



نشریه علمی پژوهش‌های علوم دامی ایران

(شماره پیاپی: ۵۶)

شاپا: ۳۱۰۶-۲۰۰۸

عنوان مقالات

نقدیه نشخوارکنندگان

۱۷۷ اثرات جیره‌ای بودر تفاله اناز با یا بدون آنزیم تانن آز بر عملکرد رشد و برخی فراسنج‌های خونی برده‌های لر محالی.....
فرزاد میرزائی احمد، قشلاق، علی نوری، بهمن نویدشاد، لیلا کلویانی قیسی، سمیرا کرمانی جبهدار

۱۹۱ بررسی متادیر باقی مانده عناصر سنگین سرب، کادمیوم، کروم، آرسنیک و نیکل در شیر و بافت‌های بدن
گاوهای شیری هلشتاین.....
احمد داوطلب زرقی، مسلم باشتی، عباسعلی ناصریان، مهرداد مهری

۵۰۵ اثرات سطح و منبع مختلف روشن بر عملکرد رشد و تولیدمثلی، فاکتورهای خونی و قابلیت هضم مواد
بنفدی میش‌های کردی.....
مسعود دینارخواه، موسی وطن دوست

نقدیه طیور

۵۱۷ تأثیر زنجبیل بر کیفیت باروری و جوجه‌درآوری اسپرم بنجمد- ذوب شده در خروس مادر گوشتی.....
خلیل میرزاده، امین کاظمی زاده

۵۳۱ اثر بیوجار پسماند تر شهری، پروبیوتیک و ژنولیت بر بهبود عملکرد، ایمنی و کیفیت گوشت
جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی.....
شکوفه حسینی، علی خطیب جو، حسن شیرزادی، یحیی محمدی، محمد امیر کریمی ترشیری، داغخنده رحیمی

ژنتیک

۵۴۹ تأثیر جایگاه ژنی هورمون رشد بر افزایش وزن غذای بومی.....
قرین آلیاسی زرین‌نمایی

۵۵۹ فرآیند داده‌های بیانی RNA-Seq و Microarray برای شناسایی ژن‌های مؤثر در رشد و نمو عضله گوسفند.....
فهیبه محمدی، محسنی طهمورث‌پور، علی جوانمشتی

۵۷۲ بررسی ردپای انتخاب و هتئراسی ژن در برخی نژادهای گوسفند اهلی و وحشی ایران.....
محمد بن‌عم، محمد رضا نصیری، مهیار حیدری‌پور، علی جوانمشتی

۵۸۷ مقایسه ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی متفاوت در پویش ژنومی وزن‌دهی شده چند جمعیتی.....
سید مصطفی مظلوم و محمدمهدی شریعتی

۶۰۱ برآورد طول عمر تولیدی حقیقی و همبستگی آن با تولید شیر در گله‌های صنعتی گاو شیری ایران.....
سعید مختارزاده، محمدرضا سجایی و عبدالرضا صالحی

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 ۱۳۸۸/۴/۳۰ 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 ۱۵ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۲

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: دکتر حسن نصیری مقدم

سر دبیر: دکتر رضا ولی زاده

اعضای هیئت تحریریه:

دانشگاه فردوسی مشهد	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دکتر رضا ولی زاده
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دکتر محسن دانش مسگران
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان	استاد تغذیه نشخوارکنندگان	دکتر مرتضی چاجی
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد تغذیه طیور	دکتر حسن نصیری مقدم
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد تغذیه طیور	دکتر ابوالقاسم گلیان
دانشگاه تبریز	استاد تغذیه طیور	دکتر حسین جانمحمدی
دانشگاه شهرکرد	استاد تغذیه طیور	دکتر فریبرز خواجعلی
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد تغذیه طیور	دکتر احمد حسن آبادی
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان	استاد تغذیه طیور	دکتر بهروز دستار
دانشگاه شهرکرد	دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد	دکتر نصراله پیرانی
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دکتر محمدرضا نصیری
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دکتر مجتبی طهمورث پور
دانشگاه مکواری، استرالیا	استاد ریاضیات و آمار	دکتر حسن دوستی
دانشگاه فردوسی مشهد	استاد ژنتیک و اصلاح نژاد	دکتر سعید زره داران
دانشگاه گوتلف، کانادا	دانشیار ژنتیک	دکتر مهدی سرگلزایی

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

علوم دامی ایران. صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۱۶۳

نمابر: ۰۵۱-۳۸۷۸۷۴۳۰

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

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

این نشریه در پایگاه های زیر نمایه می شود:

پایگاه استنادی جهان اسلام (ISC) پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)

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

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

صفحه	تغذیه نشخوار کنندگان
۴۷۷	اثرات جیره‌ای پودر تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز بر عملکرد رشد و برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های نر مغانی فرزاد میرزائی آقچه قشلاق، علی نوری، بهمن نوید شاد، لایلا کاوایانی فیضی، سمیرا کرامتی جبه‌دار
۴۹۱	بررسی مقادیر باقی‌مانده عناصر سنگین سرب، کادمیوم، کروم، آرسنیک و نیکل در شیر و بافت‌های بدن گاوهای شیری هلشتاین احمد داوطلب زرقي، مسلم باشتی، عباسعلی ناصریان، مهرداد مهری
۵۰۵	اثرات سطح و منبع مختلف روغن بر عملکرد رشد و تولیدمثلی، فاکتورهای خونی و قابلیت هضم مواد مغذی میش‌های کردی مسعود دیدارخواه، موسی وطن دوست
	تغذیه طیور
۵۱۷	تأثیر زنجبیل بر کیفیت باروری و جوجه‌درآوری اسپرم منجمد- ذوب شده در خروس مادر گوشتی خلیل میرزاده، امین کاظمی‌زاده
۵۳۱	اثر بیوجار پسماند تر شهری، پروبیوتیک و ژئولیت بر بهبود عملکرد، ایمنی و کیفیت گوشت جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمايي شکوفه حسونند، علی خطیب جو، حسن شیرزادی، یحیی محمدی، محمد امیر کریمی ترشیزی، درخشنده رحیمی
	ژنتیک
۵۴۹	تأثیر جایگاه ژنی هورمون رشد بر افزایش وزن گازهای بومی قربان الیاسی زرین‌قیایی
۵۵۹	فرا تحلیل داده‌های بیانی RNA-Seq و Microarray برای شناسایی ژن‌های مؤثر در رشد و نمو عضله گوسفند فهیمة محمدی، مجتبی طهمورث‌پور، علی جوادمنش
۵۷۲	بررسی ردپای انتخاب و هستی‌شناسی ژن در برخی نژادهای گوسفند اهلی و وحشی ایران مجید بی‌غم، محمد رضا نصیری، مهیار حیدرپور، علی جوادمنش
۵۸۷	مقایسه ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی متفاوت در پویش ژنومی وزن‌دهی شده چند جمعیتی سید مصطفی مظلوم و محمد مهدی شریعتی
۶۰۱	برآورد طول عمر تولیدی حقیقی و همبستگی آن با تولید شیر در گله‌های صنعتی گاو شیری ایران سعید مختارزاده، محمدرضا سنجایی و عبدالرضا صالحی

Dietary Effects of Pomegranate Pomace Powder with or without Tannase Enzyme on Growth Performance and some Blood Parameters of Moghani Male Lambs

Farzad Mirzaei Aghjeh Gheshlagh^{1*}, Ali Nori², Bahman Navidshad¹, Leila kaviani Feizi³, Samira keramati Jabehdar⁴

1- Professor, Department of Animal Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2- M.Sc. Graduated Student of Animal Nutrition University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

3- Ph.D. Student of Animal Nutrition, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

4- Ph.D. Graduated Student of Animal Nutrition, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding Author's Email: f_Mirzaei@uma.ac.ir

How to cite this article:

Mirzaei Aghjehgheshlagh, F., Nori, A., Navidshad, B., kaviani Feizi, L., & karamati Jabehdar, S. (2023). Dietary effects of pomegranate pomace powder with or without tannase enzyme on growth performance and some blood parameters of Moghani male lamb. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 475-488. (in Persian with English abstract). <http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80199.1116>

Received: 03-01-2023

Revised: 28-02-2023

Accepted: 01-03-2023

Available Online: 07-06-2022

Introduction: One of the important by-products is the pomegranate pulps which is pulp left after pomegranate juice. The presence of significant amounts of biologically active compounds such as phenolic acid, flavonoids, and tannins in pomegranate fruit ensures its high nutritional value. Pomegranate peel is a part of the fruit that has very high antioxidant properties and contains high amounts of polyphenols such as tannins. There have been numerous reports of the negative effects of tannins on consumer animals. One of the compounds that can bind to tannins and reduce their harmful effects is the tannase enzyme. So, this study aimed to investigate the effects of using different levels of pomegranate pulp without or in combination with tannase enzyme in the diet of fattening lambs on performance, nutrient digestibility, and some blood parameters.

Materials and Methods: After preparing pomegranate pulp, drying it, and preparing tannase enzyme, 25 male Moghani lambs with an average weight of 30 ± 2 kg and the average age is about 7 months, were used in four treatments in a completely randomized design. experimental treatments include 1- control, 2- 2.5% pomegranate pulp powder, 3- 5% pomegranate pulp powder, 4- 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5- 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme. During the experimental period, the performance parameters including feed intake, weight gain, and feed conversion ratio were measured. The concentration of blood parameters and the activity of liver enzymes containing ALP, ALT, and AST in the blood of lambs were determined. The Data obtained were analyzed using SAS (9/1) statistical software.

Results and Discussion: The experimental treatments demonstrated no significant impact on the weight gain and feed intake of the lambs. However, when examining the amount of feed consumption and daily feed consumption, higher values were observed during the second 30 days of the rearing period in comparison to the initial 30 days. While nutrient digestibility remained largely unaffected, a notable trend in the digestibility of dry matter was observed. Further comparisons between treatments revealed a higher digestibility of organic matter, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and ash in the group receiving 2.5% pomegranate pomace. These findings provide insights into the potential influence of pomegranate pomace supplementation on



specific aspects of nutrient utilization in lamb diets. Fat in the treatment of 2.5% pomace with enzyme and digestibility of crude protein was higher in the treatment of 5% pomace with the enzyme. The comparison of different pomace levels showed that the use of high levels of pomegranate pomace (5%) increased blood glucose and the lowest blood urea concentration was obtained by feeding 5% pomace. The lowest concentrations of HDL and LDL in the blood also belonged to the control treatment. The use of tannase enzymes in the diet also increased the concentration of glucose parameters and decreased blood urea. The highest amount of glucose of the studied lambs were observed in the first thirty days of sampling. In the present study, the use of pomegranate pomace increased glucose in both rearing periods and decreased blood triglyceride levels in the second rearing period. Alanine phosphatase (ALP) enzyme activity was significant in the second period, the breeding period ($P<0.05$). The highest level of activity of this enzyme was observed in the blood of lambs fed with 2.5% of dung. The activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) was not significant between sampling periods ($P<0.05$). Feeding different levels of pomegranate pomace powder with or without tannase enzyme had no significant effect on blood malondialdehyde concentration as an antioxidant index of the blood of fattening lambs. However, the comparison between the experimental treatments showed that the highest level of this index was found in the blood samples obtained from lambs fed with a diet containing 5% of pomegranate pomace powder + 0.05% of the dry matter of the tannase enzyme diet.

Conclusion: The inclusion of different levels of pomegranate pomace in the diet led to a significant difference in the activity of the alanine phosphatase enzyme among the experimental treatments ($P<0.05$) and increased blood glucose ($P<0.05$). None of the functional parameters, including weight gain, and feed consumption, were affected by the use of pomegranate pulp with or without tannase enzyme during the entire experimental period. However, the food conversion coefficient improved in the treatments containing pomegranate pomace with tannin enzyme. The highest amount of antioxidant index related to the diet containing 5% of pomegranate pomace powder + 0.05% of the diet's dry matter was tannase enzyme. Therefore, the level of 5% of pomegranate pomace along with the tannase enzyme increases animal health and improves animal growth performance.

Keywords: Blood parameters, Fattening lamb, Growth performance, Pomegranate pulp, Tannase

اثرات جیره‌ای پودر تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز بر عملکرد رشد و برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های نر مغانی

فرزاد میرزائی آقچه قشلاق^{۱*}، علی نوری^۲، بهمن نوید شادا^۱، لایلا کاویانی فیضی^۳، سمیرا کرامتی جبه‌دار^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثرات جیره‌ای سطوح مختلف پودر تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز بر عملکرد و برخی پارامترهای خونی بره‌های پرواری انجام شد. بدین منظور از ۲۵ رأس بره نر مغانی با متوسط وزن 2 ± 30 کیلوگرم و میانگین سنی حدود هفت ماهه، در پنج تیمار و پنج تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: گروه ۱ (شاهد، جیره عاری از تفاله انار و آنزیم)، تیمار ۲ (جیره حاوی ۲/۵ درصد پودر تفاله انار)، تیمار ۳ (جیره حاوی ۵ درصد پودر تفاله انار)، تیمار ۴ (جیره حاوی ۲/۵ درصد پودر تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز) و تیمار ۵ (جیره حاوی ۵ درصد پودر تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز) و پذیرش) پارامترهای عملکردی دام شامل میزان مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن اندازه‌گیری و ضریب تبدیل غذایی محاسبه شد. همچنین جهت تعیین، غلظت فراسنجه‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی در روزهای ۳۰ و ۶۰ دوره پرورشی نمونه‌گیری انجام شد. گنجاندن سطوح مختلف تفاله انار در جیره منجر به تفاوت معنی‌دار فعالیت آنزیم آلانین فسفاتاز و افزایش گلوکز خون در بین تیمارهای آزمایشی شد ($P < 0.05$). همچنین باعث کاهش اوره خون شد. هیچ یک از پارامترهای عملکردی شامل افزایش وزن، مصرف خوراک در کل دوره آزمایشی تحت تأثیر مصرف تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز قرار نگرفت. اما ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی تفاله انار با آنزیم تانن‌آز بهبود یافت. بیشترین میزان شاخص آنتی‌اکسیدانی مربوط به جیره حاوی ۵ درصد پودر تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز بود. بنابراین سطح ۵ درصد تفاله انار در کنار آنزیم تانن‌آز سبب افزایش سلامت دام و بهبود عملکرد رشد حیوان می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: بره پرواری، تانن‌آز، تفاله انار، عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی

مقدمه

امروزه تأمین غذا از جمله مشکلات پیش روی بشر بوده است که با روند افزایش جمعیت از یک سو و محدودیت‌های آب و خاک از سوی دیگر، باعث شده است تا حل مشکلات تأمین غذا به‌طور جدی مورد توجه قرار گیرد (Jabbar Naser, 2010). بسیاری از محصولات جانبی صنایع به‌عنوان خوراک دام مطرح هستند که یکی از این

محصولات جانبی، تفاله باقی‌مانده پس از آبیگری انار است. انار میوه مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که از سه بخش دانه (سه درصد)، بخش آبدار (۳۰ درصد) و پوسته و بافت‌های درونی (حدود ۶۷ درصد) تشکیل می‌شود (Walum, 1998). تولید سالیانه انار در ایران ۷۰۰ هزار تن در سال است که میزان تولید انار ساوه حدود ۱۷۰ هزار تن در سال بوده و میزان تولید سالیانه پوسته انار در ایران بیش از ۵۰۰ هزار تن است (Fadavi et al., 2006; Mueller-Harvey, 2006). این میوه به‌میزان زیادی در جهان مصرف می‌شود، به خصوص در صنعت آبمیوه‌گیری، که در آن منجر به انباشت مقادیر زیادی از پوسته میوه می‌شود (Al-Dujaili and Smail, 2012). پوسته انار بخشی از میوه است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته و حاوی مقادیر فراوانی از پلی‌فنول‌ها از جمله تانن است (Li et al., 2006). صادق و همکاران (Sadq et al., 2016) گزارش

۱- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳- دانشجوی دکتری تغذیه دام دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۴- دانش آموخته دکتری تغذیه دام دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
* - نویسنده مسئول: (Email: f_Mirzaei@uma.ac.ir)
<http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80199.1116>

