2009). However, no significant differences were observed in the lipid peroxidation indicator and the DNA fragmentation index among the various extenders used in this study. This could indicate that the extenders had similar antioxidant properties. The variations in the reported findings may be attributed to differences in the combinations and quantities of products used in the extenders, the type of base extender employed, variations in semen combinations and the sensitivity of sperm in different animal species, or discrepancies in the coconut combinations utilized (dos Reis *et al.*, 2023).

Conclusion: This research suggests that substituting egg yolk with coconut milk entirely in a ram sperm extender does not mitigate the negative consequences of cryopreservation. Additional investigations are necessary to determine the specific composition of the extender incorporating coconut-based ingredients for the cryopreservation of ram sperm.

Keywords: Coconut, Extender, Freezing, Ram, Spermatozoa

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

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۱۵-۳۰۳

تأثیر شیره نارگیل در رقیق‌کننده بر کیفیت اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

سارا رحمتی[۱]، سید مجتبی موسوی[۲*]، علی فروهرمهر[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

چکیده

داشتن یک رقیق‌کننده مناسب که بتواند از اسپرم در برابر آسیب انجماد و یخ‌گشایی محافظت کند، ضروری است. در این راستا، این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ انجام شد. نمونه‌های منی از پنج رأس قوچ لری- بختیاری دو بار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شدند. منی ترکیبی از پنج قوچ، تحت شش تیمار شامل سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و یک تیمار با زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد) قرار گرفت. قبل و بعد از انجماد، فراسنجه‌های سرعتی اسپرم، یکپارچگی و فعالیت غشاء، مورفولوژی، نرخ پراکسیداسیون لیپیدی و قطعه قطعه شدن DNA اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان، داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج قبل از انجماد نشان داد که به‌جز فراسنجه BCF، هیچ تفاوتی در سایر فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم و مورفولوژی اسپرم وجود ندارد (P≥۰/۰۵). با این حال، کاهش قابل توجهی در فراسنجه‌های جنبایی اسپرم پس از یخ‌گشایی در همه تیمارها مشاهده شد. این اثر مخرب پس از انجماد در رقیق‌کننده مکمل شده با شیره نارگیل نسبت به رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بیشتر بود. به‌طوری‌که تیمار زرده تخم‌مرغ به‌جز در VCL (۱۰/۴۱±۹۴/۳۶ µm/s) و BCF (۰/۷۰±۵/۸۳ هرتز)، در سایر فراسنجه‌های جنبایی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای مکمل شده با شیره نارگیل بود. مورفولوژی اسپرم، غلظت MDA و نرخ قطعه قطعه شدن DNA نیز تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن شیره نارگیل به رقیق‌کننده اسپرم، جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم قوچ نیست.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انجماد، رقیق‌کننده، قوچ، نارگیل

مقدمه

تلقیح مصنوعی به‌منظور کنترل بیماری، ورود و صدور اسپرم منجمد، قابلیت دسترسی به سوابق دقیق تولیدمثلی و حذف دام‌های نر خطرناک در مزارع، به‌خوبی به‌کار رفته است (Overton, 2005). همچنین، پایه‌ای برای طرح‌های بزرگ تولیدمثلی از قبیل: برنامه‌های هم‌زمان‌سازی فحلی، انتقال رویان، تولید آزمایشگاهی رویان، استفاده از اسپرم تعیین جنسیت شده، شبیه‌سازی و انتقال ژن‌ها است. تلقیح مصنوعی در گوسفند به چند طریق انجام می‌شود که شامل تلقیح به روش‌های واژینال، ترانس‌سرویکال، لاپاراسکوپی و تلقیح درون رحمی بدون نیاز به انجام جراحی است. از میان روش‌های نام برده، تلقیح مصنوعی با روش لاپاراسکوپی، بالاترین درصد باروری و درصد بره‌زایی را ایجاد می‌کند (Fair *et al.*, 2005). از طرفی، نوع اسپرم استفاده‌شده بر بازده روش‌های تلقیح مصنوعی مؤثر است. از اسپرم های مورد استفاده در تلقیح مصنوعی شامل اسپرم منجمد، اسپرم تازه رقیق شده و اسپرم تازه بدون مواد افزودنی است. هرکدام بر درصد باروری تأثیرگذار می‌باشند و کارایی هر یک از روش‌های تلقیح مصنوعی نیز با توجه به نوع اسپرم مورد استفاده، متغیر است (Ehling *et al.*, 2003).

از مزایای استفاده از اسپرم منجمد، ذخیره بلندمدت اسپرم، امکان انتقال آن به نقاط مختلف و تسهیل انتقال ژن‌های برتر به نسل بعدی حیوانات است (Barbas and Mascarenhas, 2009). عیب عمده آن، از بین رفتن غشای پلاسمایی و کاهش باروری اسپرم هنگام انجماد و یخ‌گشایی است، زیرا اسپرم گوسفند نسبت به اسپرم گاو به انجماد و یخ‌گشایی حساس‌تر است و هنگام یخ‌گشایی، درصد اسپرم زنده و درصد اسپرم با حرکت پیش‌رونده کاهش می‌یابد. به همین دلیل، هنگام عبور از گردن رحم، مقدار کمتری از اسپرم به محل لقاح می‌رسد. در نتیجه، باروری پایین، از مشکلات کار با اسپرم منجمد

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: Mousavi.sym@lu.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2024.82570.1146

است (Anel *et al.*, 2005). قرار گرفتن سلول‌های اسپرم در معرض دمای پایین که برای فرآیند انجماد اسپرم ضروری است، می‌تواند بر یکپارچگی و مورفولوژی اسپرم‌ها تأثیر بگذارد و موجب کاهش زنده مانی آن‌ها شود (Gangwar *et al.*, 2020). بنابراین، داشتن محیط انجماد (رقیق‌کننده) مناسب برای تأمین انرژی مورد نیاز اسپرم، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد شدن، انجماد- یخ‌گشایی و ایجاد محیطی مناسب که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌های انجماد- یخ‌گشایی محافظت کند و زنده‌مانی و جنبایی اسپرم را بعد از انجماد- یخ‌گشایی حفظ کند، ضروری است (Barbas Aisen *et al.*, 2002;and Mascarenhas, 2009).

امروزه تلاش‌های زیادی برای بهبود فرآیندهای انجماد- یخ-گشایی در اسپرم حیوانات مختلف در حال انجام است. استفاده از رقیق‌کننده‌های گیاهی به‌جای حیوانی در دهه اخیر گسترش زیادی پیدا کرده است، به‌طوری‌که می‌توان گفت برای محافظت منی اکثر گونه‌ها مانند انسان، گاو، گوسفند، بز، خوک، سگ، گربه و اسب از رقیق‌کننده‌های گیاهی استفاده شده است.