تغذیه سطوح مختلف پودر تفالانار با یا بدون آنزیم تعدیل‌کننده اثرات سوء تانن در بره‌های پرواری و بررسی اثرات افزودن آن‌ها به جیره بر عملکرد، فراسنج‌های خونی و برخی خصوصیات لاشه بره‌های پرواری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در واحد گوسفندداری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی در بهار ۱۳۹۸ انجام شد. تفالانار (شامل پوسته و هسته) از کارخانه انار ایران واقع در شهرستان ساوه تهیه شد. پس از انتقال به دانشکده در سالی مسقف و به دور از تابش نور آفتاب پهن شده و به مدت دو هفته خشک شد. سپس با استفاده از دستگاه علوفه خردکن ثابت، آسیاب شده و پودر حاصل شده تا زمان استفاده در محلی تاریک و خنک نگهداری شد. مقدار ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، لیاف خام و خاکستر پوسته انار به ترتیب برابر ۹۲/۳۰، ۴/۱۶، ۱/۵۵، ۱۷/۳۵ و ۴/۶۲ درصد بود و تفالانار جایگزین تفالانار چغندر شد. آنزیم تانن‌آز مورد استفاده از شرکت صنایع غذایی کیکومان (Kikkoman) واقع در کشور ژاپن خریداری شد. این آنزیم حاوی تانن آسیل هیدرولاز (500 U/g, EC 3.1.20) با خلوص ۹۵ درصد بود. در این آزمایش، تعداد ۲۵ رأس بره نر مغانی با میانگین سنی حدود هفت ماهه با متوسط وزن بدن 30 ± 2 کیلوگرم خریداری شده و در جایگاه‌های انفرادی با ابعاد 4×5 متر با بستری از پوشال و خاک اره نگهداری شدند. برای انجام آزمایش، بره‌ها پس از هشت ساعت گرسنگی وزن‌کشی، سپس بر اساس وزن اولیه و به صورت تصادفی به پنج گروه با پنج تکرار تقسیم شده و سپس هر گروه به‌طور تصادفی به یکی از جیره‌های آزمایشی اختصاص داده شدند. مدت زمان آزمایش ۷۴ روز که شامل ۱۴ روز دوره عادت‌پذیری بره‌ها به جیره‌های آزمایشی بود. قبل از شروع دوره پرورشی بره‌ها علیه بیماری آنتروتوکسمی و اکسینه شده و داروی ضد انگل نیکولوزاماید و لورامیزول به فاصله زمانی دو هفته جهت کنترل انگل‌های داخلی و خارجی دریافت کردند. تیمارها شامل گروه ۱ (شاهد، جیره عاری از تفالانار و آنزیم)، تیمار ۲ (جیره حاوی ۲/۵ درصد پودر تفالانار)، تیمار ۳ (جیره حاوی ۵ درصد پودر تفالانار)، تیمار ۴ (جیره حاوی ۲/۵ درصد پودر تفالانار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز) و تیمار ۵ (جیره حاوی ۵ درصد پودر تفالانار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز) بودند. جیره‌های آزمایشی به‌وسیله نرم‌افزار CNCPS گوسفندی با نسخه ۶/۱ و براساس احتیاجات غذایی بره با وزن اولیه حدود ۳۰ کیلوگرم و افزایش وزن روزانه ۲۲۰ گرم تنظیم شد.

نمودند، تغذیه یک درصد پوسته انار منجر به افزایش معنی‌دار قابلیت هضم ماده خشک، پروتئین خام، عصاره عاری از ازت و عصاره اتری در بره‌ها شد. در کنار اثرات مفیدی تانن‌ها در تغذیه دام، این ترکیبات دارای اثرات منفی نیز هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش خوش‌خوراکی به دلیل بدمزگی و گس بودن، افت مصرف خوراک، کاهش بازدهی مواد خوراکی مصرفی دام به‌ویژه پروتئین‌های جیره و در نتیجه، کاهش رشد دام و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌ها اشاره کرد (Zare, 2015). تانن بر تخمیر شکمبه، قابلیت هضم مواد خوراکی و میزان گاز تولیدی شکمبه مؤثر است (Makkar et al., 1989). در واقع، این ترکیبات قابلیت اتصال میکروب‌های شکمبه به مواد غذایی مصرفی را کاهش، در نتیجه سبب کاهش تجزیه‌پذیری خوراک در شکمبه کاهش مصرف خوراک و افت عملکرد دام را در پی داشت (Makkar et al., 1989).

گزارشات متعددی مبنی بر اثرات منفی تانن‌ها بر دام‌های مصرف‌کننده وجود دارد (Mueller-Harvey, 2006). در همین راستا، استفاده از فرآورده‌های فرعی حاوی تانن در جیره بره‌های پرواری تا سطح ۲۰ درصد ماده خشک تأثیر معنی‌داری بر مصرف خوراک ندارد، اما سطح ۳۰ درصد موجب کاهش معنی‌دار مصرف خوراک می‌شود (Sreelatha and Padma, 2009). از جمله ترکیباتی که قابلیت اتصال به تانن‌ها و کاهش اثرات سوء آن‌ها را دارد، آنزیم تاننازاً می‌باشد. تانناز اساساً در هیدرولیز تانن‌های قابل هیدرولیز از طریق هیدرولیز اتصالات استری، در تانیک اسید و تسهیل آزاد شدن اسید گالیک و گلوکز نقش دارد. این فعالیت هیدرولیتیک به دلیل به دام انداختن اتصالات استری، توانایی اتصال تانن به مولکول‌های پروتئین را کاهش داده، در نتیجه از به دام افتادن ماکرومولکول‌ها ممانعت می‌کند (Mahapatra et al., 2005). افزایش هیدرولیز ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا و ساختار پیچیده با هدف افزایش و بهبود قابلیت هضم و کاهش اثرات منفی آن‌ها صورت می‌گیرد (Chamorro et al., 2013). گزارش شده است، تانن‌آز در عصاره انار ۲۵ درصد از تانن را بدون اثرات منفی بر کیفیت و خصوصیات بیوشیمیایی تجزیه کرده است. رافووانشی و همکاران (Raghuwanshi et al., 2014) آنزیم تانن‌آز را به جیره حاوی کاه گندم و قارچ سفید در گاوهای شیری اضافه نموده و نتیجه‌گیری کردند که با اضافه نمودن آنزیم تانن‌آز میزان مصرف خوراک در گاوهای شیری افزایش یافت. با توجه به تولید قابل توجه انار و سطوح بالایی از فرآورده‌های جانبی مربوط به پوست و هسته آن در کشور و عدم استفاده مناسب از این فرآورده‌ها و اثرات سودمند تغذیه آن‌ها در تغذیه نشخوارکنندگان، از طرفی با توجه به محدودکننده بودن حضور برخی ترکیبات همچون تانن از نظر کاهش خوش‌خوراکی، انجام مطالعه‌ای جهت بررسی استفاده از آنزیم‌های مهارکننده این ترکیبات به‌صورت توأم با منبع تانن در جیره دام‌های نشخوارکننده لازم به نظر می‌رسد. لذا، مطالعه حاضر با هدف

جدول ۱- ارقام و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی (درصد ماده خشک جیره)

Table 1- Ingredients and chemical composition of experimental diets (percentage of dry matter in diet)

مواد خوراکی Feed ingredients	جیره های آزمایشی ^۱ Experimental diets ¹				
	شاهد (۱) Control (1)	2	3	4	5
یونجه Alfalfa	45	45	45	45	45
جو آسیاب شده Barley	33	31	30	31	30
کنجاله سویا Soybean meal	3	3	3	3	3
ذرت آسیاب شده Corn	10	9	4	4	4
سیوس گندم Wheat bran	3	3.5	8	9	8
پودر چربی Fat powder	4	4	3	3.5	3
سدیم بیکربنات Sodium bicarbonate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
کلسیم کربنات Calcium carbonate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
مکمل معدنی Vitamin-mineral supplement ²	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
نمک Salt	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
پودر تفاله انار Pomegranate pomace powder	-	2.5	5	2.5	5
آنزیم تانناز Tannase enzyme	-	-	-	0.05	0.05
ترکیب شیمیایی (%) Chemical composition					
انرژی قابل متابولیسم Metabolizable energy (Mcal/day)	229.83	230.23	231.19	230.23	231.19
ماده خشک Dry matter	92.28	91.54	91.58	91.88	93.68
ماده آلی Organic matter	92.5	92.1	91.3	92.2	91.6
پروتئین خام Crude protein	15.43	14.87	15.5	15.12	15.14
عصاره اتری Ether extract	8.75	9.35	8.75	9.6	8.79
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Nutrient detergent fiber	31.1	36.05	33.8	35	33.1
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	19.00	19.6	22.2	20.95	21.75
خاکستر خام Crude ash	7.5	7.6	7.7	7.6	7.7

چربی خام Crude fat	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
کلسیم (گرم در روز) Ca (g/day)	885	920	954	920	954
فسفر (گرم در روز) P (g/day)	332	331	320	331	320

۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

۲ حاوی: ویتامین A: 500000 واحد، ویتامین D₃: 100000 واحد، ویتامین E: 100 میلی‌گرم، منیزیم: ۱۹۰۰۰ میلی‌گرم، سدیم: ۶۰۰۰۰ میلی‌گرم، فسفر: ۹۰۰۰۰ میلی‌گرم، سلنیوم: یک میلی‌گرم، منگنز: ۲۰۰ میلی‌گرم، آهن: ۳۰ میلی‌گرم، مس: ۳۰۰ میلی‌گرم، کلسیم: ۱۸۰۰۰۰ میلی‌گرم، روی: ۳۰۰۰ میلی‌گرم، کبالت: ۱۰۰ میلی‌گرم، ید: ۱۰۰ میلی‌گرم

1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 dry matter of tannase enzyme, 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

2 Contains: Vitamin A: 500,000 U, Vitamin D₃: 100,000 U, Vitamin E: 100 mg, Magnesium: 19,000 mg, Sodium: 60,000 mg, Phosphorus: 90,000 mg, Selenium: 1 mg, manganese: 2000 mg, iron: 3000 mg, copper: 300 mg, calcium: 180,000 mg, zinc: 3000 mg, cobalt: 100 mg, iodine: 100 mg.

خاکستر نامحلول در اسید (AIA) محاسبه گردید. غلظت مواد مغذی در نمونه‌های خوراک و مدفوع به‌روش ون کولن و یانگ (Van Keulen and Young, 1977) تعیین شد. مقادیر قابلیت هضم ظاهری برای هر ماده مغذی به‌وسیله معادله زیر محاسبه گردید:

$$100 - \left[\frac{\text{درصد ماده مغذی در مدفوع}}{\text{درصد نشانگر در خوراک}} \times \frac{\text{درصد ماده مغذی در خوراک}}{\text{درصد نشانگر در مدفوع}} \right] = \text{قابلیت هضم}$$

برای جمع‌آوری نمونه‌های خون به‌ترتیب در روزهای ۳۰ و ۶۰ دوره پرورشی سه ساعت پس از وعده غذایی صبح از سیاهرگ وداج هر بره با استفاده سرنگ ۱۰ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد. خون گرفته شده در دو لوله جداگانه یکی حاوی هپارین برای به‌دست آوردن پلاسما و دیگری بدون هپارین برای جداسازی سرم ریخته شد. نمونه‌های خون در فلاسک حاوی یخ خشک به آزمایشگاه انتقال داده شد. از نمونه‌های خون جهت جداسازی سرم برای تعیین پارامترهای خونی و اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید استفاده شد. برای جداسازی پلاسما نمونه‌ها با دور ۳۵۰۰، به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انجام سانتریفیوژ نمونه‌های سرم و پلاسما به درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتر انتقال و تا زمان آنالیز فراسنج‌های مورد مطالعه در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. پارامترهای خونی شامل گلوکز، کلاسترول (LDL, HDL) و کلاسترول کل، تری گلیسیریدها، پروتئین کل (TP)، نیتروژن اوره‌ای خون (BUN)، آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, ALP) با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون و توسط دستگاه اتوآنالایزر (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد و غلظت مالون دی آلدئید در نمونه‌های سرم مطابق دستورالعمل کیت‌های تجاری رندوکس (RANDOX Laboratories Ltd. Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom) تعیین شد.

اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه محاسبه و میزان ماده خشک، خاکستر خام، پروتئین خام، ماده آلی از روش AOAC در جدول ۱ ارائه شده است (AOAC, 2000). خوراک‌دهی به دام‌ها در دو وعده غذایی و در ساعت نه صبح و پنج بعد از ظهر انجام شد، خوراک مصرفی روزانه طوری تنظیم می‌شد که باقی‌مانده خوراک در آخور حدود ۱۰ درصد خوراک داده شده به دام در هر روز باشد و میزان مصرف خوراک بر اساس اشتها تنظیم و حیوانات دسترسی آزاد به آب داشتند.

مقدار خوراک ارائه شده به دام به‌صورت روزانه و باقی‌مانده آن در روز بعد توزین و ثبت شد و پس از محاسبه میزان ماده خشک، بر اساس اختلاف وزن بین خوراک ارائه شده به دام و خوراک باقی‌مانده در صبح روز بعد، میزان ماده خشک مصرف روزانه محاسبه شد. وزن بدن بره‌های هر گروه به‌صورت انفرادی با استفاده از باسکول مدل binazir1500 kg با دقت ۲۰۰ گرم، هر دو هفته یک‌بار اندازه‌گیری شد و میزان افزایش وزن با استفاده از اختلاف وزن بره‌ها در ابتدا و انتهای هر دوره وزن‌کشی مشخص شد. وزن‌کشی قبل از توزیع خوراک وعده صبح انجام شد. ضریب تبدیل غذایی با تقسیم خوراک مصرفی بر میزان افزایش وزن بدن به‌صورت دوره‌ای محاسبه شد. نمونه‌های خوراک مربوط به هر بره به‌صورت دوره‌ای جمع‌آوری و سپس در انتهای دوره با یکدیگر مخلوط، آسیاب شده و آنالیز ترکیبات شیمیایی شامل ماده خشک، خاکستر خام، پروتئین خام، ماده آلی نمونه‌های هر تیمار به‌روش AOAC (۲۰۰۰) انجام شد. همچنین برای تعیین الیاف نامحلول در شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی از روش ون سوست و همکاران (Van Soest et al., 1991) استفاده گردید. جهت تعیین قابلیت هضم مواد مغذی جیره های آزمایشی نمونه‌گیری از خوراک مصرفی و مدفوع هر دام به‌صورت روزانه در طول هر دوره نمونه‌برداری انجام می‌گرفت. قابلیت هضم مواد مغذی و ماده خشک با استفاده از روش مارکر داخلی

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصله از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۹/۱) آنالیز شدند. آنالیز مربوط به داده‌های اندازه‌گیری شده با رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی به ترتیب مطابق مدل‌های آماری زیر انجام شد:

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

که در آن، Y_{ij} : متغیر وابسته، μ : میانگین داده‌ها و T_i : اثر تیمار، e_{ij} : خطای آزمایشی بود. مقایسات میانگین با سطح احتمال پنج درصد و با استفاده از روش مقایسات میانگین توکی انجام شد.

نتایج و بحث

اثرات تغذیه تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز بر عملکرد دوره‌ای بره‌های پرواری در جدول ۲ و ۳ آورده شده است. مطابق این دو جدول تیمارهای آزمایشی قادر به اثرگذاری بر افزایش وزن روزانه،

جدول ۲- میانگین و خطای استاندارد میانگین شاخص‌های عملکردی بره‌ها در ۳۰ روز اول دوره پرورش

Table 2- Average and standard error of the average performance indicators of lambs in the first 30 days of the breeding period

تیمار ^۱ Treatment ¹	1	2	3	4	5	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی دار شدن P-value
افزایش وزن (کیلوگرم) weight gain (kg)	4.33	5.14	5.04	7.65	4.59	1.06	0.22
مصرف خوراک feed intake (kg)	42.71	43.35	43.13	43.98	41.97	0.51	0.11
افزایش وزن روزانه (گرم) Daily weight gain (g)	144.33	171.33	168	255	153	35.56	0.22
مصرف خوراک روزانه (کیلوگرم) Daily feed intake (kg)	1.42	1.44	1.43	1.46	1.4	0.01	0.11
ضریب تبدیل غذایی Feed conversion ratio	11.03	10.53	9.28	7.14	9.61	1.80	0.59

^۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

^۱: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05% dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05% dry matter of tannase enzyme.