آب نارگیل، آندوسپرم مایع نارگیل‌های سبز، شیره نارگیل و عصاره مغز میوه نارگیل‌های بالغ حاوی اسیدهای چرب زیادی ازجمله: اسیدهای چرب با چند پیوند غیراشباع (PUFAs)، اسیدهای آمینه، آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، نمک‌ها، پروتئین‌ها، قندها و الکترولیت‌های مختلف هستند، که مواد مغذی لازم برای حفظ سلول ها را فراهم می‌کنند و همچنین به‌عنوان رقیق‌کننده مایع منی و محیط کشت استفاده می‌شوند (Cordeiro *et al.*, 2018; Yong *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌اند که رقیق‌کننده مبتنی بر شیره نارگیل می‌تواند یک جایگزین مناسب برای نگهداری اسپرم باشد (Salgueiro *et al.*, 2002). برخی مطالعات که بر روی پودر شیره نارگیل انجام‌شده است، نشان داده‌اند که شیره نارگیل، جایگزین مناسبی به‌عنوان محافظت کننده اسپرم بز (Oliveira *et al.*, 2011)، خوک (Bottini-Luzardo *et al.*, 2012)، سگ (Cardoso *et al.*, 2018) و اسب (Sampaio Neto *et al.*, 2002) است.

تحقیقات زیادی در رابطه با اثر شیره نارگیل بر اسپرم حیوانات مختلف صورت گرفته است، امّا بر اساس دانش ما، تاکنون تحقیقی در مورد اثر آن بر انجماد اسپرم قوچ صورت نگرفته است، بنابراین با توجه به مقالات مطالعه شده در مورد شیره نارگیل به نظر می‌رسد که استفاده از آن در رقیق‌کننده اسپرم قوچ بتواند اثرات مفیدی بر زنده-مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و سایر ویژگی‌های اسپرم قوچ پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی داشته باشد. هدف از مطالعه حاضر، تعیین اثر سطوح مختلف شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نژاد لری- بختیاری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و جمع‌آوری نمونه منی

از تعداد پنج رأس قوچ بالغ نژاد لری (سه تا پنج ساله) با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم‌گیری شد. نمونه‌های منی در درون لوله‌های مدرج ریخته شده و با کمک فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی منتقل شدند.

نمونه‌ها بلافاصله در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. انزال‌هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند، برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ۲- ۰/۵ میلی‌لیتر؛ غلظت بیشتر از $۱۰^{۹}$ × ۳ اسپرم در هر میلی‌لیتر؛ جنبایی بالای ۸۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار. بلافاصله بعد از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه‌ها، به‌منظور جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ‌ها، انزال‌های منتخب، با هم مخلوط شده و برای ادامه آزمایش استفاده شدند.

شش رقیق‌کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد (حجم/حجم) و زرده تخم‌مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق‌کننده پایه، آماده شد. رقیق‌کننده پایه بر پایه تریس حاوی ۲/۷ گرم تریس، ۱/۰ گرم فروکتوز، ۱/۴ گرم اسید سیتریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، با PH= ۷/۲ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی اسمول بود (Forouzanfar *et al.*, 2010).

نمونه‌های حاوی منی رقیق شده به‌تدریج تا پنج درجه سانتی‌گراد برای مدت سه ساعت سرد و سپس به داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شدند. پایوت‌ها بلافاصله در فاصله پنج سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به‌مدت ۱۲ دقیقه قرار داده شدند، سپس به داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان یخ‌گشایی ذخیره شدند. بعد از ذخیره‌سازی، پایوت‌ها در حمام آب گرم (۳۷ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه) یخ‌گشایی شدند. برای هر ارزیابی، سه پایوت یخ‌گشایی و بلافاصله در یک لوله آزمایش مخلوط شدند.

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

جنبایی اسپرم

برای ارزیابی فراسنجه‌های جنبایی اسپرم، از تیمارهای مختلف، با استفاده از سمپلر، سه قطره پنج میکرولیتری از هر نمونه روی لام ریخته شده و روی هرکدام یک لامل تمیز قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ منتقل شده و با استفاده از سامانه آنالیز کامپیوتری، جنبایی اسپرم ارزیابی شد. فراسنجه‌هایی که توسط این نرم‌افزار آنالیز شدند شامل: جنبایی کل (TM، درصد)، جنبایی پیش‌رونده (PM، درصد)، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)، سرعت

در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)، جنبایی عرضی سر (ALH، میکرومتر)، درصد خطی بودن جنبایی (LIN، درصد)، تناوب عرضی ضربان سر (BCF، هرتز) و مستقیم بودن مسیر طی شده (STR، درصد) بودند.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده‌مانی اسپرم)

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد (WHO). اساس این روش این گونه است که اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای آماده‌سازی رنگ ۱/۶۷ گرم ائوزین Y به همراه ۲/۹ گرم سیترات سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل شد. سپس، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه شده و جوشانده شد. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه شده در دمای اتاق سرد شده و برای جداسازی ذرات ژله‌ای، با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، فیلتر شد. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ میکرولیتر اسپرم به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. پس از رنگ‌آمیزی، لام‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد.

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم به‌وسیله آزمایش تورم هایپو اسموتیک (HOS[1]) بررسی شد (Revell and Mrode, 1994). برای ساخت محیط هاس، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/۴۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. فشار اسمزی روی ۱۰۰ میلی‌اسمول و pH روی ۷/۰۲ تنظیم شد. به‌طور خلاصه، ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

ارزیابی ریخت‌شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت‌شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد (Schäfer and Holzmann, 2000). برای ارزیابی ناهنجاری‌های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به میکروتیوپ حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک افزوده شد. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

تعیین میزان آسیب به DNA اسپرم

به‌منظور ارزیابی سلامت کروماتین و DNA اسپرم از کیت SDFA[2] استفاده شد که روش آن به این صورت است که این آزمایش در یک بستر میکروژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می‌شود. در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می‌گردند که طی رنگ‌آمیزی به‌صورت هاله‌ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده هستند. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌گردد.

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای منی

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی‌رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر (حاصل از یخ‌گشایی چهار پایوت) از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و دو میلی‌لیتر TCA، با هم مخلوط شده و به داخل لوله‌های مخروطی ریخته شدند. لوله مخروطی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی‌لیتر TBA در میکرو تیوب آمیخته شد. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شده، نمودار استاندارد رسم شد و غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر) با استفاده از معادله منحنی استاندارد محاسبه شد (Esterbauer and Cheeseman, 1990).

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و بعد از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، میانگین تیمارها با آزمون LSMeans مقایسه شدند. توزیع نرمال

1- Hypo Osmotic Swelling Test

2- Sperm DNA Fragmentation Assay

بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف و شاپیرو- ویلک بررسی شد و در مواردی که داده‌ها دارای توزیع نرمال نبودند از تبدیل ریشه دوم استفاده شد. هر تیمار شش تکرار داشت. برای هر تکرار سه پایوت برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم استفاده شد. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین حداقل مربعات بیان شدند و اختلافات در سطح P<۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شدند. مدل آماری به‌صورت معادله ذیل بود:

$$Y_{ik} = \mu + T_i + e_{ik}$$ معادله (۱)

که در آن، μ: بیانگر میانگین جمعیت برای صفت موردنظر، Ti: نشانگر اثر تیمار و eik: اثر عوامل کنترل نشده یا خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

در این مطالعه، جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ در رقیق کننده اسپرم قوچ در شرایط سرد، فراسنجه‌های جنبایی، زنده‌مانی، عملکرد غشایی و ریخت‌شناسی اسپرم را به اندازه رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ حفظ کرد (جدول ۱ و ۲). با این حال، نتایج پس از انجماد نشان داد که استفاده از شیره نارگیل به‌عنوان یک محافظ برودتی در رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، نه‌تنها فراسنجه‌های جنبایی اسپرم را بهبود نمی‌بخشد، بلکه به‌طور قابل توجهی کیفیت اسپرم منجمد را در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر شیره نارگیل کاهش می‌دهد (جدول ۳).

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم قوچ قبل از انجماد

Table 1- Comparison of sperm motility parameters before cryopreservation

فراسنجه[1] Parameter[1]	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد جنبایی پیش‌رونده PM (%)	46.12±6.89	48.91±6.89	60.04±7.71	54.28±7.71	44.01±6.89	57.29±6.89
درصد جنبایی کل TM (%)	72.83±9.01	74.08±8.98	81.46±9.90	77.84±9.97	67.70±9.12	78.79±8.90
درصد خطی بودن جنبایی Lin (%)	49.04±10.13	47.35±8.27	48.65±10.13	49.78±8.27	41.27±8.27	52.27±8.27
سرعت در مسیر مستقیم VSL (µm/s)	95.58±24.29	99.17±19.83	117.13±24.29	104.89±19.83	89.84±19.83	92.19±19.83
راستی مسیر طی شده STR (%)	78.50±14.80	76.73±12.09	86.70±14.80	83.47±10.47	67.94±12.09	89.11±10.47
سرعت در مسیر منحنی VCL (µm/s)	104.02±28.79	103.81±23.51	137.18±28.79	121.01±2.36	104.35±23.51	94.77±20.36
میانگین سرعت در مسیر VAP (µm/s)	97.87±24.75	96.92±20.21	116.71±24.75	106.23±17.50	94.64±20.21	83.02±17.50
جنبایی عرضی سر ALH (µm)	4.36±1.14	4.43±.93	5.58±1.14	5.08±0.81	4.56±0.93	4.59±0.81
تناوب عرضی ضربان سر BCF (Hz)	3.80±0.78 [ab]	3.07±0.64 [b]	3. 34±0.78 [b]	4. 1±0.55 [ab]	3.65±0.64 [ab]	5.66±0.55 [a]

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

[۱] TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن جنبایی، VSL: سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت در مسیر منحنی، VAP: میانگین سرعت در مسیر، ALH: جنبایی عرضی سر، STR: راستی مسیر طی شده و BCF: تناوب عرضی ضربان سر.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

[1]TM: Total motility, PM: Progressive motility, LIN: Linearity, VCL: Curvilinear velocity, VSL: Straight linear velocity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, STR: Straightness, VAP: Average path velocity, and BCF: Beat cross frequency.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant (P < 0.05).

جدول ۲– مقایسه زنده‌مانی، فعالیت غشایی سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف قبل از انجماد

Table 2- Values viability, functionality, and morphology of sperm before cryopreservation

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد اسپرم زنده Live sperm (%)	93.64±2.19	92.86±2.19	92.14±2.19	89.07±2.19	92.96±2.19	93.86±2.19
درصد اسپرم با غشای فعال Functional sperm (%)	86.39±1.51	82.12±1.51	85.88±1.51	84.94±1.51	83.05±1.51	83.82±1.79
درصد اسپرم هنجار Normal sperm (%)	89.76±1.53	88.93±1.40	87.87±1.53	87.75±1.40	91.69±1.40	89.63±1.40

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

جدول ۳– مقایسه فراسنجه‌های جنبایی و سرعتی اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف بعد از انجماد

Table 3- Comparison of motility parameters of sperm post-freezing-thawing process

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد جنبایی پیش‌رونده PM (%)	9.37±1.72 b	9.76±1.55 b	7.04±1.60 b	9.74±1.66 b	10.20±1.55 b	21.84±1.72 a
درصد جنبایی کل TM (%)	20.21±3.01 b	21.40±2.71 b	16.72±2.80 b	20.14±2.90 b	22.60±2.71 b	36. 19±3.01 a
درصد خطی بودن جنبایی Lin (%)	6.61±1.22 b	6.98±1.13 b	4.94±1.22 b	6.65±1.27 b	7.08±1.10 b	14.35±1.32 a
سرعت در مسیر مستقیم VSL (µm/s)	47.69±7.60 b	50.06±7.08 b	36.19±7.60 b	48.83±7.91 b	56.67±6.85 b	80.48±8.26 a
راستی مسیر طی شده STR (%)	11.09±1.81 b	11.56±1.69 b	8.90±1.81 b	10.86±1.89 b	12.16±1.63 b	22.47±1.97 a
سرعت در مسیر منحنی VCL (µm/s)	70.57±9.58	76.66±8.92	64.37±9.58	67.89±9.97	85.80±8.63	94.36±10.41
میانگین سرعت در مسیر VAP (µm/s)	49.22±7.23 b	52.04±6.73 b	39.95±7.23 b	48.08±7.52 b	57.75±6.51 ab	76.57±7.86 a
جنبایی عرضی سر ALH (µm)	5.06±0.69 ab	5.43±0.65 ab	4.62±0.69 b	4.67±0.72 b	5.96±0.63 ab	6.95±0.75 a
تناوب عرضی ضربان سر BCF (Hz)	4.52±0.71	4.32±0.58	4.51±0.80	5.06±0.99	5.54±0.69	5.83±0.70