خوراک شد. غلظت‌های تانن بیش از ۵۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک جیره می‌تواند بر مصرف خوراک دارای تأثیر منفی باشد و غلظت‌های پایین‌تر مصرف خوراک را تحت تأثیر قرار ندهد (Barry, 1985)، دلیل این امر را میزان پایین تانن و به‌خصوص تانن متراکم تفاله دانه انار دانستند (Emami et al., 2015). شاباتای و همکاران (Shabtay et al., 2008) افزایش مصرف ماده خشک در نتیجه تغذیه عصاره تغلیظ شده انار را گزارش نمودند. دلیل این افزایش مصرف ماده خشک عدم تأثیر منفی تانن‌ها بر خوش خوراکی و بهره‌وری مصرف انرژی دام‌ها گزارش شده است. در مطالعه مشابهی توسط مدرسی و همکاران (Modaresi et al., 2015)، افزودن تفاله دانه انار به جیره

مطابق جدول ۳ در ۳۰ روز دوم دوره پرورش نیز کاهش نسبی مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی مشاهده شد با این تفاوت که بیشترین سطح مصرف خوراک و افزایش وزن در تیمار حاوی ۵ درصد تفاله انار با آنزیم مشاهده شد، با این حال این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) و همچنین در ۳۰ روز اول و دوم دوره پرورش بیشترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای بدون آنزیم مشاهده شد (تیمار ۱ و ۲) و در تیمار ۵ ضریب تبدیل غذایی بهبود یافت. طی مطالعه‌ای هرواس و همکاران (Hervas et al., 2003) نشان داد که مصرف خوراک تا سطح ۱/۵ درصد تانن تغییری بین تیمارها نداشت، اما مقادیر بالاتر تانن موجب کاهش معنی‌دار مصرف

قسمت عمده تانن تفاله انار از نوع قابل هیدرولیز است، لذا تقابل میان تانن قابل هیدرولیز و پروتئین جیره قابل انتظار نبوده (Broderick *et al.*, 1991) و این نوع تانن‌ها قابلیت مهار آنزیم پروتئاز را نداشته، در نتیجه تغذیه تفاله انار سبب اختلال در عملکرد دام نمی‌شوند (Zare, 2015).

بزرگاله‌ها فاقد تأثیر معنی‌دار بر افزایش وزن روزانه و وزن نهایی این دام‌ها بود. این محققین دلیل عدم تفاوت معنی‌دار وزن نهایی و افزایش وزن روزانه تیمارهای آزمایشی را مشابه بودن ماده خشک مصرفی و سطح مساوی پروتئین خام و انرژی متابولیسمی جیره‌های مربوط به تیمارهای آزمایشی دانستند. با توجه به اینکه عنوان شده

جدول ۳- میانگین و خطای استاندارد میانگین شاخص‌های عملکردی بره‌ها در ۳۰ روز دوم دوره پرورش

Table 3- Average and standard error of the average performance indicators of lambs in the second 30 days of the breeding period

تیمار ^۱ Treatment ¹	1	2	3	4	5	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی دار شدن P-value
افزایش وزن (کیلوگرم) weight gain (kg)	4.74	5.21	3.29	4.41	5.78	0.66	0.13
مصرف خوراک feed intake (kg)	50.04	50.05	49.39	51.31	50.46	0.76	0.51
افزایش وزن روزانه (گرم) Daily weight gain (g)	158	173.67	109.83	147	192.67	22.20	0.13
مصرف خوراک روزانه (کیلوگرم) Daily feed intake (kg)	1.67	1.66	1.64	1.71	1.66	0.02	0.52
ضریب تبدیل غذایی Feed conversion ratio	10.82	10.35	9.76	12.62	8.84	1.33	0.37

^۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

¹ 1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05% dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05% dry matter of tannase enzyme.

خشک و NDF در گاوهای تغذیه شده با ۴ درصد عصاره تغلیظ شده پوسته انار را گزارش نمودند. تفاوت در نتایج مطالعات مختلف در ارتباط با اثرات تفاله انار بر قابلیت هضم می‌تواند با تفاوت در نوع خصوصیات و نوع دام مصرف‌کننده این فرآورده مرتبط باشد (Emami *et al.*, 2015). به نظر می‌رسد، علت عدم تأثیر معنی‌دار تفاله انار بر قابلیت هضم مواد مغذی مطالعه حاضر نیز محتوی پایین تانن به‌ویژه تانن متراکم این فرآورده باشد.

مطابق اطلاعات جداول ۵ و ۶ تغذیه سطوح مختلف تفاله انار و نیز افزودن آنزیم تانن‌آز به جیره تأثیر معنی‌داری بر هیچ یک از فراسنجه‌های خونی نداشت. اما میزان گلوکز خون در ۳۰ روز اول دوره آزمایش به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با این وجود، مقایسه سطوح مختلف تفاله نشان داد که استفاده از سطوح بالای تفاله انار (۵ درصد) موجب افزایش گلوکز خون شد و کمترین غلظت اوره خون با تغذیه ۵ درصد تفاله حاصل شد. کمترین غلظت‌های HDL و LDL خون نیز متعلق به شاهد بود. استفاده از آنزیم تانن‌آز در جیره نیز موجب افزایش غلظت فراسنجه‌های گلوکز و کاهش اوره خون شد.

قابلیت هضم مواد مغذی در جدول ۴ نشان می‌دهد که با تغذیه تفاله انار در سطوح مختلف با یا بدون آنزیم تحت تأثیر قرار نگرفت. با این حال، مشاهده می‌شود که قابلیت هضم ماده خشک تمایل به معنی‌داری داشت. مقایسه بین تیماری حاکی از قابلیت هضم بالاتر ماده آلی، NDF، ADF و خاکستر در تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار بود. چربی در تیمار ۲/۵ درصد تفاله با آنزیم و قابلیت هضم پروتئین خام در تیمار ۵ درصد تفاله با آنزیم بالاتر بود. عدم تأثیر تیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم مواد مغذی مطالعه حاضر در توافق با مطالعه امامی و همکاران (Emami *et al.*, 2015) است و سطوح پایین و متوسط تانن (۲-۴ درصد ماده خشک) در جیره بازدهی تولید در نشخوارکنندگان را بدون افزایش مصرف خوراک بهبود می‌بخشد. در حالی که مقادیر بالای تانن می‌تواند مصرف خوراک و قابلیت هضم پروتئین و کربوهیدرات‌ها و عملکرد دام را از طریق اثرات منفی بر خوش‌خوراکی و هضم مواد مغذی کاهش دهد و این محققین نیز عدم تأثیر معنی‌دار تغذیه تفاله انار بر قابلیت هضم مواد مغذی در بزرگاله را گزارش نمودند. بر خلاف نتایج این مطالعه، شاباتای و همکاران (Shabtay *et al.*, 2012) افزایش معنی‌دار در قابلیت هضم ماده

جدول ۴- اثرات تغذیه تیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم مواد مغذی در بره‌های پرواری

Table 4- Feeding effects of experimental treatments on digestibility of nutrients in fattening lambs

تیمار ^۱ Treatment ¹	1	2	3	4	5	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی دار شدن P-value
ماده خشک (%) Dry matter (%)	72.17	72.67	68.04	74.95	72.17	1.35	0.05
ماده آلی (%) Organic matter (%)	73.62	74.04	71.96	73.47	73.45	1.42	0.86
چربی خام (%) Crude fat (%)	67.43	67.82	63.54	69.70	65.10	1.64	0.14
پروتئین (%) Protein (%)	50.72	53	53.44	52.12	56.29	1.32	0.45
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (%) Nutrient detergent fiber (%)	74.88	76.58	74.30	75.45	75.49	1.75	0.91
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (%) Acid detergent fiber (%)	51.87	58.83	53.72	52.45	56.43	2.1	0.18
خاکستر (%) Ash	55.58	58.02	54.47	57.31	53.63	1.40	0.21

^۱ ۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

¹ 1: Control, 2- 2.5% pomegranate pulp powder, 3- 5% pomegranate pulp powder, 4- 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5- 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

عمده تانن‌های تفاله انار از نوع قابل هیدرولیز است (Khosravi and Fathi Nasri., 2012)، قابلیت پایینی در تشکیل کمپلکس با پروتئین جیره و در نتیجه، کاهش تجزیه پروتئین دارند. در نتیجه، تأثیر معنی‌داری بر غلظت پروتئین، آلومین و نیتروژن آورده‌ای خون نداشت. سلام و همکاران (Sallam et al., 2019) نیز دلیل این کاهش را کاهش در نرخ تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه نسبت دادند.

مطابق با اطلاعات جداول ۵ و ۶ اثرات تغذیه سطوح مختلف پودر تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز اثر معنی‌داری بر غلظت مالون دی‌آلدئید خون به‌عنوان شاخص آنتی‌اکسیدانی خون بره‌های پرواری نداشت. اما مقایسه بین تیمارهای آزمایشی نشان داد که بیشترین میزان این شاخص در نمونه‌های خون به‌دست آمده از بره‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۵ درصد پودر تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز بود. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان متابولیت پراکسیداسیون لیپیدها در بدن بوده و برای ارزیابی آسیب اکسیداتیو غشا مورد استفاده قرار گرفته و آسیب‌های غشای ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد را منعکس می‌کنند (Ibrahim et al., 2008). همانند مطالعه حاضر، امامی و همکاران (Emami et al., 2015) عدم وجود تفاوت معنی‌دار در محتوای مالون دی‌آلدئید پلاسما، در نتیجه تغذیه تفاله انار را گزارش نمودند. همچنین بیان داشتند، افزایش سطح تفاله تا ۱۵ درصد موجب کاهش مالون دی‌آلدئید شد.

بالاترین مقدار گلوکز خون بره‌های مورد مطالعه در ۳۰ روز اول نمونه‌برداری مشاهده شد. در مطالعه حاضر، استفاده از تفاله انار موجب افزایش گلوکز در هر دو دوره پرورش و کاهش سطح تری‌گلیسیرید خون در دوره دوم پرورش شد. شچووویاک و همکاران (۲۰۱۷) افزایش گلوکز را به بهبود پروپیونات در شکمبه مرتبط دانستند (Szczechowiak et al., 2017). علاوه‌بر این کاهش در غلظت تری‌گلیسیرید خون به بهبود در فعالیت آنزیم لیپوپروتئین لیپاز که بر اکسیداسیون چربی مؤثر است نسبت داده شد. افزایش فعالیت این آنزیم باعث تغییر سطح اسیدهای چرب غیراستریفیه خون و کاهش تری‌گلیسیرید را به دنبال دارد. از عوامل مؤثر بر افزایش سطح کلسترول خون، افزایش نسبت استات به پروپیونات در شکمبه عنوان شده است (Ghasemi et al., 2016). در نتیجه، عدم تفاوت معنی‌دار کلسترول بین تیمارهای آزمایشی، یکسان بودن سطح علوفه جیره‌های آزمایشی است که موجب برابری نسبت استات به پروپیونات و عدم تفاوت معنی‌دار در سطح کلسترول خون بره‌های شده است. در توافق با یافته‌های این مطالعه قاسمی و همکاران (Ghasemi et al., 2016)، تانن متراکم در شکمبه قابلیت تشکیل کمپلکس با پروتئین‌های جیره را داشته و سبب کاهش میزان تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه در نتیجه کاهش آمونیاک و نیتروژن آورده‌ای خون می‌شود (Hagerman and Robbins, 1987). به نظر می‌رسد، به دلیل اینکه

جدول ۵- اثرات تغذیه تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری در ۳۰ روز اول دوره پرورش^۱

Table 5- Effects of experimental treatments feeding on the blood parameters of fattening lambs in the first 30 days of the breeding period¹

تیمار ^۲ Treatment ²	1	2	3	4	5	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی دار شدن P-value
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) Glucose (mg/dl)	78.2 ^{ab}	72.8 ^b	81.8 ^b	78.4 ^{ab}	86.6 ^a	3.35	0.09
تری گلیسیرید (میلی گرم بر دسی لیتر) Triglyceride (mg/dl)	31.6	30.4	24.4	32.4	43.4	5.01	0.15
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) Cholesterol (mg/dl)	69.8	75.4	66	77	78.2	4.86	0.36
لیپوپروتئین با چگالی بالا (میلی گرم بر دسی لیتر) HDL-cholesterol (mg/dl)	18.2	22	16.8	20.2	19	1.88	0.38
لیپوپروتئین با چگالی پائین (میلی گرم بر دسی لیتر) LDL-cholesterol (mg/dl)	45.28	47.32	44.32	50.32	50.52	3.85	0.70
پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر) protein(mg/dl)	7.68	7.52	7.54	7.56	7.5	0.23	0.98
اوره (میلی گرم بر دسی لیتر) Urea (mg/dl)	34.2	38.2	42	33	31.4	2.52	0.04
مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی لیتر) Malondialdehyde (Nmol/ml)	1.24	1.36	1.58	1.56	1.74	0.20	0.48

^۱ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. (P<0.05)

^۲: شاهد، ۱: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

^۱ Means within same row differs superscripts differ (P<0.05)

^۲ 1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

جدول ۶- اثرات تغذیه تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی بره‌های پرواری در ۳۰ روز دوم دوره پرورش

Table 6- Effects of experimental treatments feeding on the blood parameters of fattening lambs in the second 30 days of the breeding period

تیمار ^۱ Treatment ¹	1	2	3	4	5	سطح احتمال معنی دار شدن P-value	میانگین خطای استاندارد SEM
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) Glucose (mg/dl)	70.8	73.6	73.75	76.6	76.6	0.73	3.42
تری گلیسیرید (میلی گرم بر دسی لیتر) Triglyceride (mg/dl)	31.4	29.6	31	30	28.2	0.98	4.06
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر) Cholesterol (mg/dl)	61	79.6	76.25	80.4	79.4	0.25	6.74
لیپوپروتئین با چگالی بالا (میلی گرم بر دسی لیتر) HDL-cholesterol (mg/dl)	14.8	19.2	17	18.4	19	0.66	2.35
لیپوپروتئین با چگالی پائین (میلی گرم بر دسی لیتر) LDL-cholesterol (mg/dl)	39.92	54.48	53.05	56	54.76	0.16	4.90
پروتئین کل (گرم بر دسی لیتر) Total protein (mg/dl)	7.46	7.62	7.6	7.6	7.82	0.78	0.19
اوره (میلی گرم بر دسی لیتر) Urea (mg/dl)	27	26.4	23	26.8	25.4	0.75	2.37
مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی لیتر) Malondialdehyde (Nmol/ml)	1.3	1.52	1.47	1.22	1.46	0.34	0.12

^۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

^۱: 1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

اثرات تغذیه پودر تفاله انار با یا بدون آنزیم تانن‌آز بر فعالیت آنزیم‌های کبدی بره‌های پرواری در جدول ۷ و ۸ آورده شده است. مطابق جدول اثر تفاله انار بر فعالیت آنزیم آلانین فسفاتاز (ALP) در ۳۰ روز دوم دوره پرورش معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در خون بره‌های تغذیه شده با سطح ۲/۵ درصد تفاله مشاهده شد. فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) نیز بین دوره‌های نمونه‌برداری معنی‌دار نبود ($P < 0.05$).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا ممکن است با ترکیبات متنوع فنولی در قسمت‌های مختلف انار مرتبط باشد (Devatkal and Naveena, 2010; Gil et al., 2000). ترکیبات پلی‌فنولی با عمل به‌عنوان پراکسیل شکننده زنجیر که رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد از پراکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌کنند (Sreelatha and Padma, 2009). باید خاطر نشان کرد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پوسته انار نسبت به دانه بالاتر است (Guo et al., 2003). این مطالعات افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به تفاله انار را به دلیل وجود آنتی-اکسیدان‌های قدرتمند، ترکیبات ضدالتهابی، ویتامین E، استرونها، فنل‌ها و استروژن‌های طبیعی دانستند.

جدول ۷- اثرات تغذیه تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی بره‌های پرواری در ۳۰ روز اول دوره پرورش

Table 7- Effects of experimental treatments feeding on the blood hepatic enzymes of fattening lambs in the first 30 days of the breeding period

تیمار ^۱ Treatment ¹	1	2	3	4	5	میانگین خطای استاندارد SEM	سطح احتمال معنی دار شدن P-value
آلانین فسفاتاز (واحد بین‌المللی بر لیتر) ALP (IU/L)	116.8	108.8	114.4	100.8	94.4	6.77	0.14
آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر) ALT (IU/L)	16	16.4	19.6	15.6	24.4	2.31	0.07
آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر) AST (IU/L)	67.2	70.6	66.2	64.8	76	4.84	0.50

^۱: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

^۱1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

جدول ۸- اثرات تغذیه تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های کبدی بره‌های پرواری در ۳۰ روز دوم دوره پرورش^۱

Table 8- Effects of experimental treatments feeding on the blood hepatic enzymes of fattening lambs in the first 30 days of the breeding period in the second 30 days of the breeding period¹

تیمار ^۲ Treatment ²	1	2	3	4	5	SEM	P-value
آلانین فسفاتاز (واحد بین‌المللی بر لیتر) ALP (IU/L)	140.80 ^{ab}	87.20 ^b	171.00 ^{ab}	370.00 ^a	88.80 ^b	66.24	0.039
آلانین آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر) ALT (IU/L)	18.8	19	24	16.6	24.4	2.37	0.11
آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد بین‌المللی بر لیتر) AST (IU/L)	78.4	81	91.75	95.2	93.4	6.66	0.29

^۱ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$)

^۲: شاهد، ۲: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار، ۳: تیمار پنج درصد تفاله انار، ۴: تیمار ۲/۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز و ۵: تیمار ۵ درصد تفاله انار + ۰/۰۵ درصد ماده خشک جیره آنزیم تانن‌آز

¹ Means within same row differs superscripts differ ($P < 0.05$)

²1: Control, 2: 2.5% pomegranate pulp powder, 3: 5% pomegranate pulp powder, 4: 2.5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme 5: 5% pomegranate pulp powder + 0.05 % dry matter of tannase enzyme.

موسا (2011) و شاکری و همکاران (2008) و شاکری و همکاران (Shakeri et al., 2012) عدم تأثیر منبع تانن بر آنزیم‌های کبدی بز و گوسفندان و گوساله را گزارش

مطالعات یانز-رویز و همکاران (Yanez-Ruiz et al., 2006)، موسا (2011) و گتاچو و همکاران (Getachew et al., 2011)

ترتیب غلظت‌های بالای آنزیم‌های کبدی در خون در نتیجه عدم توانایی کبد در سمیت‌زدایی این ترکیبات است.

نتیجه‌گیری کلی

تغذیه جیره‌ای تفاله انار آسیاب شده به همراه آنزیم تانن‌آز بر اغلب پارامترهای مورد مطالعه از جمله عملکرد، برخی فراسنجه‌های خونی، قابلیت هضم مواد مغذی، شاخص آنتی‌اکسیدانی خون و خصوصیات لاشه بره‌های پرواری اثری نداشت. علاوه‌براین، مشاهده شد که افزودن آنزیم تانن‌آز به جیره حاوی منابع تانن می‌تواند منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش گلوکز خون در تیمارهای حاوی تفاله انار با آنزیم تانن‌آز شود. به‌طور کلی، بر اساس نتایج می‌توان گفت که استفاده از تفاله انار در کنار آنزیم تانن‌آز سبب افزایش سلامت دام و بهبود عملکرد رشد حیوان می‌شود.

نمودند. آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) آنزیمی است که در کبد ساخته شده و عمل انتقال گروه آمین بین ال‌آلانین و گلوتامات را میانجی‌گری می‌کند و در ارزیابی متابولیسم پروتئین در گاوهای شیری کاربرد و مقدار این آنزیم در زمان افزایش پروتئین مصرفی و کاتابولیسم بافتی پروتئین، در زمان آسیب یا مشکلات کبدی و نیز در زمان توازن منفی انرژی در خون افزایش می‌یابد (Zurek *et al.*, 1995). بر اساس این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که در اثر مصرف منبع تانن قابل هیدرولیز از تفاله انار میزان فعالیت ALT و AST کبد افزایش نیافته است، اما فعالیت ALP در ۳۰ روز دوم دوره پرورش افزایش یافت که ممکن است افزایش ALP در سرم در اثر صدمه به سلول‌های کبدی باشد. بوجیونی و همکاران اعلام کردند که تانن متراکم در روده جذب نشده، بنابراین می‌تواند اثرات مخربی بر متابولیسم اندام‌هایی مانند کبد داشته باشد (Buccioni *et al.*, 2015). این نویسندگان همچنین عنوان کردند که تانن‌های قابل هیدرولیز امکان تجزیه توسط میکروبه‌های شکمبه را دارند؛ بدین

References

- Al-Dujaili, E., & Smail, N. (2012). Pomegranate juice intake enhances salivary testosterone dose and improves mood and wellbeing in healthy men and women. *Endocrine Abstracts*, 28,3-13.
- AOAC International. (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Barry, T. N. (1985). The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. *British Journal of Nutrition*, 54(1),211-217. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19850106>
- Broderick, G. A., Wallace, R. J., & Orskov, E. R. (1991). Control of rate and extent of protein degradation. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds), *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Academic Press, Inc. San Diego, 541-592.
- Buccioni, A. Pauselli, M., Viti, C., Minieri, S., Pallara, G., & Roscini, V.. (2015). Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 98(2),1145-1156. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8651>
- Chamorro, S., Viveros, A., Centeno, C., Romero, C., Arija, I., & Brenes, A. (2013). Effects of dietary grape seed extract on growth performance, amino acid digestibility and plasma lipids and mineral content in broiler chicks. *Animal*, 7(4), 555-561. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731112001851>
- Devatkal, S. K., & Naveena, B. (2010). Effect of salt, kinnow and pomegranatefruit by-product powders on color and oxidative stability of raw ground goat meat during refrigerated storage. *Meat Science*, 85(2),306-311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.019>
- Emami, A., Ganjkanlou, M., Fathi-Nasri, M. H., Zali, A., & Rashidi, L. (2015). Pomegranate seed pulp as a novel replacement of dietary cereal grains for kids. *Small Ruminant Research*, 123(2-3),238-245. (In Persian). <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.001>
- Ghasemi, G. H., Fathi-Nasri, M. H., Modaresi, S., & Rashidi, L. (2016). The effect of replacing of some of cereal grains of diet with ensiled pomegranate seed pulp on dry matter intake and production performance of south Khorasan crossbred goats. *Journal of Animal Science Researches*, 2(1) 93-104. (In Persian).
- Getachew, G., Pittroff, W., Depeters, E. J., Putnam, D. H., Dandekar, A., & Goyal, S. (2008). Influence of tannic acid application on alfalfa hay: *In vitro* rumen fermentation, serum metabolites and nitrogen balance in sheep. *Animal*, 2(3), 381-390. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731107001486>
- Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48(10), 4581-4589. <http://dx.doi.org/10.1021/jf000404a>
- Guo, C. J., Yang, J. J., Wei, J. Y., Li, Y. F., Xu, J., & Jiang, Y. G. (2003). Antioxidant activities of pulp, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutritional Research*, 23(12), 1719-1726. <http://dx.doi.org/101016/j.nutres.2003.08.005>
- Hagerman, A. E. & Robbins, C. T. (1987). Implications of soluble tannin protein complexes for tannin analysis and plant defense mechanisms. *Journal of Chemistry and Ecology*, 13(5), 1243-1247.

- <http://dx.doi.org/10.1007/BF01020552>
14. Hervas, G., Frutos, P., Giraldez, F. J., Mantecon, A. R., & del Pino, M. C. A. (2003). Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science Technology*, 109(1-4), 65-78. [http://dx.doi.org/10.1016/s0377-8401\(03\)00208-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0377-8401(03)00208-6)
 15. Ibrahim, W. H., Habib, H. M., Chow, C. K., & Bruckner, G. G. (2008). Isoflavone-rich soy isolate reduces lipid peroxidation in mouse liver. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78(45), 217-222. (In Persian). <http://dx.doi.org/10.1024/0300-9831.78.45.217>
 16. Jabbar naser, H. (2010). Importance of conversion industry waste and agricultural waste in livestock and poultry feed production. *Livestock and Agro-Industry Magazine*, 124,89-98. (In Persian).
 17. Khosravi, F., & Fathi-Nasri, M. H. (2012). Effect of drying and ensiling of pomegranate seed pulp on its chemical composition and ruminal degradability parameters. *Animal Production*, 14 (2), 51-61. (In Persian).
 18. Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate pulp extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2), 254-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.033>
 19. Mahapatra, K., Nanda, R., Bag, S., Banerjee, R., Pandey, A., & Szakacs, G. (2005). Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori* Nakazawa. *Processes in Biochemistry*, 40 (10), 3251-3254.
 20. Makkar, H. P. S., Singh, B., & Negi, S. S. (1989). Relationship of rumen degradability with biomass accumulation, cell wall constituents and tannin levels in some tree leaves. *Animal Production*, 49(2), 299-303.
 21. Modaresi S. J., Valizadeh, R., Danesh-Mesgaran, M., & Fathi-Nasri, M. H. (2015). Effect of feeding pomegranate seed pulp silage on blood metabolites, carcass characteristics and performance of kids. *Journal of Ruminant Research*, 3(2): 77-91. (In Persian).
 22. Mousa, M. R. M. (2011). Effect of feeding *Acacia* as supplements on the nutrient digestion, growth performance, carcass traits and some blood constituents of Awassi lambs under the conditions of North Sinai. *Asian Journal of Animal Sciences*, 5(2), 102-117. <http://dx.doi.org/10.3923/ajas.2011.102117>
 23. Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86 (13), 2010-2037. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2577>
 24. Raghuvanshi, S., Misra, S., & Saxena, R. K. (2014). Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1186/2049-1891-5-13>
 25. Sadq, S. M., Ramzi, D. O. M., Hamasalim, H. J., & Ahmed, K. A. (2016). Growth performance and digestibility in Karadi lambs receiving different levels of pomegranate pulps. *Open Journal of Animal Sciences*, 6(01), 16. <http://dx.doi.org/10.4236/ojas.2016.61003>
 26. Sallam, S. M. A., Attia, M. F. A., Nour El-Din, A. N. M., El-Zarkouny, S. Z., Saber, A. M., El-Zaiat, H. M., & Zeitoun, M. M. (2019). Involvement of Quebracho tannins in diet alters productive and reproductive efficiency of postpartum buffalo cows. *Animal Nutrition*, 5(1), 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2018.08.003>
 27. Sreelatha, S. & Padma, P. (2009). Antioxidant activity and total phenolic con-tent of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Food Human Nutrition*, 64(4), 303-311. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
 28. Shakeri, P., Riasi, A., Alikhani, M., Fazaeli, H., & Ghorbani, G. R. (2012). Effects of feeding pistachio by-products silage on growth performance, serum metabolites and urine characteristics in Holstein male calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(6), 1022-1029. <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12005>
 29. Shabtay, A., Harel, A., Yaakov, T., Alla, O., Ayala, M., Pnina, W., Zwika, G., Yaira, C., Ariele, B., Ido, I., & Zohar, K. (2008). Nutritive and anti-oxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as novel beef cattle feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10063-10070. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8016095>
 30. Shabtay, A., Nikbachat, M., Zenou, A., Yosef, E., Arkin, O., Sneer, O., & Miron, J.. (2012). Effects of adding a concentrated pomegranate extract to the ration of lactating cows on performance and udder health parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 175(1-2), 24-32. <http://dx.doi.org/10.22059/jap.2012.32042>
 31. Szczechowiak, J., Szkudelska, K., Szumacher-Strabel, M., Sadkowski, S., Gwozdz, K., El-Sherbiny Kzłowska, M., Rodriguez, V., & Cieslak, A. (2017). Blood hormones, metabolic parameters and fatty acid proportion in dairy cows fed condensed tannins and oils blend. *Annals of Animal Science*, 18(1), 155-166. <http://dx.doi.org/10.1515/aoas-2017-0039>.
 32. Van Keulen, J., & Young, B. A. (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44(1): 282-287. <http://doi.org/10.2527/jas.1977.442282x>
 33. Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal's nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3592. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
 34. Walum, E. (1998). Artery stenosis (CAS) reduces common carotid intima-media thickness (IMT), blood pressure

- and LDL oxidation, Environmental Health Perspectives. *Clinical Nutrition*, 23(1), 423-433.
35. Yanez-Ruiz, D. R., Scollan, N. D., Merry, R. J., & Newbold, C. J. (2006). Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their soluble carbohydrate content. *British Journal of Nutrition*. 96(5), 861-869. <http://dx.doi.org/10.1017/bjn20061927>
 36. Zare, A. (2015). The effect of feeding silage pomegranate pulp (mixture of peel and seeds) and dried pomegranate seed pulp on the fattening performance of Mehrban lambs. M.Sc. Thesis, Shiraz University, Iran. (In Persian).
 37. Zurek, E., Foxcroft, G. R., & Kennelly, J. J. (1995). Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(9), 1909-1920. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76816-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76816-3)



Investigating the Residual Heavy Metals Lead, Cadmium, Chromium, Arsenic and Nickel in Milk and Body Tissues of Holstien Dairy Cows

Ahmad Davtalabzarghi¹, Moslem Bashtani^{2*}, Abbasali Naserian³, Mehrdad Mohri⁴

- 1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Birjand University. Birjand. Iran.
2- Professor, Department of Animal Science, Birjand University. Birjand. Iran.
3- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
4- Professor, Department of Veterinary Science, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author's Email: mbashtani@birjand.ac.ir

Received: 11-01-2023
Revised: 23-06-2023
Accepted: 27-06-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Davtalabzarghi, A., Bashtani, M., Naserian, A., & Mohri, M. (2023). Investigating the residual heavy metals lead, cadmium, chromium, arsenic and nickel in milk and body tissues of Holstien dairy cows. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 489-501. (in Persian with English abstract) . <https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79760.1119>

Introduction: Environmental pollution, including pollution caused by urban and industrial sewage, factories and vehicles, causes pollution of natural resources in the environment, including water and fodder. The entry of these elements into the body of animals and their accumulation increases their concentration in products and enters the human food chain. Contamination of milk, meat and other edible tissues of animals with heavy metals is also a worrying issue and threatens food hygiene and human health because these elements are not naturally present in edible tissues and even very small amounts of them can be cause severe side effects. Scientists have mentioned the main cause of contamination of meat and animal tissues is feeding them from contaminated fodder sources or rearing them near contaminated areas. In the studies conducted in different countries, the amounts of heavy elements were more than allowed.

Material and Methods: In order to investigate the amounts of heavy metals including lead, cadmium, chromium, arsenic and nickel in milk and body tissues of dairy cows in North Khorasan province, two experiments were conducted in three regions and the amounts of heavy metals in milk and body tissues of dairy cows using the device Inductively coupled plasma-atomic diffusion (ICP) was measured, and studied.

In the first experiment, three dairy cattle farms were selected from three regions, two farms were located in two regions at equal distances from large industries, and the third region was selected as a control region far from large industries. In each of the farms, 10 dairy cows (5 first lactation and 5 second lactation and above) was sampled and the amounts of elements were measured. In the second experiment, muscle, heart, liver, kidney and lung tissues were sampled from 5 dairy cows from each region that were removed and sent to the slaughterhouse for reasons such as mastitis and reproductive problems. Heavy metals, including lead, cadmium, chromium, arsenic and nickel, were measured in the tissues by an inductively coupled atomic diffusion plasma (ICP) device.

Result and Discussion: The initial experiment's findings indicate that the levels of arsenic, cadmium, and lead in the milk of Holstein cows remained unaffected by varying regions. However, there were significant regional impacts on the levels of chromium and nickel in the milk of Holstein cows. Furthermore, the concentrations of arsenic, cadmium, nickel, and lead in the milk of Holstein cows were not influenced by the age of the cows or the interaction between region and age. In contrast, the concentration of chromium exhibited sensitivity to age and the interaction between region and age. These nuanced insights highlight the diverse influences on trace metal concentrations in Holstein cow milk, providing valuable information for understanding



regional and age-related variations. The amount of arsenic, cadmium and lead metals in the thigh muscle tissue of Holstein cows in different regions was not significantly affected by regions. However, the amount of chromium and nickel in the thigh muscle tissue was significantly affected in different areas. The amount of arsenic, chromium, nickel and lead in the heart tissue was not significant in any of the regions (Shirvan, Esfrayen and Bojnoord). The amount of cadmium in the heart tissue of Holstein cows was significantly affected by different regions. Thus, the highest amount of cadmium in heart tissue was observed in Bojnoord region and the lowest in Esfrayen region. The amount of chromium, nickel and lead in the tissue of all Holstein cows in different regions was not affected. However, the amount of arsenic and cadmium in the kidney tissue was significantly affected in different areas (Shirvan, Esfrayen and Bojnoord). Based on the obtained results, there was no significant difference in the amount of arsenic, cadmium and lead in lung tissue in different regions. However, the amount of chromium and nickel in the lung tissue of Holstein cows was significantly affected in different regions. Chromium enters various environmental sources (air, water and soil) from a wide range of natural and human sources, the most of which is emitted from industrial activities. When heavy metals are present in the air, feed and water of animals, they eventually accumulate in their tissues.