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

[۱] TM: درصد جنبایی کل، PM: درصد جنبایی پیش‌رونده، LIN: درصد خطی بودن جنبایی، VSL: سرعت در مسیر مستقیم، VCL: سرعت در مسیر منحنی، VAP: میانگین سرعت در مسیر، ALH: جنبایی عرضی سر، STR: راستی مسیر طی شده و BCF: تناوب عرضی ضربان سر.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk, and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

[1]TM: Total motility, PM: Progressive motility, LIN: Linearity, VCL: Curvilinear velocity, VSL: Straight linear velocity, ALH: The amplitude of lateral head displacement, STR: Straightness, VAP: Average path velocity, and BCF: Beat cross frequency.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant (P < 0.05).

در بیشتر گونه‌ها، مواد با منشأ گیاهی به‌عنوان جایگزین در رقیق کننده‌های محافظ اسپرم در برابر شوک سرمایی برای کاهش استفاده از مواد با منشأ حیوانی و جلوگیری از آلودگی احتمالی آن‌ها استفاده شده است. عصاره‌های گیاهی حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی مانند

کاروتنوئیدها، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها در چندین مطالعه مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Del Valle *et al.*, 2013). طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، شوک سرمایی به‌شدت فسفولیپیدهای و گلیکوپروتئین‌های موجود در سطح غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و موجب شروع آسیب‌های ساختاری و بیوشیمیایی به اسپرم می‌شود. برای جلوگیری از این آسیب‌ها علاوه‌بر مواد محافظ درون‌سلولی، به مواد محافظ خارج سلولی یا نفوذناپذیر نیز نیاز است. این مواد عمدتاً لیپوپروتئین‌ها و پروتئین‌های موجود در منابعی همچون زرده تخم‌مرغ، شیر و منابع گیاهی مانند لسیتین سویا هستند که با عمل بر روی غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کنند (Salamon and Maxwell, 1995).

یکی از مهم‌ترین عواملی که نشان از انجماد موفق اسپرم دارد، جنبایی آن است. در تحقیق حاضر، جایگزینی زرده تخم‌مرغ با شیره نارگیل، نتوانست فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را پس از انجماد، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ، حفظ کند. بنابراین، شیره نارگیل جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نبود. این یافته‌ها با مشاهدات وجتسکی و همکاران (Wojtusik *et al.*, 2018) مطابقت دارد. جایگزینی لسیتین سویا (یک و دو درصد)، آب نارگیل (۲۰ درصد) و شیره نارگیل (۲۰ درصد) با زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم کرگدن موجب از دست دادن بیشتر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است. با این حال، رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا، پتانسیل بیشتری را به‌عنوان جایگزین زرده تخم‌مرغ برای حفظ زنده‌مانی، مورفولوژی و یکپارچگی آکروزوم اسپرم‌ها در مقایسه با شیره نارگیل و آب نشان داده است (Wojtusik *et al.*, 2018). علاوه‌براین، انجماد اسپرم گربه با استفاده از رقیق‌کننده پودر آب نارگیل به‌طور قابل توجهی کیفیت حرکت اسپرم را در مقایسه با رقیق‌کننده تریس کاهش داده است (de Sousa Barbosa *et al.*, 2020). نتایج یک تحقیق مروری نشان داد که آب نارگیل تأثیر مثبتی بر جنبایی کل سلول‌های اسپرم طی نگهداری در شرایط سرد دارد، درحالی‌که در اسپرم منجمد شده هیچ اثر معنی‌داری مشاهده نشده است (dos Reis et al., 2023). همچنین، استفاده از رقیق کننده‌های مبتنی بر آب نارگیل برای اسپرم اسب در شرایط سرد، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم را بهبود نداده است (Brasileiro *et al.*, 2019).

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول مهم است، زیرا تبادلات متابولیکی با محیط اطراف را کنترل می‌کند. همچنین، فعال بودن غشای پلاسمایی در فرآیندهای ظرفیت‌دار شدن، واکنش آکروزومی و نفوذ به اووسیت نیاز است (Jeyendran *et al.*, 1984). در مطالعه حاضر، نمونه‌های اسپرم منجمد شده با تیمارهای حاوی زرده، حداکثر زنده‌مانی (۶۱/۶۰±۲/۷۷ درصد) و عملکرد غشایی (۵۵/۴۲±۴/۰۵ درصد) را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند (P≤۰/۰۵). درحالی‌که سایر تیمارها از نظر زنده‌مانی و عملکرد غشایی، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۴). علاوه‌براین، مورفولوژی اسپرم تحت تأثیر هیچ‌کدام از تیمارها قرار نگرفت (P≥۰/۰۵) (جدول ۴).

جدول ٤- مقایسه یکپارچگی، فعالیت غشایی سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف بعد از انجماد

Table 4- Values viability, functionality, and morphology of frozen-thawed sperm

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵٪ زرده Yolk
درصد اسپرم زنده Live sperm (%)	37.63±2.97 b	41.11±2.77 b	45.21±2.77 b	41.21±2.77 b	39.57±2.77 b	61.60±2.77 a
درصد اسپرم با غشای فعال Functional sperm (%)	25.57±2.81 b	28.27±2.55 b	30.38±2.60 b	29.10±2.57 b	30.49±2.61 b	55.42±4.05 a
درصد اسپرم هنجار Normal sperm (%)	82.87±2.73	76.56±2.75	79.64±2.58	78.84±2.58	80.42±2.58	82.89±2.73

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant (P < 0.05).

غلظت‌های بهینه اسیدهای آمینه، جنبایی و یکپارچگی غشای اسپرم را بهبود می‌بخشد. از سوی دیگر، زمانی که غلظت این عوامل کمتر یا بالاتر از حد ایده‌آل باشد، کاهش قابل توجهی در همین فراسنجه‌ها وجود دارد (Li *et al.*, 2003). اگرچه غلظت اسیدهای

آمینه در این کار تعیین نشده است، چنین عاملی می‌تواند مستقیماً با کاهش یافت شده برای این متغیر مرتبط باشد، زیرا فراوانی آن‌ها در شیره نارگیل قبلاً گزارش شده است (Yong *et al.*, 2009). همچنین، ناتوانی رقیق‌کننده ممکن است مربوط به نمک‌ها و یون‌ها (به‌ویژه کلسیم، پتاسیم و سدیم) در آب نارگیل باشد که ممکن است با پروتئین‌های کانال غشای پلاسمایی سلول‌های اسپرم برهم‌کنش داشته باشند. کاهش زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر آب نارگیل ممکن است به‌دلیل حلالیت کم و در دسترس بودن کم لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین باشد (de Sousa Barbosa *et al.*, 2020).