Conclusion: While the levels of heavy metals did not exhibit significant differences across many investigated areas, it is noteworthy that the concentrations surpassed the standard values established for these metals in products like milk. The elevated concentrations raise concerns about the potential health implications associated with consuming products containing such heightened metal levels. An interesting observation emerges from the examination of elemental concentrations in tissues, irrespective of regions and distances. The lead element, in particular, demonstrated the highest concentrations, with the liver exhibiting the most notable accumulation compared to other tissues. This underscores the need for strategic interventions, and the consideration of solutions such as the application of absorbents to mitigate metal concentrations in dairy cattle products emerges as a viable recommendation. Implementing such measures could play a crucial role in ensuring the safety and compliance of dairy products with established standards.

keywords: Body tissues, Dairy cows, Heavy metals

مقاله علمی - پژوهشی

بررسی مقادیر باقی‌مانده عناصر سنگین سرب، کادمیوم، کروم، آرسنیک و نیکل در شیر و بافت‌های بدن گاوهای شیری هلشتاین

احمد داوطلب زرقی^۱، مسلم باشتنی^{۲*}، عباسعلی ناصریان^۳، مهرداد مهری^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶

چکیده

وجود عناصر سنگین در خوراک و آب مصرفی دام‌ها سبب آلودگی محصولات دامی و بروز مشکلات بهداشتی و سلامتی برای انسان شده که این موضوع نگران‌کننده و مهم است، لذا به‌منظور بررسی مقادیر باقی‌مانده عناصر سنگین شامل سرب، کادمیوم، کروم، آرسنیک و نیکل در شیر و بافت‌های بدن گاوهای شیری هلشتاین در استان خراسان شمالی دو آزمایش در سه منطقه طراحی و مقادیر عناصر فوق در شیر و بافت‌های بدن گاوهای شیری با استفاده از دستگاه پلاسما جفت شده القایی - نشر اتمی (ICP) اندازه‌گیری، و مورد مطالعه قرار گرفت. در آزمایش اول، سه واحد گاوداری شیری در فواصل مکانی یکسان از صنایع بزرگ استان انتخاب گردید و در هر واحد از شیر تعداد ۱۰ راس گاو شیری نمونه‌گیری و مقادیر عناصر فوق اندازه‌گیری گردید. در آزمایش دوم، از تعداد پنج راس از گاوهای شیری هر یک از مناطق فوق از بافت‌های عضله ران، قلب، کبد، کلیه و ریه‌های آن‌ها نمونه‌گیری و عناصر سنگین در بافت‌های فوق اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش اول نشان داد، میزان کروم در شیر گاوهای منطقه یک و میزان نیکل در شیر گاوهای منطقه دو به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر مناطق بود. نتایج آزمایش دوم نشان داد، میزان فلزات کروم و نیکل در بافت عضله ناحیه ران گاوهای منطقه یک و میزان کادمیوم در بافت قلب گاوهای منطقه سه به‌طور معنی‌داری بالاتر از سایر مناطق بود. میزان عناصر آرسنیک و کادمیوم در بافت کلیه و میزان کروم و نیکل در بافت ریه گاوهای هلشتاین نیز تحت تأثیر مناطق مختلف قرار گرفت، به‌طوری‌که میزان آرسنیک، کروم و نیکل در منطقه دو، و میزان کادمیوم در منطقه سه بالاتر از سایر مناطق بود. بدون در نظر گرفتن مناطق، بالاترین مقادیر عناصر در بافت‌ها مربوط به غلظت عنصر سرب بود و کبد بیشترین غلظت سرب را نسبت به سایر بافت‌ها داشت.

واژه‌های کلیدی: بافت‌های بدن، عناصر سنگین، گاو شیری

مقدمه

آلودگی‌های زیست‌محیطی شامل آلودگی‌های ناشی از فاضلاب‌های شهری و صنعتی، کارخانجات و وسایل نقلیه باعث آلودگی منابع طبیعی از جمله آب‌ها و علوفه‌ها می‌گردند. ورود عناصر سنگین به بدن حیوانات و تجمع آن‌ها باعث افزایش غلظت آن‌ها در تولیدات شده و به زنجیره غذایی انسانی وارد می‌شوند. شیر یک غذای کامل است که شامل پروتئین‌ها، مواد معدنی، چربی‌ها و قندهایی بوده که برای سلامت انسان مهم هستند (Pereira et al., 2012). شیر در پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها مفید می‌باشد که در صورت آلودگی به‌علت مصرف بالا در بین افراد جامعه به‌ویژه کودکان می‌تواند آسیب‌های جبران‌ناپذیری را موجب گردد. مطالعات نشان داده است، در مناطق شهری شهر فیصل‌آباد پاکستان که مزارع با فاضلاب‌های

۱- دانشجوی دوره دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

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

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

۴- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

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

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79760.1119>

فصل تابستان در هر سه منطقه نسبت به فصل زمستان بود (Vafa et al., 2018).

مهم‌ترین منابع کادمیوم که باعث آلوده شدن محیط می‌شوند خوشبوکننده‌ها، سوخت‌های فسیلی، پسماندهای شهری، پلاستیک‌ها و باتری‌ها می‌باشد. حداکثر غلظت مجاز کادمیوم در آب آشامیدنی یک میکروگرم در لیتر است. سفره‌های آب زیرزمینی به‌ندرت دارای کادمیوم بالایی هستند، مگر اینکه توسط پسماندهای صنعتی آلوده شوند. نوشیدن آب‌های دارای مقدار کم کادمیوم نیز باعث تجمع آن در بدن می‌شود (ATSDR, 2008). در مطالعه‌ای در ایران و شهر اصفهان غلظت کادمیوم در ماهیچه، کلیه‌ها و کبد گاوها اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که مقدار کادمیوم در بافت‌های این دام‌ها در بالاترین سطح مورد قبول و توصیه شده توسط اروپا قرار داشت (Rahimi and Rokni, 2008). در مطالعه‌ای اثرات افزودن سطوح ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم ماده خشک در تغذیه گوساله‌های پروار در مشهد مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد با افزایش میزان کادمیوم در جیره غلظت کادمیوم در بافت‌ها خصوصاً کبد و کلیه افزایش معنی‌داری نشان داد (Khorashadi Zadeh et al., 2017). در مطالعه‌ای در منطقه شهرکرد، میزان کادمیوم در شیر خام و شیر پاستوریزه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت، میزان کادمیوم در شیر خام ۲/۸۷ ppb و در شیر پاستوریزه ۱/۰۳ ppb گزارش شده است (Bonyadian et al., 2006). میزان مجاز کادمیوم در شیر خام بر اساس کدکس ۲۰۰۰، ۰/۰۱ ppm می‌باشد (Saber and Parviz, 2017).

آلودگی آب‌های سطحی با آرسنیک نیز به‌عنوان یکی از مشکلات زندگی امروزی است که به‌ویژه در کشورهای جهان سومی بیشتر مشاهده می‌شود. این عنصر از طریق مواد خوراکی مانند دانه برنج وارد بدن انسان شده و از طریق کاه برنج آلوده به آرسنیک و استفاده در تغذیه گاوها منجر به آلوده شدن بافت‌ها و اندام‌ها می‌شود. شیر تولیدی گاوهایی که در بنگلادش از شالیزارهای دارای آرسنیک بالا تغذیه شده بودند، ۰/۱۶ میلی‌گرم افزایش نشان داد که ۱۲ برابر حد مجاز آرسنیک در شیر است (Sambu and Wilson, 2008).

آکادمی ملی علوم (NRC) مقدار مجاز کروم در غذای روزانه یک فرد بالغ در طی روز را ۵۰ میکروگرم تعیین کرده است (NRC, 1996). نتایج برخی مطالعات نیز نشان می‌دهد که میانگین غلظت نیکل در شیر گاو و بز به‌ترتیب ۱۵ و ۱۳/۵ میکروگرم در کیلوگرم بود و مقدار نیکل موجود در کبد حدود ۲۳۱ میکروگرم در کیلوگرم گزارش شده، درحالی‌که مقدار نیکل موجود در بافت‌های ماهیچه‌ای حدود ۳۵۰ میکروگرم در کیلوگرم گزارش شده است (Korenekova et al., 2002).

کربن فعال، زئولیت و بنتونیت از جمله جاذب‌های استفاده شده جهت جذب سموم در خوراک دام و طیور می‌باشند (Huwig et al.,

شهری و صنعتی آبیاری می‌شدند، غلظت فلزات سنگین در خاک و گیاهان پرورش یافته در این مناطق بسیار افزایش یافته است، حیواناتی که از علوفه این مزارع استفاده کرده‌اند، مقادیر زیادی از فلزات سنگین در شیر و گوشت آن‌ها گزارش شده است (Najam et al., 2015). آلودگی گوشت و سایر بافت‌های خوراکی دام‌ها با فلزات سنگین نیز یک مسئله نگران‌کننده است و بهداشت غذا و سلامتی انسان را تهدید می‌کند، زیرا این عناصر به‌طور طبیعی در بافت‌های خوراکی وجود ندارد و حتی مقادیر بسیار کم آن‌ها نیز می‌تواند عوارض شدیدی ایجاد کند (Korenekova et al., 2002). به‌عنوان مثال، آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان بر اساس شواهدی که در مطالعات انسانی انجام شده است، برخی از فلزات سنگین را برای انسان سرطان‌زا می‌دانند و برخی از فلزات برای سیستم‌های حساس و در حال رشد سریع جنین‌ها، نوزادان و کودکان خردسال سمی هستند. سرب و جیوه مخصوصاً می‌توانند به‌راحتی از جفت عبور کرده و به مغز جنین آسیب برسانند (Series, 2009). دانشمندان علت اصلی آلودگی گوشت و بافت‌های حیوانی را تغذیه آن‌ها از منابع علوفه‌ای آلوده و یا پرورش آن‌ها در نزدیک مناطق آلوده ذکر کرده‌اند (Korenekova et al., 2002). در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی ارتباط سرب موجود در شیر خام با سرب موجود در آب شرب میزان سرب موجود در شیر و همچنین آب مصرفی گاوداری‌های شهر تهران تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام و ۱۰ نمونه آب مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد، میانگین غلظت سرب در شیر خام ۲۶۴ ppb بود که با توجه به حد استاندارد کدکس ۲۰۰۷ نشان‌دهنده آلودگی بیش از حد مجاز تمامی نمونه‌های شیر به سرب می‌باشد (Radmehr et al., 2010). در مطالعه دیگری در شهر کرد میزان سرب و کادمیوم در شیر خام و شیر پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد، میانگین غلظت سرب در شیر خام ۶۰/۷۲ ppb و در شیر پاستوریزه ۱۳/۵۷ ppb بوده است (Bonyadian et al., 2006). برخی مطالعات از تفاوت غلظت سرب در فصل تابستان نسبت به زمستان گزارش داده‌اند که افزایش میزان آن در تابستان را به مصرف بیشتر آب نسبت داده‌اند (Aslam, 2010). مطالعات نشان می‌دهد که در زمان تغذیه دام‌ها با علوفه آغشته به سرب بخش اصلی این فلزات سنگین مستقیماً وارد شیر نمی‌شوند و بدن همانند یک فیلتر بیولوژیک عمل کرده و بخش زیادی از سرب وارد شده جذب نمی‌شود و مقادیر جذب شده نیز ابتدا به استخوان‌ها، کبد و کلیه‌ها منتقل شده و تجمع می‌یابند و سپس از این بافت‌ها به شیر منتقل می‌شوند (Harding, 1995). در مطالعه‌ای، وفا و همکاران (Vafa et al., 2018) در گاوداری‌های اطراف شهر مشهد میانگین عنصر سرب در شیر گاوداری‌های سه منطقه را اندازه‌گیری کردند و میانگین میزان سرب را ۱/۱۳۵، ۰/۷۷۸ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر شیر گزارش کردند. همچنین، اندازه‌گیری سرب در شیر گاوها در فصل تابستان و زمستان حاکی از افزایش میزان سرب در

اسفراين و شيروان بدون مجاورت با صنايع انتخاب شد و در هر منطقه يك واحد گاوداري صنعتي جهت نمونه گيري شير انتخاب و تعداد ۱۰ راس گاو مورد نمونه گيري قرار گرفت. نمونه گيري در فصل بهار سال ۹۸ انجام و کليه نمونه هاي گرفته شده براي اندازه گيري عناصر ذکر شده فوق مورد آزمون قرار گرفتند. ۳۰ راس گاو انتخاب شده در مرحله اول شيردهي بوده و از ابتدای فصل بهار مورد تغذيه در شرايط يکسان قرار گرفته و در پايان هر ماه نمونه گيري از شير انجام گرديد. از ظروف پلاستيکی ۵۰ ميلي ليتري که در اسيد نيتريك ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شده و سپس با آب دو بار تقطير آب کشي شده اند، جهت نگهداري نمونه ها استفاده گرديد. نمونه هاي گرفته شده از دو وعده شيردوشي هر راس گاو در آزمايشگاه مخلوط شده و يك نمونه همگن از آن ها حاصل شد. در مجموع، ۹۰ نمونه گرفته شده (سه دوره يك ماهه) پس از آماده سازي غلظت فلزات سنگين آن ها به روش دانالاكشمي توسط دستگاه پلاسمای جفت شده القايي- نشر اتمي (ICP) اندازه گيري شد. نمونه گيري بر اساس روش های AOAC (AOAC, 1990) و اندازه گيري عناصر سنگين با استفاده از دستگاه ICP انجام گرديد (Dhanalakshmi and Gawdaman, 2013). ميزان فلزات سنگين در اقلام خوراکی و آب مورد استفاده در اين آزمون اندازه گيري در جدول ۱ زير آورده شده است.

تحقيقات نشان داده است، کربن فعال و جاذب های سموم قارچی قادر به جذب فلزات سنگين از جمله کادميوم می باشند. جاذب های مانند بنتونيت و کربن فعال کادميوم را به خود جذب می کنند. به طور کلی، جاذب های همانند بنتونيت، کائولن و زغال فعال به دليل سطح زياد و ظرفيت بالای جذب کاربرد فراواني دارند، به طوري که علاوه بر جاذب سموم قارچی جيره غذایی دام، برای حذف فلزات سمی مانند آرسنيک نیز استفاده می شوند (Hereshberger et al., 1971). با توجه به موارد مطرح شده، هدف از مطالعه حاضر، بررسی ميزان عناصر سنگين در شير و بافت های خوراکی بدن گاوهای شيري در حال پرورش در مناطق اطراف صنايع بزرگ همانند پتروشيمي، سيمان و فولاد بود تا در حد امکان از پرورش در اين مناطق خودداری شده و يا از روش های مناسب جهت کاهش آن ها استفاده گردد.

مواد و روش ها

در آزمون اول، مقدار فلزات سنگين (سرب، کادميوم، آرسنيک، کروم و نیکل) در شير گاوداري های استان خراسان شمالی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور سه منطقه در استان خراسان شمالی در شهرهای بجنورد با مجاورت کارخانه پتروشيمي خراسان و سيمان بجنورد، اسفراين در مجاورت کارخانه فولاد و لوله گستر

جدول ۱- ميزان فلزات سنگين در اقلام خوراکی و آب (ميلي گرم در کيلوگرم)

Table 1- The amount of heavy metals in feed and water (mg/kg)

مورد Item	سرب Pb	نيکل Ni	کروم Cr	کادميوم Cd	آرسنيک As
کنسانتره concentrate	1/953±0/1253	8/740±0/0294	1/770±0/0047	0/0313±0/001	1/4267±0/139
سيلاژ ذرت Corn silage	0/2787±0/0394	0/7357±0/0060	1/2467±0/0119	0/0117±0/0014	0/3503±0/0212
يونجه Alfalfa	0/7910±0/0019	1/7603±0/0010	1/0587±0/0385	0/0453±0/0007	0/5313±0/0180
آب Water	0/0147±0/0011	0/0027±0/0005	1/0047±0/0003	0/0±0	0/0053±0/0003

انتهای آزمون (از هر منطقه و در مجموع، ۱۵ راس گاو کشتار شده از همان گاوداري شهرستان های بجنورد، اسفراين و شيروان مورد نمونه گيري از بافت های داخلی (ريه، کبد، کليه، قلب و عضله سه سر ران) قرار گرفتند. گاوهای فوق به دلایلی همانند ورم پستان، مشکلات توليدمثلی، توليد پايين و جابجايي شيردان يا عوامل مشابه حذف شده بودند، از هر يك از بافت های ذکر شده به ميزان ۱۵ گرم نمونه برداری شد. و در مجموع، ۷۵ نمونه مورد آزمون قرار گرفت. نمونه گيري از بافت ها بر اساس دستورالعمل AOAC (AOAC, 2000) انجام و تمامی نمونه ها در ظروف درپوش دار پلاستيکی در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری و به آزمايشگاه منتقل گرديد.