برخلاف نتایج مطالعه حاضر، استفاده از رقیق‌کننده‌های حاوی پودر آب نارگیل در انجماد اسپرم سگ (Cardoso *et al.*, 2018)، خوک (Silva *et al.*, 2015)، اسب (London *et al.*, 2017)، بز (Oliveira *et al.*, 2011)، و ماهی (Viveiros *et al.*, 2010)، فراسنجه‌های ریخت‌شناسی و جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ‌گشایی را به‌خوبی حفظ کرده‌اند. همچنین، انجماد اسپرم بز با شیره نارگیل (Daramola *et al.*, 2016)، اسپرم گاو با روغن نارگیل (Tarig *et al.* 2017b) و اسپرم اسب (London *et al.*, 2017) و خوک (Silva *et al.*, 2011) با آب نارگیل نشان داد که زنده‌مانی و کیفیت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است. اثر مفید آب نارگیل بر کیفیت اسپرم به بخش طبیعی آن نسبت داده شده است که حاوی آنیون‌ها و کاتیون‌های مختلف، قندهای آزاد، سوربیتول و اینوزیتول است (Silva *et al.*, 2015). روغن نارگیل یکی دیگر از محصولات نارگیل است که در فرمولاسیون رقیق‌کننده‌های اسپرم حیوانات استفاده می‌شود. استفاده از هشت درصد روغن نارگیل همراه با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده مبتنی بر تریس، توانسته است کیفیت اسپرم گاو را طی نگهداری در شرایط سرد و پس از انجماد، بهتر حفظ کند (Tarig *et al.* 2017b). همچنین مکمل کردن روغن نارگیل (دو درصد) همراه با غلظت ۱/۵ درصد لسیتین سویا، تمام ویژگی‌های کیفی اسپرم را پس از نگهداری در شرایط سرد بهبود داده است، درحالی‌که پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی، ویژگی‌های کیفی اسپرم را در مقایسه با شاهد بهبود نداده است (Tarig *et al.* 2017a).

همان‌طور که پیش‌تر عنوان شد، فراورده‌های مختلف نارگیل مانند آب نارگیل، پودر آب نارگیل، شیره نارگیل و روغن نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم گونه‌های مختلف حیوانی استفاده شده است. اگرچه کاربرد آن‌ها در برخی از گونه‌ها تأثیر مثبتی بر کیفیت اسپرم داشته است، در برخی موارد گنجاندن آن‌ها در رقیق‌کننده‌ها، تأثیر معنی‌داری بر کیفیت اسپرم منجمد شده، نداشته است. الگوی حرکتی اسپرم، به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی که در آن قرار دارد، بسیار حساس است. از طرفی، سازوکار دقیق اثر فراورده‌های نارگیل در رقیق‌کننده برای حفظ ویژگی‌های اسپرم، مشخص نیست. تونیولی و همکاران (Toniolli *et al.*, 1996) نشان دادند که آب نارگیل ممکن است به‌عنوان محافظ اسپرم عمل کند، زیرا آب نارگیل حاوی ۳-ایندول استیک اسید است. علاوه‌براین، جایگزینی گلیسرول با دی متیل فرمامید در رقیق‌کننده اسپرم خوک، کیفیت اسپرم را به دنبال فرآیند انجماد و یخ‌گشایی بهتر از سایر تیمارها حفظ کرد (Silva *et al.*, 2015). این نشان می‌دهد که وجود هر عنصر در یک رقیق‌کننده می‌تواند نقش مهمی در افزایش کارایی آن داشته باشد. به‌عنوان مثال، انجماد اسپرم بز در رقیق‌کننده‌های شیره نارگیل حاوی پیریدوکسین (هشت میلی‌مول)، افزایش قابل توجهی در زنده‌مانی اسپرم، کاهش در درصد اسپرم غیرطبیعی و کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داده است (Daramola *et al.*, 2016). علاوه‌براین، انجماد اسپرم اسب در رقیق‌کننده‌های حاوی آب نارگیل، فراسنجه‌های جنبایی اسپرم را بهتر از رقیق‌کننده‌های مبتنی بر زرده تخم‌مرغ حفظ کرده است. همچنین، نرخ آبستنی با اسپرم منجمد در آب نارگیل به‌طور قابل توجهی بیشتر از گروه شاهد بوده است (London *et al.*, 2017).

سامانه محدود محافظت آنتی‌اکسیدانی ذاتی منی، پس از رقیق‌سازی و سردسازی، تضعیف می‌شود (Bilodeau *et al.*, 2000). اسپرم‌ها، به‌ویژه اسپرم قوچ، به‌دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسما، در برابر تنش اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر هستند (Allai *et al.*, 2016) و عدم تعادل بین تولید و حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر به ضعف فراسنجه‌های حرکتی اسپرم می‌شود (Kasimanickam *et al.*, 2007). همچنین تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد باعث عملکرد معیوب اسپرم مانند تخریب یکپارچگی DNA اسپرم (Aitken *et al.*, 2010)، پتانسیل غشای میتوکندری، واکنش آکروزوم و توانایی ضعیف در نفوذ به تخمک می‌شود (Zabludovsky *et al.*, 1999). آسیب DNA اسپرم، بر کیفیت رویان و در نتیجه، بر نرخ آبستنی تأثیر منفی می‌گذارد (Evenson, 2016).

شیره نارگیل حاوی سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه است که اسپرم را در برابر تنش اکسیداتیو مستعدتر می‌کند. با این حال، در مطالعه حاضر، رقیق‌کننده‌های مختلف از نظر شاخص پراکسیداسیون لیپید و شاخص قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، تفاوت قابل توجهی با هم نداشتند (جدول ۵). این ممکن است نشان‌دهنده وضعیت آنتی‌اکسیدانی یکسان در رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در این مطالعه باشد. علاوه‌براین، شیره نارگیل حاوی ویتامین C است که به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند (Memon *et al.*, 2012) و گزارش شده است که اثر وابسته به دوز در برابر

تنش اکسیداتیو بر روی اسپرم انسان دارد (Ahmad *et al.*, 2017). بااین‌حال، نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که غلظت این عامل در رقیق‌کننده برای اعمال چنین محافظتی، کافی نبوده است.

جدول ۵- مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپید و وضعیت DNA در تیمارهای مختلف بعد از انجماد

Table 5- Lipid peroxidation and DNA fragmentation index (% DFI) in frozen-thawed sperm

فراسنجه Parameter	تیمار Treatment					
	۲۵ ٪ نارگیل Coc-25	۲۰ ٪ نارگیل Coc-20	۱۵ ٪ نارگیل Coc-15	۱۰ ٪ نارگیل Coc-10	۵ ٪ نارگیل Coc-5	۱۵ ٪ زرده Yolk
مالون دی‌آلدئید (نانومول در میلی‌لیتر) MDA (nMol/ml)	2.04±0.42	2.94±0.42	2.03±0.42	1.93±0.42	2.10±0.42	2.79±0.42
شاخص قطعه قطعه شدن DNA (درصد) DFI (%)	10.29±1.90	5.70±1.90	9.12±1.90	10.21±1.90	6.15±2.67	5.06±2.67

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Coc-5، Coc-10، Coc-15، Coc-20 و Coc-25: به‌ترتیب مقدار پنج، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد شیره نارگیل در رقیق‌کننده است.

در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های دارای حرف غیرمشابه، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵).

The yolk is egg-yolk and Coc-5, Coc-10, Coc-15, Coc-20, and Coc-25 are values of 5, 10, 15, 20, and 25 percent coconut milk in the extender, respectively.

In every row, the difference between the means with dissimilar letters was significant (P < 0.05).

شیره نارگیل حاوی کربوهیدرات به‌عنوان منبع قند است (Okolie *et al.*, 2011) که پتانسیل اسمزی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و از غشای سلول در برابر آسیب ناشی از سرما محافظت می‌کند (Purdy, 2006). همچنین حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) است که به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشا کمک می‌کند (Wassall and Stillwell, 2009). علاوه‌براین، اسیدهای آمینه ضروری موجود در شیره نارگیل نقش مهمی در یکپارچگی غشای سلول دارند (Yong *et al.*, 2009). به هر حال، ترکیب غشای اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است که تا حدی، تحمل اسپرم به سرما را دیکته می‌کند و ممکن است بر پاسخ سلول به رقیق‌کننده‌ها تأثیر بگذارد (Layek *et al.*, 2016). بنابراین، این تفاوت‌ها در نتایج گزارش شده ممکن است به‌دلیل تفاوت در ترکیبات فرآورده و مقادیر استفاده شده در رقیق‌کننده‌ها، نوع رقیق‌کننده پایه، تفاوت در ترکیبات منی گونه‌های حیوانی و حساسیت اسپرم آن‌ها، یا تفاوت در ترکیب نارگیل استفاده شده، باشد (dos Reis et al., 2023).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که جایگزینی کامل زرده تخم‌مرغ با شیره نارگیل در رقیق‌کننده اسپرم قوچ در شرایط سرد، فراسنجه‌های کیفی اسپرم را به اندازه رقیق‌کننده حاوی زرده حفظ می‌کند، درحالی‌که نمی‌تواند از اثرات نامطلوب انجماد بر اسپرم جلوگیری کند. مطالعات بیشتری برای شناسایی ترکیب دقیق رقیق کننده‌ای که بر اساس فراورده‌های نارگیل باشد، برای انجماد اسپرم قوچ نیاز است.

References

1. Ahmad, G., Agarwal, A., Esteves, S., Sharma, R., Almasry, M., Al-Gonaim, A., AlHayaza, G., Singh, N., Al Kattan, L., & Sannaa, W. (2017). Ascorbic acid reduces redox potential in human spermatozoa subjected to heat-induced oxidative stress. *Andrologia*, *49*(10), e12773. https://doi.org/10.1111/and.12773.
2. Aisen, E. G., Medina, V. H., & Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808. https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00653-2.
3. Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, *25*(10), 2415-2426. https://doi.org/10.1093/humrep/deq214.
4. Allai, L., Druart, X., Öztürk, M., BenMoula, A., Nasser, B., & El Amiri, B. (2016). Protective effects of *Opuntia ficus*-indica extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, *175*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.09.013.
5. Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., & Paz, P.d. (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, 63(4), 1235-1247. https://doi.org/10.1016/ j.theriogenology.2004.07.001.

6. Barbas, J., & Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10, 49-62.
7. Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, *55*(3), 282-288. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795.
8. Bottini-Luzardo, M., Centurión-Castro, F., Alfaro-Gamboa, M., Aké-López, R., & Herrera-Camacho, J. (2012). Effect of addition of coconut water (*Cocos nucifera*) to the freezing media on post-thaw viability of boar sperm. *Tropical Animal Health and Production*, *45(*1), 101-106. https://doi.org/10.1007/s11250-012-0179.
9. Brasileiro, L. S., Segabinazzi, L. G. T. M., Menezes, E., Salgueiro, C. C., Novello, G., da Cunha Scheeren, V. F., & Nunes, J. F. (2019). Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 69-73. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.213.
10. Cardoso, R., Silva, A., & Silva, L. (2005). Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproducction*, *2*, 257-262.
11. Cordeiro, M., Silva, E., Miranda, M., Biondi, F., Santos, S., & Ohashi, O. (2006). The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*, 3(3), 376-379.
12. Daramola, J., Adekunle, E., Iyasere, O., Oke, O., Sorongbe, T., Iyanda, O., & Gbadebo, O. (2016). Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Ruminant Research*, *136*, 208-213. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.004.
13. de Sousa Barbosa, B., Izzo, R. G., Silva, H. V. R., Nunes, T. G. P., Brito, B. F., da Silva, T. F. P., & da Silva, L. D. M. (2020). Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from domestic cat using powdered coconut water (ACP-117c) and Tris extenders. *Cryobiology*, *92*, 103-108. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol. 2019.11.042.
14. Del Valle, I., Souter, A., Maxwell, W., Muino-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. (2013). Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, *138*(3-4), 213-219. https://doi.org/10.1016/ j.anireprosci.2013.02.022.
15. dos Reis, R. A., Torres, R. d. N. S., Ribeiro, I. M., Torres, C. A. A., & de Freitas, B. W. (2023). Coconut water-based extender for seminal preservation in small ruminants: A meta-analysis study. *Small Ruminant Research*, 106915. https://doi.org/10.1016/j. smallrumres.2023.106915.
16. Ehling, C., Wirth, P., Schindler, L., Hadeler, K.-G., Dpke, H.-H., Lemme, E., & Niemann, H. (2003). Laparoscopical intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, *60*(4), 777-787. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00049-9.
17. Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, *186*, 407-421. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H.
18. Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, *169*, 56-75. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.
19. Fair, S., Hanrahan, J., O'Meara, C., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M., Lonergan, P., & Evans, A. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, *63*(7), 1995-2005. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2004.09.005.
20. Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., & Nasr-Esfahani, M. (2010). *In vitro* comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, *73*(4), 480-487. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2009.10.005.
21. Gangwar, C., Kharche, S. D., Mishra, A. K., Saraswat, S., Kumar, N., & Sikarwar, A. K. (2020). Effect of diluent sugars on capacitation status and acrosome reaction of spermatozoa in buck semen at refrigerated temperature. *Tropical Animal Health and Production*, *52*, 3409-3415. https://doi.org/10.31186/jspi.id.18.1.20-26.
22. Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, *70*(1), 219-228.
23. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Thatcher, C., Nebel, R., & Cassell, B. (2007). Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, *67*(5), 1004-1012. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.013.
24. Layek, S., Mohanty, T., Kumaresan, A., & Parks, J. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, *172*, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013.
25. Li, Y., Si, W., Zhang, X., Dinnyes, A., & Ji, W. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) sperm. American Journal of Primatology: *Official Journal of the American Society*