داده های مربوط به آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رويه GLM نرم افزار SAS مورد تجزيه و تحليل آماری قرار گرفت. مدل آماری طرح به صورت زير می باشد (SAS, 2009).

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

که در آن، Y_{ij} : متغير وابسته، μ : میانگين کل، L_i : اثر منطقه، و e_{ij} : اثر خطای آزمایشی می باشند.

در آزمون دوم، ميزان فلزات سنگين (سرب، کادميوم، آرسنيک، کروم و نیکل) در بافت های بدن گاوهای شيري در استان خراسان شمالی مورد بررسی قرار گرفت. در اين آزمون تعداد پنج راس از گاوهای کشتار شده در طول فصل بهار (ابتدای آزمون تا

(SAS.Statistical.2009).

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

که در آن، Y_{ij} : متغیر وابسته، μ : میانگین کل، L_i : اثر مکان و e_{ij} : اثر خطای آزمایشی هستند.

شهرستان شیروان به‌عنوان منطقه ۱ بدون مجاورت با صنایع، شهرستان اسفراین به‌عنوان منطقه ۲ با مجاورت کارخانجات فولاد و لوله گستر اسفراین و منطقه ۳ شهرستان بجنورد با مجاورت کارخانجات سیمان و پتروشیمی خراسان نام‌گذاری شدند.

ظروف قبل از نمونه‌گیری به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۱۰ درصد اسید نیتریک غوطه‌ور شده و پس از آبکشی جهت نمونه‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از مراحل هضم و آماده‌سازی به روش اوپماک و همکاران با استفاده از دستگاه پلاسمای جفت شده القایی-نشر اتمی (ICP) مقادیر عناصر سنگین آن‌ها اندازه‌گیری گردید. (Oymac et al., 2017)

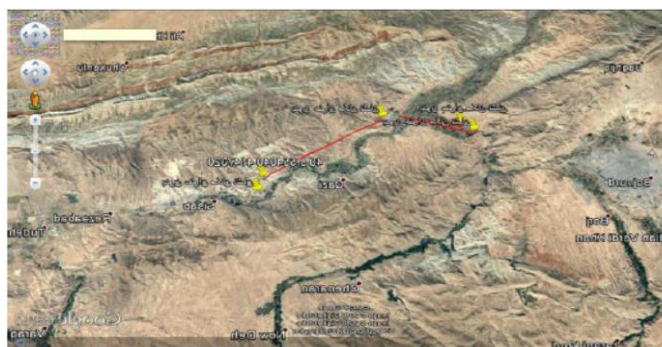
داده‌های مربوط به آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مدل آماری طرح به‌صورت زیر خواهد بود



شکل ۱- شیروان منطقه ۱ شاهد بدون مجاورت با کارخانجات
Figure 1- Shirvan district 1 Shahid without proximity to factories



شکل ۲- اسفراین منطقه ۲ در مجاورت کارخانه فولاد و لوله گستر
Figure 2- Esfrain area 2 area in the vicinity of Gostar Steel and Pipe Factory



شکل ۳- بجنورد منطقه ۳ در مجاورت کارخانجات پتروشیمی خراسان و سیمان
Figure 3- Bojnourd area 3 in the vicinity of Khorasan and Siman petrochemical factories

نتایج و بحث

مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر غلظت عناصر سنگین در شیر گاوها در جدول ۲ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان آرسنیک، کادمیوم و سرب در شیر گاوهای هلشتاین تحت تأثیر مناطق مختلف قرار نگرفت. با این حال، میزان کروم و نیکل در شیر گاوهای هلشتاین به طور معنی داری تحت تأثیر مناطق مختلف قرار گرفت ($P < 0.05$). به طوری که بیشترین میزان کروم در منطقه ۱ و بیشترین میزان نیکل در منطقه ۲ نسبت به سایر مناطق مشاهده شد. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۰.۵ پی پی ام را حداکثر سطح مجاز نیکل در شیر گزارش کردند (ISIRI, 2011). مطابق با نتایج به دست آمده از این آزمایش، پژوهشی بیان کرد که سطوح نیکل در شیر خام گاو جمع آوری شده از مناطق آلوده معمولاً بالاتر از آن هایی بود که از مناطق غیر آلوده جمع آوری شده بودند (Boudebouz et al., 2021). همچنین، سطح نیکل در نمونه های شیر خام گاو جمع آوری شده از گاوهای پرورش یافته در مجاورت

مناطقی که در آن ها معدن وجود داشت، بیشتر بود (Giri et al., 2020). به علاوه غلظت فلزات سنگین در شیر حیوانات با افزایش سن آن ها افزایش می یابد (Najarneshad et al., 2015). برخلاف نتایج این آزمایش، گاوهای شیردهی که در اطراف واحدهای صنعتی پرورش یافتند، غلظت های بالاتری سرب و کادمیوم در شیر آن ها وجود داشت، این افزایش غلظت فلزات سنگین با غلظت های بالاتر این آلاینده های سمی در علوفه و خاک مرتبط بود (Boudebouz et al., 2021). دلیل وجود تفاوت معنی دار نیکل و کروم در مناطق مختلف ممکن است به این دلیل باشد که، فلزات سنگین موجود در شیر ممکن است از ظروف شیر، در طی فرآوری، از طریق آب آلوده مورد استفاده برای کشاورزی، خوراک دام و محیط اطراف حیوانات تولیدکننده شیر به دست بیایند (Zain et al., 2016). با این حال، درجه آلودگی فلزات سنگین ثابت نیست و بسته به مسیرهای مواجهه، شرایط محیطی، تغذیه حیوان، مرحله شیردهی و نژاد حیوان متفاوت است (Safaei et al., 2021 ; Bousbia et al., 2019).

جدول ۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از نظر غلظت عناصر سنگین در شیر گاوها (میلی گرم/کیلوگرم)

Table 2- Comparison of the average of different treatments in terms of the concentration of heavy metals in milk of cows (mg/kg)¹

مورد Item	آرسنیک AS	کادمیم Cd	کروم Cr	نیکل Ni	سرب Pb
منطقه ۱ Area1	0.018	0.0005	0.037 ^a	0.005 ^b	0.074
منطقه ۲ Area2	0.021	0	0.025 ^b	0.006 ^a	0.075
منطقه ۳ Area3	0.022	0.0014	0.025 ^b	0.004 ^b	0.076
خطای استاندارد میانگین SEM	0.3808	0.2808	0.0004	0.0001	0.9326
مقدار احتمال P- value	0.0006	0.0006	0.0022	0.0003	0.0028

¹ میانگین های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$).
۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnoord)

میزان فلزات سنگین موجود در بافت قلب گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان آرسنیک، کروم، کادمیوم، نیکل و سرب در هیچ یک از مناطق (شیروان، اسفراین و بجنورد) در بافت قلب از لحاظ آماری معنی دار نبود. مطابق با نتایج این آزمایش، در تحقیقی که به منظور تعیین غلظت فلزات سنگین (کادمیوم، نیکل و سرب) در قلب گاو، گوسفند و مرغ در کشور عراق صورت گرفت، میزان هیچ یک از فلزات سنگین در قلب معنی دار نبود، اما از لحاظ عددی بیشترین میزان کادمیم در قلب گاو مشاهده شد (Al-Zuhairi et al., 2015). به علاوه، مطالعه ای به منظور ارزیابی غلظت فلزات سنگین (سرب، کروم و نیکل) در قلب گاو از کشتارگاه منتخب در کشور نیجریه انجام شد، نتایج نشان داد که غلظت فلزات تفاوت معنی داری نداشت (Omede et al., 2018). همچنین، در پژوهش دیگری به منظور تعیین غلظت فلزات سنگین (کروم، نیکل و سرب) در بافت قلب گاو، گوسفند، گاو میش، بز و مرغ در کشور پاکستان انجام شد، نتایج نشان داد که میزان اندازه گیری شده فلزات سنگین در بافت قلب از لحاظ آماری معنی دار نبود (Abdel-Salam et al., 2013). بیان شده است که حیواناتی که رها هستند و آزادانه چرا می کنند، غلظت بالایی از فلزات سمی را در اندام های خود جمع می کنند (Omede et al., 2018).

میزان فلزات سنگین موجود در بافت قلب گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۳ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان آرسنیک، کروم، کادمیوم، نیکل و سرب در هیچ یک از مناطق (شیروان، اسفراین و بجنورد) در بافت قلب از لحاظ آماری معنی دار نبود.

مطابق با نتایج این آزمایش، در تحقیقی که به منظور تعیین غلظت فلزات سنگین (کادمیوم، نیکل و سرب) در قلب گاو، گوسفند و مرغ در کشور عراق صورت گرفت، میزان هیچ یک از فلزات سنگین در قلب معنی دار نبود، اما از لحاظ عددی بیشترین میزان کادمیم در قلب گاو مشاهده شد (Al-Zuhairi et al., 2015). به علاوه، مطالعه ای به

جدول ۳- میزان فلزات سنگین موجود در بافت قلب گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف (میلی‌گرم/کیلوگرم)

Table 3- The amount of heavy metals in the heart tissue of Holstein cows in different areas (mg/kg) ¹

مورد Item	مناطق مختلف Different areas			خطای استاندارد میانگین SEM	مقدار احتمال P- value
	1	2	3		
آرسنیک AS	0.051	0.047	0.063	0.013	0.69
کادمیم Cd	0.015	0.013	0.022	0.003	0.09
کروم Cr	0.196	0.190	0.066	0.107	0.64
نیکل Ni	0.042	0.042	0.054	0.008	0.55
سرب Pb	0.142	0.092	0.129	0.048	0.76

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnoord)

منطقه دیگر به خود اختصاص داد. تجمع آرسنیک در حیوانات به نوع غذایی که مصرف می‌کنند، متفاوت است (Abdel-Salam *et al.*, 2013). غلظت کادمیوم در خوراک می‌تواند بر غلظت کادمیوم در بافت‌های حیوانی تأثیر بگذارد (Momodu *et al.*, 2019). در مطالعه‌ای که بر میزان غلظت فلزات سنگین در خوراک مصرفی از ۷۲ گاو از ۱۸ مزرعه در طول چهار فصل جمع‌آوری شد، نتایج نشان داد که محتوای کادمیم کلیه به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (Hashemi *et al.*, 2018).

میزان فلزات سنگین موجود در بافت کلیه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۴ گزارش شده است. نتایج نشان داد، میزان کروم، نیکل و سرب در بافت کلیه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف تحت تأثیر قرار نگرفت. اما میزان آرسنیک و کادمیوم در بافت کلیه به‌طور معنی‌داری در مناطق مختلف (شیروان، اسفراین و بجنورد) تحت تأثیر قرار گرفت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که کمترین میزان آرسنیک بافت کلیه در منطقه ۱ و بیشترین آن در منطقه ۲ مشاهده شد و منطقه ۳ بیشترین میزان کادمیوم در بافت کلیه را نسبت به دو

جدول ۴- میزان فلزات سنگین موجود در بافت کلیه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف (میلی‌گرم/کیلوگرم)

Table 4- The amount of heavy metals in the kidney tissue of Holstein cows in different areas ¹

مورد Item	مناطق مختلف Different areas			خطای استاندارد میانگین SEM	مقدار احتمال P- value
	1	2	3		
آرسنیک AS	0.014 ^b	0.075 ^a	0.047 ^{ab}	0.017	0.07
کادمیم Cd	0.161 ^b	0.090 ^b	0.499 ^a	0.088	0.01
کروم Cr	0.036	0.026	0.056	0.014	0.35
نیکل Ni	0.046	0.040	0.045	0.007	0.79
سرب Pb	0.221	0.201	0.211	0.063	0.98

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnoord)

میزان نیکل موجود در بافت کبد به طور معنی داری تحت تأثیر مناطق مختلف قرار گرفت ($P < 0.05$). به طوری که کمترین میزان کادمیوم و نیکل بافت کبد گاوهای هلشتاین در منطقه ۲ مشاهده شده، اما بیشترین میزان کادمیوم در منطقه ۳ و بیشترین میزان نیکل در منطقه ۱ مشاهده گردید.

کبد یکی از اندام‌های اصلی مورد استفاده برای ارزیابی آلودگی فلزات سنگین در حیوانات است که احتمالاً به دلیل نقش آن در سم‌زدایی از سمومی مانند فلزات سنگین است (Ubwa et al., 2017). همچنین بالا و همکاران (Bala et al., 2014) و آکان و همکاران (Akan et al., 2010) بیان کردند که فلزات سنگین در کبد بیش از هر عضوی از بدن تجمع می‌یابند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان کادمیوم در بافت کبد در گاو از نظر آماری معنی دار بود (Akan et al., 2010).

از طرفی، مشخص شده است که کادمیوم به آسانی توسط گیاهان از خاک جذب شده و به طور غیرمستقیم از طریق گیاه به حیوانات منتقل می‌شود (Hashemi et al., 2018). همچنین غلظت کادمیوم در مناطق کشاورزی می‌تواند تحت تأثیر کود فسفاته و آفت‌کش‌ها قرار گیرد (Radha et al., 2014). که علت غلظت بالای کادمیوم در کلیه ممکن است به این دلیل باشد که کلیه عملکرد دفعی را انجام می‌دهد و مواد سمی برای دفع از بافت‌های بدن به کلیه منتقل می‌شوند (Hashemi et al., 2018) در نتیجه، کادمیوم در بافت کلیه تجمع پیدا می‌کند.

میزان فلزات سنگین موجود در بافت کبد گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۵ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان آرسنیک، کادمیوم، کروم و سرب در بافت کبد گاوهای هلشتاین تحت تأثیر مناطق مختلف قرار نگرفت. با این حال،

جدول ۵- میزان فلزات سنگین موجود در بافت کبد گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف (میلی‌گرم/کیلوگرم)

Table 5- The amount of heavy metals in the liver tissue of Holstein cows in different areas ¹

مورد Item	مناطق مختلف Different areas			خطای استاندارد میانگین SEM	مقدار احتمال P- value
	1	2	3		
آرسنیک AS	0.147	0.136	0.066	0.042	0.36
کادمیوم Cd	0.021	0.011	0.045	0.009	0.06
کروم Cr	0.091	0.154	0.089	0.024	0.13
نیکل Ni	0.118 ^a	0.038 ^b	0.094 ^{ab}	0.018	0.02
سرب Pb	0.250	0.136	0.280	0.068	0.32

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P < 0.05$).

۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnoord)

منتخب در کشور نیجریه انجام شد، غلظت فلزات تفاوت معنی داری با هم نداشت که این ممکن است به دلیل سطح پایین صنعتی شدن در این بخش از کشور باشد که حیوانات در آن پرورش می‌یابند (Giri et al., 2020). همچنین در مطالعه‌ای که در مورد تعیین غلظت فلزات سنگین کروم، کادمیوم، سرب، نیکل، مس، روی، منگنز در اندام‌های داخلی و ماهیچه‌های مختلف گاوهای سیاه و سفید لیتوانیایی و گاوهای هم نژاد بود، نتایج نشان داد که غلظت یون فلزات سنگین در ریه تفاوت معنی داری داشت، به طوری که بیشترین غلظت کروم مربوط به ریه‌ها بود و تمایل به افزایش غلظت نیکل در ریه‌ها مشاهده شد. (Jukna et al., 2006). از طرفی، مومودو و اویانجی

میزان فلزات سنگین موجود در بافت ریه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان آرسنیک، کادمیوم و سرب در بافت شش در مناطق مختلف اختلاف معنی داری نداشت. با این حال، میزان کروم و نیکل در بافت ریه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف به طور معنی داری تحت تأثیر قرار گرفت ($P < 0.05$). به طوری که بیشترین میزان کروم و نیکل در منطقه ۲ مشاهده گردید و کمترین میزان کروم، در بافت ریه را منطقه ۳ و منطقه ۱ و ۳ کمترین میزان نیکل را به خود اختصاص داد. مطابق با نتایج ما، در پژوهشی که به منظور ارزیابی غلظت فلزات سنگین (سرب و کادمیوم) در ریه گاو از کشتارگاه

بافت مورد آزمایش در مناطق صنعتی بیشتر از همان اندام‌ها برای مناطق روستایی بود.