of Primatologists, 59, 159-165. https://doi.org/10.1002/ajp.10073.
26. London, K. T., Christensen, B. W., Scott, C. J., Klooster, K., Kass, P. H., Dujovne, G. A., & Meyers, S. A. (2017). The effects of an oxygen scavenger and coconut water on equine sperm cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, *58*, 51-57. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.08.014.
27. Memon, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y., Ebrahimi, M., & Nadia, F. (2012). Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science*, *136*(1-2), 55-60. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.020.
28. Okolie, P., Obi, C., & Uaboi-Egbenni, P. (2011). Fungal spoilage of coconut (*Cocos nucifera* L.) fruits during storage and the growth differential of isolates on selected amino acids and carbohydrates. *Pakistan Journal of Nutrition*, *10*(10), 965-973. http://pjbs.org/pjnonline/ab2089.htm.
29. Oliveira, R., Nunes, J., Salgueiro, C., Cavalcante, J., Brasil, O., & Moura, A. (2011). Evaluation of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water media based (ACP-101®) or TRIS. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *63*(6), 1295-1302. https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600003.
30. Overton, M. (2005). Cost comparison of natural service sires and artificial insemination for dairy cattle reproductive management. *Theriogenology*, *64*(3), 589-602. https://doi.org/10.1016/ j.theriogenology. 2005.05.015.
31. Purdy, P. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, *63*(3), 215-225. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.02.015.
32. Revell, S., & Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90055-8.
33. Salamon, S., & Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3), 185-249. https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I.
34. Salgueiro, C., Nunes, J., Oliveira, K., Vieira, V., Gondim, J., & Mateos-Rex, E. (2002). Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *1*(5), 96-98.
35. Sampaio Neto, J., Salgueiro, C., Mateos-Rex, E., & Nunes, J. (2002). Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *5*, 137-139.
36. Schäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, *59*(3), 201-211. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00073-7.
37. Silva, C., Cunha, E., Blume, G., Malaquias, J., Báo, S., & Martins, C. (2015). Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*, 70(2), 90-94. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.001.
38. Silva, M., Peixoto, G., Santos, E., Castelo, T., Oliveira, M., & Silva, A. (2011). Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, *76*(6), 1084-1089. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.014.
39. Tarig, A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y., Baiee, F., Khumran, A., Salman, H., Assi, M., & Ebrahimi, M. (2017a). Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Veterinary World*, *10*(6), 672.
40. Tarig, A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y., Baiee, F., & Ebrahimi, M. (2017b). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182, 21-27. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024.
41. Toniolli, R., Bussière, J., Courot, M., Magistrini, M., & Combarnous, Y. (1996). Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15 C of boar semen for artificial insemination. *Reproduction Nutrition Development*, *36*(5), 503-511.
42. Vasconcelos, A. B., Santos, A. M. C., Oliveira, J. S., de Albuquerque Lagares, M., & Santoro, M. M. (2009). Purification and partial characterization of proteinase inhibitors of equine seminal plasma. *Reproductive Biology*, *9*(2), 151-160. https://doi.org/10.1016/ S1642-431X(12)60023-0.
43. Viveiros, A., Nascimento, A., Orfão, L., & Isaú, Z. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74(4), 551-556. https://doi.org/10.1016/j. theriogenology.2010.03.018.
44. Wassall, S. R., & Stillwell, W. (2009). Polyunsaturated fatty acid–cholesterol interactions: Domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1788*(1), 24-32. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.011.
45. Wojtusik, J., Stoops, M. A., & Roth, T. L. (2018). Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Theriogenology*, *121*, 72-77. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology. 2018.07.042.
46. Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of

coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, *14*(12), 5144-5164. https://doi.org/10.3390/molecules14125144.

47. Zabludovsky, N., Eltes, F., Geva, E., Berkovitz, E., Amit, A., Barak, Y., Har-Even, D., & Bartoov, B. (1999). Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Andrologia*, *31*(2), 91-98. https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.

Contents

Ruminant Nutrition

Chemical Composition, Digestibility and *in vitro* Fermentation Variables of Mixed Silage from Different Levels of *Paulownia* Leaves and Forage Corn **157**
Ayoub Azizi

Poultry Nutrition

Effects of Dietary Organic Chromium Supplementation on Laying Performance, Egg Quality, Immune and Blood Biochemical Parameters of Laying Hens in the Late Phase of Production **171**
Mehrdad Karimi, Majid Olyayee, Hossein Jonmohammadi, Rohollah Kianfar, Fatemeh Khademnasi

Effects of *Spirulina platensis* on Growth Performance, Carcass Traits, Cecal Microflora and Immune Response of Broiler Chickens Under Heat Stress and Comparing It with Vitamin E **187**
Farrokh Nazmi, Seyed Ali Mirghelenj, Mohsen Daneshyar, Mohammad Amir Karimi Torshizi, Sina Peyvastegan, Hosna Hajati

Determining the Bioavailability Percentage of Bone Ash Phosphorus Compared to Monocalcium Phosphate and Its Effect on Performance, Bone Quality and Phosphorus Digestibility in Broilers **203**
Mohammad Sedghi, Zahra Sarrami , Razieh Ghasemi and Mehdi Zanghae

The Effects of Replacing Synbiotics and macroalgae *Sargassum* with Oxytetracycline on Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Morphology and Blood Serum Lipid Parameters of Broiler Chickens **221**
Mohammad Reza Rezvani, Mohammad Javad Agah, Zohreh Gazor Habibabadi, Alidad Boostani, Houshang Lotfollahian, Ahmad Ali Sabetan Shirazi

Genetic

Analysis of the Regulatory Effects of lncRNAs on Kidney Tissue in Ascites Susceptible Broiler **235**
Kasra Ahmadian, Mohammadreza Nassiri, Karim Hasanpur[3], Ali Javadmanesh

Genome-Wide Association Study Based on Mega-Analysis to Detect Genomic Regions Associated with Prolificacy in Sheep **249**
Hossein Mohammadi

Evaluation of Quality Characteristics of Silk Thread in Iranian Silkworm Hybrids **259**
Seyed Hossein Hosseini Moghaddam , Ramin Abdoli, Kamran Mahfouzi

Expression Analysis of Candidate Genes in White and Black Spots of Skin Tissue in Lori Bakhtiari Sheep **277**
Khadijeh Moradi, Mustafa Muhaghegh Dolatabady, Javad Habibizad

Physiology

Effect of Administration of Acepromazine Combined with Multi vitamin and Amino Acids Complex on Fertility Outcome, Blood Hematological and Biochemical Alterations and the Oxidative Stress Generated by Laparoscopic AI in Ewes **287**
Abbas Farahavar, Hamed Ahmadinejad, Daryush Aliour, Hasan Aliarabi

Effect of Coconut Milk in Extender on Ram Sperm Quality Post Freezing and Thawing Process **303**
Sara Rahmati, Seyyed Mojtaba Mousavi, Ali Forouharmehr

« Scientific Journal»

Iranian Journal of Animal Science Research

Vol. 16 **No. 2** **2024**

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad (F.U.M.)
Responsible Manager: H. Nassiri Moghaddam (Prof.)
Editor-in-Chief: R. Valizadeh (Prof.)

Editorial Board:

Valizade, R	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
Danesh Mesgaran, M	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M)
Chaji, M	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Agricultural Science and Natural Resourses University Of Khuzestan
Aliarabi, H	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Bo Ali Sina University, Hamadan
Seifdavati, J	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Mohaghegh Ardabili University
Nassiri-Moghaddam, H	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
Golian, A	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
Hassanabadi, A	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
Dastar, B	Poultry Nutrition	(Prof.)	Gorgan Agricultural and Natural Resources University
Janmohammadi, H	Poultry Nutrition	(Prof.)	Tabriz University
Khajali, F	Poultry Nutrition	(Prof.)	Shahre kord University
Pirani, N	Genetics & breeding	(Asso. Prof.)	Shahre kord University
Nassiri, M. R	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
Tahmoores pour, M	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
Zerehdaran, S	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
Pakdel, H	Genetics & breeding	(Prof.)	Isfahan University of Technology
Doosti, H	Statistics	(Prof.)	Macqurie, Sydney, Australia
Sargolzaei, M	Genetics	(Asso. Prof.)	University of Guelph, Canada

Printed by: Ferdowsi University of Mashhad, Press.

Address: P.O. Box 91775-1163, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Phone: +98-51-38804656

Fax: +98-51-38787430

E-Mail: ijasr@ferdowsi.um.ac.ir

Web Site: https://ijasr.um.ac.ir

Ferdowsi University of Mashhad

Vol. 16 No. 2

2024

Iranian Journal of Animal Science Research

ISSN:2008-3106

Contents

Ruminant Nutrition

Chemical Composition, Digestibility and in vitro Fermentation Variables of Mixed Silage from Different Levels of Paulownia Leaves and Forage Corn 157

Ayoub Azizi

Poultry Nutrition

Effects of Dietary Organic Chromium Supplementation on Laying Performance, Egg Quality, Immune and Blood Biochemical Parameters of Laying Hens in the Late Phase of Production 171

Mehrdad Karimi, Majid Olyayee, Hossein Jonmohammadi, Rohollah Kianfar, Fatemeh Khademnasi

Effects of Spirulina platensis on Growth Performance, Carcass Traits, Cecal Microflora and Immune Response of Broiler Chickens Under Heat Stress and Comparing It with Vitamin E 187

Farrokh Nazmi, Seyed Ali Mirghelenj, Mohsen Daneshyar, Mohammad Amir Karimi Torshizi, Sina Peyvastegan, Hosna Hajati

Determining the Bioavailability Percentage of Bone Ash Phosphorus Compared to Monocalcium Phosphate and Its Effect on Performance, Bone Quality and Phosphorus Digestibility in Broilers 203

Mohammad Sedghi, Zahra Sarrami , Razieh Ghasemi and Mehdi Zanghae

The Effects of Replacing Synbiotics and macroalgae Sargassum with Oxytetracycline on Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Morphology and Blood Serum Lipid Parameters of Broiler Chickens 221

Mohammad Reza Rezvani, Mohammad Javad Agah, Zohreh Gazor Habibabadi, Alidad Boostani, Houshang Lotfollahian, Ahmad Ali Sabetan Shirazi

Genetic

Analysis of the Regulatory Effects of lncRNAs on Kidney Tissue in Ascites Susceptible Broiler 235

Kasra Ahmadian, Mohammadreza Nassiri, Karim Hasanpur3, Ali Javadmanesh

Genome-Wide Association Study Based on Mega-Analysis to Detect Genomic Regions Associated with Prolificacy in Sheep 249

Hossein Mohammadi

Evaluation of Quality Characteristics of Silk Thread in Iranian Silkworm Hybrids 259

Seyed Hossein Hosseini Moghaddam , Ramin Abdoli, Kamran Mahfouzi

Expression Analysis of Candidate Genes in White and Black Spots of Skin Tissue in Lori Bakhtiari Sheep 277

Khadijeh Moradi, Mustafa Muhaghegh Dolatabady, Javad Habibizad

Physiology

Effect of Administration of Acepromazine Combined with Multi vitamin and Amino Acids Complex on Fertility Outcome, Blood Hematological and Biochemical Alterations and the Oxidative Stress Generated by Laparoscopic AI in Ewes 287

Abbas Farahavar, Hamed Ahmadinejad, Daryush Aliour, Hasan Aliarabi

Effect of Coconut Milk in Extender on Ram Sperm Quality Post Freezing and Thawing Process 303

Sara Rahmati, Seyyed Mojtaba Mousavi, Ali Forouharmehr