(Momodu and Oyebanji, 2019) در تعیین محتوای فلزات سنگین در گوشت گاو مشاهده کردند که میزان فلزات سنگین در

جدول ۶- میزان فلزات سنگین موجود در بافت ریه گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف (میلی‌گرم/کیلوگرم)

Table 6- The amount of heavy metals in the lung tissue of Holstein cows in different areas ¹

مورد Item	مناطق مختلف Different areas			خطای استاندارد میانگین SEM	مقدار احتمال P- value
	1	2	3		
آرسنیک AS	0.063	0.052	0.060	0.019	0.92
کادمیم Cd	0.027	0.018	0.010	0.008	0.41
کروم Cr	0.162 ^{ab}	0.221 ^a	0.083 ^b	0.029	0.02
نیکل Ni	0.079 ^b	0.206 ^a	0.029 ^b	0.036	0.01
سرب Pb	0.130	0.414	0.067	0.144	0.023

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnood)

(Okareh *et al.*, 2015). ممکن است دلیل غلظت بالای کروم (mg/kg) در بافت نمونه‌برداری شده این باشد که گاو اخیراً در اثر فعالیت‌های انسانی در معرض خوراک آلوده به کروم یا محیط‌های آلوده به کروم قرار گرفته باشند (Sabuwa *et al.*, 2020).

حداکثر سطوح مختلف فلزات سنگین در خوراک دام بر اساس استاندارد اعلام شده توسط سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران آرسنیک دو میلی‌گرم بر کیلوگرم، کادمیم یک میلی‌گرم بر کیلوگرم و سرب پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد (ISIRI, 2009). قابل ذکر است که گاوهای شیری بیشتر مستعد تجمع کادمیم و سرب هستند. (Hejna *et al.*, 2018). رویدادهای طبیعی و فعالیت‌های انسانی به انتشار آلاینده‌ها، به‌ویژه فلزات سنگین، در محیط در طول سال‌ها کمک می‌کنند. بنابراین، این امر منجر به تقاضا برای به حداقل رساندن اثرات مضر فلزات سنگین سمی می‌شود و استفاده از ترکیبات جاذب مانند: پلیمری، معدنی طبیعی، محصول فرعی صنعتی و جاذب نانومواد کربنی به‌عنوان جاذب مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zaimee *et al.*, 2021).

میزان فلزات سنگین موجود در بافت عضله ران گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف در جدول ۷ گزارش شده است. میزان فلزات آرسنیک، کادمیم و سرب در بافت عضله ران گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار نگرفت. با این حال، میزان کروم و نیکل در بافت عضله ران به‌طور معنی‌داری در مناطق مختلف تحت تأثیر قرار گرفت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که منطقه ۱ نسبت به مناطق ۲ و ۳ دارای میزان کروم بالاتری بود. میزان نیکل نیز در منطقه ۲ بالاتر از سایر مناطق و دارای اختلاف معنی‌داری با مناطق ۱ و ۳ بود ($P < 0.05$). در مطالعه کورنکووا و همکاران (Korenekova *et al.*, 2002)، غلظت نیکل در ماهیچه گاوهای پرورش یافته در مجاورت یک واحد صنعتی از سه منطقه در اسلواکی بین ۰.۱۵ و ۰.۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود، مقادیر فوق در مطالعه حاضر بین ۰.۰۲ تا ۰.۲ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشد. همچنین یافته‌های تکونوو و همکاران (Tchounwou *et al.*, 2012) نشان داد که کروم از طیف گسترده‌ای از منابع طبیعی و انسانی وارد منابع‌های مختلف محیطی (هوا، آب و خاک) می‌شود که بیشترین انتشار آن از مؤسسات صنعتی است. زمانی که فلزات سنگین در هوا، خوراک و آب دام‌ها وجود داشته باشد، در نهایت در بافت آن‌ها تجمع می‌یابد

جدول ۷- میزان فلزات سنگین موجود در بافت عضله ران گاوهای هلشتاین در مناطق مختلف (میلی گرم/کیلوگرم)

Table 7- The amount of heavy metals in the muscle tissue of Holstein cows in different areas (mg/kg)¹

مورد Item	مناطق مختلف Different areas			خطای استاندارد میانگین SEM	مقدار احتمال P- value
	1	2	3		
آرسنیک AS	0.045	0.041	0.051	0.013	0.85
کادمیم Cd	0.030	0.016	0.018	0.009	0.55
کروم Cr	0.189 ^a	0.110 ^b	0.064 ^b	0.021	< 0.01
نیکل Ni	0.182 ^a	0.055 ^b	0.060 ^b	0.022	< 0.01
سرب Pb	0.133	0.138	0.230	0.049	0.33

¹ میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

۱: منطقه ۱ (شیروان) ۲: منطقه ۲ (اسفراین) ۳: منطقه ۳ (بجنورد)

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

1: Area 1 (Shirvan) 2: Area 2 (Esfrain) 3: Area 3 (Bojnoord)

نتیجه گیری کلی

عناصر در بافت‌ها مربوط به غلظت عنصر سرب بود و کبد بیشترین غلظت سرب را نسبت به سایر بافت‌ها داشت. با توجه به تهدیدات متعدد فلزات سنگین در محیط زیست، کاهش حضور این فلزات سمی در محیط بسیار مهم است. لذا، استفاده از ترکیباتی همانند جاذب‌ها برای کاهش غلظت این عناصر در محصولات دامی می‌تواند به‌عنوان راهکار پیشنهاد و مورد بررسی قرار گیرد.

وجود آلاینده‌های معدنی مانند یون‌های فلزی در اکوسیستم باعث ایجاد یک مشکل زیست‌محیطی بزرگ می‌شود. اگر چه مقادیر عناصر سنگین در بسیاری از موارد بین مناطق بررسی شده اختلاف معنی داری نداشت، اما مقادیر آن‌ها بیشتر از مقادیر استاندارد گزارش شده برای آن عناصر سنگین در محصولاتی همانند شیر بود، در خصوص غلظت عناصر در بافت‌ها بدون در نظر گرفتن مناطق، بالاترین مقادیر

References

- Abdel-Salam, N. M., Ahmed, S., Basir, A., Rais, A. K., Bibi, A., Ullah, R., Shad, A. A., Muhammad, Z., & Hussain, I. (2013). Distribution of heavy metals in the liver, kidney, heart, pancreas and meat of cow, buffalo, goat, sheep and chicken from Kohat market Pakistan. *Life Science Journal, Jan;10(7s)*,937-40.
- Akan, J. C., Abdulrahman, F. I., Sodipo, O. A., & Chiroma, Y. A. (2010). Distribution of heavy metals in the liver, kidney and meat of beef, mutton, caprine and chicken from Kasuwan Shanu market in Maiduguri Metropolis, Borno State, Nigeria. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, 2(8),743-748.
- Al-Zuhairi, W. S., Farhan, M. A., & Ahemd, M. A. (2015). Determine of heavy metals in the heart, kidney and meat of beef, mutton and chicken from Baquba and Howaydir market in Baquba, Diyala Province, Iraq. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(8),5965-5967.
- Aslam, B. (2010). Determination of heavy metal residues in the milk and meat of cattle and goat. Faculty of veterinary sciences, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan, 128p. <http://142.54.178.187:9060/xmlui/handle/123456789/2508>
- Association of Official Analytical Chemists. (2000). Official Methods of Analysis. 17th Ed.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2000). Toxicological Profile for Chromium. US Department of Human and Health Services. USA.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2008). Cadmium Toxicity where is Cadmium Found? Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM) Cadmium Toxicity
- Bala, A., Suleiman, N., Junaidu, A. U., Salihu, M. D., Ifende, V. I., Saulawa, M. A., Magaji, A. A., Faleke, O. O., & Anzaku, S. A. (2014). Detection of lead (Pb), cadmium (Cd), chromium (Cr) nickel (Ni) and magnesium residue in Kidney and liver of Slaughtered Cattle in Sokoto Central Abattoir, Sokoto State, Nigeria. *International Journal of Livestock Research*, 4(1),74-80. DOI: 10.5455/ijlr.20131002072458
- Bonyadian, M., Moshtaghi, H., & Soltani, Z. (2006). Study on the residual of Lead and cadmium in raw and

- pasteurized milks in Shahrekord area. *Iranian Veterinaria Hungarica*, 43,3-43.
10. Boudebbouz, A., Boudalia, S., Bousbia, A., Habila, S., Boussadia, M. I., & Gueroui, Y. (2021). Heavy metals levels in raw cow milk and health risk assessment across the globe, A systematic review. *Science of the Total Environment*, 751,141830. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141830>
 11. Bousbia, A., Boudalia, S., Gueroui, Y., Ghebache, R., Amrouchi, M., Belase, B., Meguelati, S., Belkheir, B., Benidir, M., & Chelaghmia, M.L. (2019). Heavy metals concentrations in raw cow milk produced in the different livestock farming types in Guelma province (Algeria), contamination and risk assessment of consumption. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 29(2).
 12. Chang, X. & Mowat, D. N. (1992). Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. *Journal of Animal Science*, 70,559-565. <https://doi.org/10.2527/1992.702559x>
 13. Codex alimentarius commission. (2000). Evaluation of certain food additives and contaminations. Report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives Geneva, Switzerland, pp. 90-120. PMID: 27514183.
 14. Codex alimentarius commission. (2007). Evaluation of certain food additives and contaminations. Report of the 35th Session of codex committee on food additives and contaminants. Arusha, Tanzania,
 15. Dhanalakshmi, B., & Gawdaman, G. (2013). Determination of heavy metal in goat milk through ICP-OES. *Asian Journal of Dairying & Foods Research*, 32(3),186-190.
 16. Ghafoor, A., & Rasool, I. (1999). Zinc, copper, iron and manganese in soils at different canal and water course sections in rice-wheat cropping zone. *International Journal of Agriculture Biology*, 1,218-221.
 17. Giri, S., & Singh, A. K. (2020). Human health risk assessment due to metals in cow's milk from Singhbhum copper and iron mining areas, India. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4),1415-1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141830>
 18. Goyer, R. (1991). Toxic Effects of Metals, In: Casarett and Doull's Toxicology, 4th Ed. Pergamon Press, New York, pp. 623-628.
 19. Harding, F. (1995). Milk quality. Springer Technology & Industrial. Translated by: Karim, G., Dayyani, A., & Khaliji, A. H., University of Tehran Press, Iran. pp. 177-179.
 20. Hashemi, M., (2018). Heavy metal concentrations in bovine tissues (muscle, liver and kidney) and their relationship with heavy metal contents in consumed feed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154,263-267. (in Persian). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12416>.
 21. Hejna, M., Gottardo, D., Baldi, A., Dell'Orto, V., Cheli, F., Zaninelli, M., & Rossi, L., 2018. Nutritional ecology of heavy metals. *Animal*, 12(10),2156-2170. DOI: <https://doi.org/10.1017/S175173111700355X>
 22. Hereshberger, T. V., Wilson, L. L., Chase, L. E., Rugh, M. C., & Valera-Alvaers, H. (1971). Effect of activated carbon on lamb performance and rumen parameters, *Journal of Dairy Science*, 54(5),693-695. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(71\)85908-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(71)85908-8)
 23. Husain, A., Rashdan, A., Awadhi, A., Mahgoub, B., & Amiri, A. (1996). Toxic metals in food products originating from locally reared animals in kuwait. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 549-555.
 24. Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., & Dutler, H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbants. *Toxicology Letters*, 122(2),17-188. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00360-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00360-5)
 25. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2011). Food & Feed-Maximum limit of heavy metals. ISIRI No. 12968.Karaj: ISIRI.
 26. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2009). Animal Feed stuffs- Animal feed concentrate-Specifications. ISIRI No. 3774.Karaj: ISIRI.
 27. Jukna, C., Jukna, V., & Siugzdaite, J. (2006). Determination of heavy metals in viscera and muscles of cattle. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 9(1),35-41.
 28. Khorashadi Zadeh, M. A., Valizadeh, R., & Naserian, A. A. (2017). The effect of long-term dietary cadmium chloride on cadmium concentration in tissues, urine and feces and concentration of iron, zinc and copper in tissues in Holstein male calves. *Animal Production Research Animal Science University of Gilan*, 2,1-11. (In Persian)
 29. Korenekova, B., Skalická, M., & Nad, P. (2002). Concentration of some heavy metals in cattle reared in the vicinity of a metallurgic industry. *Veterinarski Arhiv*, 72(5),259-268.
 30. Momodu, D., & Oyebanji, A. (2019). Determination of heavy metals in selected tissues and organs of cattle from Central Abattoir in Ado-Ekiti, Akure and Owena. *Asian Journal of Applied Chemistry Research*, (4),1-7. DOI: [10.9734/AJACR/2019/v4i1-230102](https://doi.org/10.9734/AJACR/2019/v4i1-230102)
 31. Najam, S., Nawaz, R., Ehsan, N., Khan, M. M., & Nawaz, M. H. (2015). Heavy metals contamination of soils and vegetables irrigation with municipal wastewater: A case study of Faisalabad, Pakistan. *Journal of Environmental & Agricultural Sciences*, 4,6-10.
 32. Najarneshad, V., Jalilzadeh-Amin, G., Anassori, E., & Zeinali, V. (2015). Lead and cadmium in raw buffalo, cow and ewe milk from west Azerbaijan, Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 3:8(2),123-7. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1007396>
 33. NRC. (1996). Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Ed. Natl. Acad. Press. Washington. DC.
 34. Okareh, O. T. (2015). Determination of heavy metals in selected tissues and organs of slaughtered cattle from

- Akinyele Central Abattoir, Ibadan. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(11),124–9.
35. Omede, S. N., & Ichado, A. S. (2018). Assessment of heavy metals in the lungs, hearts and muscles of cow from abattoirs in Anyigba, Ejule and Ankpa. *International Journal for Advance Research and Development*, 3(2),233-8.
 36. Oymak, T., Ulusoy, H., Hastaoğlu, E., Yılmaz, V., & Yıldırım, Ş. (2017). Some heavy metal contents of various slaughtered cattle tissues in Sivas-Turkey. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A*, 4(3),721-728. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.292601>
 37. Pereira, M. C. S., Brumano, L. P., Kamiyama, C. M., Pereira, J. P. F., Rodarte, M. P., & de Oliveira Pinto, M. A. (2012). Lácteos com baixo teor de lactose: Uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 67(389),57-65. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120079>
 38. Radha, R. V., Kumutha, K., & Marimuthu, P. (2014). Assessment of cadmium contamination of soils in sewage disposal areas of coimbatore district, Tamil Nadu, India. *Current World Environment*, 1 Aug., 9(2),379. DOI: <http://dx.doi.org/10.12944/CWE.9.2.18>
 39. Radmehr, B., Nematparvar, M., Farhoodi Moghadam, M., & Khoshnevis, M. (2010). Correlation between lead concentration in produced milk and drinking water in a few dairy farms of Tehran province. *Journal of Clinical Research*, 1,49-56. (In Persian). DOI: [20.1001.1.20088159.1388.1.1.5.0](https://doi.org/10.1001.1.20088159.1388.1.1.5.0)
 40. Rahimi, E., & Rokni, N. (2008). Measurement of cadmium residues in muscle, liver and kidney of cattle slaughtered in Isfahan abattoir using grafite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), A preliminary study. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 9,174-177. (in Persian). DOI: [10.22099/ijvr.2008.547](https://doi.org/10.22099/ijvr.2008.547)
 41. Rey-Crespo, F., Miranda, M., & López-Alonso, M. (2013). Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food and Chemical Toxicology*. 1 May, 55,513-8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.040>
 42. Rosas, I., Belmont, R., Armineta, A., & Baez, A. (1999) Arsenic concentration in water, soil milk and forage in ComaracaLagunera, Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*, 112,133-149. <https://doi.org/10.1023/A:1005095900193>
 43. Saber, R., & Parviz, A. (2017). Survey on the amount of cadmium in milk and its correlation with milk production in dairy farms of Tabriz area. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, 10(4 (40 Winter),315-325.
 44. Sabuwa, A. M., & Nafarnda, W. D. (2020). Determination of Concentration of Some Heavy Metals in Tissues of Cattle Slaughtered from Southern Agricultural Zone of Nasarawa State, Nigeria. DOI: [10.36349/easjvms.2020.v02i05.001](https://doi.org/10.36349/easjvms.2020.v02i05.001)
 45. Safaei, P., Seilani, F., Eslami, F., Sajedi, S. R., & Mohajer, A. (2021). Determination of essential nutrients and heavy metal content of raw cow's milk from East Azerbaijan province, Iran. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 101(14),2368-78. (in Persian) <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1702171>
 46. Sambu, S., & Wilson, R. (2008). Arsenic in food and water- A brief history. *Toxicology and Industrial Health*, 24, 217-226. <https://doi.org/10.1177/0748233708094096>
 47. Series, T. F. (2009). Mercury, lead, cadmium, tin and arsenic in food. *Food Safety*, 1,1-13.
 48. SAS.Statistical Analysis System. (2009). Users Guide: Statistics, Version 9.2. SAS Institute, Cary, NC, USA.
 49. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, clinical and environmental toxicology* (pp. 133-164). Springer, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
 50. Tibulca, D., Jimborean, M., & Salagean, D.C. (2012). Variation of heavy metal content from raw milk according to season. University of Craiova, 17,401-406.
 51. Ubwa, S. T., Ejiga, R., Okoye, P. A., & Amua, Q. M. (2017). Assessment of heavy metals in the blood and some selected entrails of cows, goat and pigs slaughtered at Wurukum Abattoir, Makurdi-Nigeria. *Advances in Analytical Chemistry*, 7(1),7-12. DOI: [10.5923/j.aac.20170701.02](https://doi.org/10.5923/j.aac.20170701.02)
 52. Vafa, T., Khorashadi Zadeh, M. A., & Valizadeh, R. (2018). Studying the Lead concentration in raw milk of dairy farm in mashhad. The international conference on agricultural science on medicinal plants & traditional medicine. Payam Noor University of Khorasan Razavi, Iran. (In Persian) DOI: [10.22067/ijasr.2023.79760.1119](https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79760.1119)
 53. Zaimee, M. Z. A., Sarjadi, M. S., & Rahman, M. L. (2021). Heavy metals removal from water by efficient adsorbents. *Water*, 13(19),2659. <https://doi.org/10.3390/w13192659>
 54. Zain, S. M., Behkami, S., Bakirdere, S., & Koki, I. B. (2016). Milk authentication and discrimination via metal content clustering – A case of comparing milk from Malaysia and selected countries of the world. *Food Control* 66,306–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.015>



Research Article

Vol. 15, No.4, 2023, p. 503-513

The Effects of Different Levels and Sources of Oil on Production Performance, Reproduction, Blood Metabolites and Nutrients Digestibility of Kurdish Ewes

Masoud Didarkhah¹, Moosa Vatandoost^{2*}

1- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author's Email: m_vatandoost@pnu.ac.ir

Received: 18-01-2023
Revised: 21-02-2023
Accepted: 22-02-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Didarkhah, M., & Vatandoost, M. (2023). The effects of different levels and sources of oil on production performance, reproduction, blood metabolites and nutrients digestibility of Kurdish ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 503-513. (in Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80669.1123>

Introduction: One of the most important problems in the sheep breeding industry is its low reproduction capacity. According to the advances made in the field of reproduction, new methods have led to the improvement of the reproduction process. One of the important and effective indicators in reproduction is the level of energy used in the diet during the reproductive season. The use of fat supplements in the diet increases the energy density, and by reducing the inhibitory effects of the negative energy balance, it improves reproductive and productive performance. The right amount of oil consumption guarantees health and food safety. It is recommended that 10% or less of the energy needed by the body per day comes from saturated fat sources and 20-35% of daily energy comes from unsaturated fat. Due to the importance of oil seeds, their cultivation is also very important and they have a wide cultivated area all over the world. The purpose of this research was to investigate the effects of levels and sources of oil and fat on reproductive performance and blood factors of Kurdish sheep.

Materials and Methods: The experiment was conducted at the Research Unit Farm of the Light Livestock Breeding Shightogan Delaware Company, located in the southern Khorasan province, Iran. Fifty-six ewes with Non-pregnant with an average age of one year and average body weight of 41.35 ± 2.5 kg were divided into 7 treatments and 8 replications for 60 days (habituation period 14 days). Experimental treatments include: 1- base diet without oil, 2- Basic ration containing 2% sunflower oil, 3- Basic ration containing 2% canola oil, 4- Basic ration containing 2% tallow, 5- Basic ration containing 4% sunflower oil, 6- Basic ration containing 4% canola oil and 7- Basic ration It contained 4% tallow. Estral synchronization was performed in spring with CIDR. Ewes after CIDR (14 day) extraction and PMSG injection as soon as the signs of estrus were observed, the ewes were isolated from the others and artificially inseminated with fresh sperm using the transcortical method. Energy and chemical composition of rations were similar and were examined simultaneously with CIDR removal and estrus observation. Then, in each experiment parameters such as the time of estrus initiation (hour), rate of return to estrus, parturition rate, rate of multiple births, number of lambs and rate of lambing were evaluated Body weight (BW) and body growth measures were recorded First and period End. Data obtained were analyzed by statistical software SAS (version 1.9). Estral synchronization was performed in spring with CIDR. Ewes after CIDR (14 day) extraction and PMSG injection as soon as the signs of estrus were observed, the ewes were isolated from the others and artificially inseminated with fresh sperm using the transcortical method. The nutrition program with software (SRNS) version was adjusted based on the pregnancy diet.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2023.80669.1123>

Results and Discussion: The results showed that the highest pregnancy rate (100%) and lambing rate (125%) were related to ewes receiving rations with 2% tallow oil and 4% sunflower oil. The highest increase in body weight was observed in ewes consuming ration with 2% sunflower oil, which was significantly different from the control group. But with other groups, this difference was insignificant. The highest body weight gain and the best (lowest) feed conversion ratio were observed in ewes consuming 2% sunflower oil diet, which was significantly different from the control group. But with other groups, this difference was insignificant. Triglyceride concentration, plasma total protein concentration and plasma albumin were not affected by oil and fat sources in the diets and no significant difference was observed between the diets. There was a significant difference in the average apparent digestibility coefficients of dry matter, crude fat and organic matter of nutrients between treatments.

Conclusion: In general, use of vegetable and animal oils in the diet can positive effect on the productive and reproductive performance of sheep results of this research showed that in order to reduce the rate of consumption costs, 2% in the ration is suggested.

Keywords: Canola oil, Kurdish ewe, Pregnancy rate, Sunflower oil, Tallow

اثرات سطح و منبع مختلف روغن بر عملکرد رشد و تولیدمثلی، فاکتورهای خونی و قابلیت هضم مواد مغذی میش‌های کردی

مسعود دیدارخواه^۱، موسی وطن دوست^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۳

چکیده

یکی از شاخص‌های مهم و مؤثر در تغذیه و افزایش بهره‌وری گوسفند، سطح انرژی به کار رفته در جیره می‌باشد. با هدف مطالعه بررسی اثر سطح و منبع مختلف روغن بر عملکرد تولیدی و تولیدمثلی میش‌های کردی، از ۵۶ رأس میش نژاد کردی غیرآبستن با میانگین سنی یک ساله و میانگین وزنی $41/35 \pm 2/5$ کیلوگرم به مدت ۶۰ روز (۱۴ روز دوره عادت‌پذیری) در طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و هشت تکرار استفاده شد. تیمارهای آزمایشی به ترتیب شامل: ۱- جیره پایه بدون روغن، ۲- جیره پایه حاوی دو درصد روغن آفتابگردان، ۳- جیره پایه حاوی دو درصد روغن کانولا، ۴- جیره پایه حاوی دو درصد پیه، ۵- جیره پایه حاوی چهار درصد روغن آفتابگردان، ۶- جیره پایه حاوی چهار درصد روغن کانولا و ۷- جیره پایه حاوی چهار درصد پیه بود. مقدار خوراک مصرفی به صورت روزانه و افزایش وزن در کل دوره محاسبه و ثبت شد. فراسنجه‌های خونی شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، گلوکز و آلبومین در هفته پایانی آزمایش اندازه‌گیری شد. بعد از زایش نیز فراسنجه‌های تولیدمثلی نظیر نرخ بره‌زایی، دوقلو‌زایی، مرده‌زایی و آبستنی محاسبه گردید. نتایج نشان داد، بیشترین نرخ آبستنی (۱۰۰ درصد)، بره‌زایی (۱۲۵ درصد) مربوط به میش‌های دریافت‌کننده جیره‌های دارای دو درصد روغن پیه و چهار درصد روغن آفتابگردان بود. بیشترین افزایش وزن بدن و بهترین (کمترین) ضریب تبدیل خوراک در میش‌های مصرف‌کننده جیره دارای دو درصد روغن آفتابگردان بود که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت. ولی با سایر گروه‌ها این اختلاف غیر معنی‌دار بود. غلظت تری‌گلیسرید، غلظت پروتئین کل پلاسما و آلبومین پلاسما تحت تأثیر منابع روغن و چربی در جیره‌ها قرار نگرفت و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین جیره‌ها مشاهده نشد. میانگین ضرایب قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، چربی خام و ماده آلی مواد مغذی بین تیمارها، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که بین دو و چهار درصد روغن‌های استفاده شده در جیره تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و به‌منظور کاهش نرخ هزینه‌های مصرفی میزان دو درصد در جیره پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پیه، روغن آفتابگردان، روغن کانولا، میش کردی، نرخ آبستنی

مقدمه

چگالی انرژی شده و با کاهش اثرات بازدارنده تعادل منفی انرژی (Lucy and Stevenson, 1986) باعث بهبود عملکرد باروری حیوان می‌گردد (Zelege et al., 2005).

روغن‌های گیاهی و جانوری منابعی پر انرژی بوده و امروزه به منظور افزایش انرژی جیره و تأمین نیاز انرژی در جیره دام استفاده می‌شوند (Machmüller, 2006). چربی‌ها علاوه بر داشتن مقدار

از مهمترین مشکلات موجود در صنعت پرورش گوسفند، پایین بودن ظرفیت تولیدمثل آن می‌باشد. یکی از شاخص‌های مهم و مؤثر در تولیدمثل، سطح انرژی به کار رفته در جیره می‌باشد (Ferreira et al., 2014). استفاده از مکمل‌های چربی در جیره، موجب افزایش

۱- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

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

(Email: m_vatandoost@pnu.ac.ir

*) نویسنده مسئول:

گرفت. ۵۶ رأس میش نژاد کردی غیرآبستن با میانگین سنی یک‌ساله و میانگین وزنی $41/35 \pm 2/5$ کیلوگرم به مدت ۶۰ روز (۱۴ روز دوره عادت‌پذیری) و به صورت تصادفی در هفت تیمار هشت رأسی تقسیم شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سطح و منبع مختلف چربی در دو سطح دو و چهار درصد ماده خشک اجرا شد. تیمارهای آزمایشی به‌ترتیب شامل: ۱- جیره پایه بدون روغن، ۲- جیره پایه حاوی دو درصد روغن آفتابگردان، ۳- جیره پایه حاوی دو درصد روغن کانولا، ۴- جیره پایه حاوی دو درصد پیه، ۵- جیره پایه حاوی چهار درصد روغن آفتابگردان، ۶- جیره پایه حاوی چهار درصد روغن کانولا و ۷- جیره پایه حاوی چهار درصد پیه بود. بر نامه تغذیه‌ای با نرم افزار Small Ruminant Nutrition System (SRNS) (نسخه ۱/۸) بر اساس جیره آبستنی تنظیم شد (جدول ۱). جیره‌ها به مدت ۶۰ روز (۳۰ روز قبل و ۳۰ روز بعد از تلقیح مصنوعی) به صورت آزاد و در حد اشتها (در دو وعده هشت صبح و چهار بعد از ظهر) در اختیار گوسفندان قرار داده شد.

همزمان‌سازی فحلی در فصل بهار و با روش طولانی‌کردن فاز لوتال انجام شد که از CIDR (Intervet, Holand) که یک شیاف داخل مهبل حاوی $0/3$ گرم پروژسترون طبیعی است، استفاده شد. پس از ۱۴ روز، هنگام خروج سیدرها، به تمام میش‌ها به‌صورت عضلانی ۲۰۰ وا حد بین‌المللی PMSG تزریق شد (Babaei Kafiabad et al., 2014; Didarkhah, 2018; Anel et al., 2005).

میش‌ها بعد از سیدربرداری و تزریق هورمون PMSG تا چهار روز فحلی‌یابی شده و به‌محض مشاهده علائم فحلی، از بقیه میش‌ها جدا و با استفاده از روش ترانس سرویکال با اسپرم تازه تلقیح مصنوعی شدند (Babaei Kafiabad et al., 2014; Didarkhah, 2018; Anel et al., 2005).

با توجه به تغذیه دام‌ها به‌صورت انفرادی، مقدار خوراک مصرفی هر گوسفند در کل دوره ثبت شد. جهت کنترل وزن بدن در گروه‌های آزمایشی با شروع آزمایش دام‌ها در ابتدا و انتهای دوره وزن‌کشی شدند. بعد از زایش نیز فرا سنج‌های تولیدمثلی نظیر نرخ بره‌زایی (بره‌های متولد شده به میش‌های زایمان کرده)، دوقلو‌زایی (تعداد میش‌های دوقلوزا به میش‌ها زایمان کرده)، مرده‌زایی (بره‌های مرده متولد شده به میش‌های زایمان کرده) و نرخ آبستنی (تعداد میش‌های آبستن شده تقسیم بر تعداد میش‌های تلقیح شده) محاسبه گردید.

خون‌گیری برای تعیین غلظت کلسترول، گلوکز، تری‌گلیسیرید، پروتئین کل و آلبومین در هفته پایی از مایش دو ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح، با استفاده از لوله‌های تحت خلاء دارای EDTA از سیاهرگ گردنی و داج انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله برای ۱۵ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و پلاسما‌ی نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای اندازه‌گیری غلظت

زیادی انرژی، موجب کاهش گرد و غبار در خوراک و افزایش مصرف خوراک می‌شوند (Ensminger and Olentine, 1990). استفاده از روغن‌ها در جیره نشخوارکنندگان، نقش مهارکننده تولید متان در شکمبه دارند و باعث افزایش بازده انرژی و کاهش اثرات زیست‌محیطی می‌شود (Ferreira et al., 2014).

در تحقیقی، گروهی از پژوهشگران با افزودن روغن ماهی و مخلوط روغن ماهی و سویا به‌ترتیب به جیره گاو شیری و بره‌های پرواری، کاهش خوراک مصرفی را گزارش کردند (Ferreira et al., 2014). افزودن روغن سویا سبب کاهش وزن بره‌ها شد (Bessa et al., 2005) با این وجود، عدم تأثیر افزودن روغن سویا و آفتابگردان بر افزایش وزن روزانه و خوراک مصرفی، نیز گزارش گردید (Roy et al., 2013).

تأثیر اسیدهای چرب ضروری از روش‌های مختلف نظیر: تغییر در پروفایل اسیدهای چرب مایع فولیکولی، غشای سلول‌های گرانولوزا و اووسیت، بهبود فولیکولوژنسیز، بلوغ سیتوپلاسمی اووسیت، استروئیدوژنسیز و نرخ تخمک‌ریزی، بهبود زنده‌مانی رویان و حفظ آبستنی اعمال می‌گردد (Zelege et al., 2005).

در طی سال‌های اخیر، یکی از راه‌کارهای مورد استفاده برای افزایش بهره‌وری تولیدمثل در گوسفند، تغذیه جیره‌های سرشار از انرژی در مدت زمان کوتاه نزدیک به جفت‌گیری است. این انرژی به صورت مستقیم و غیرمستقیم (تولید هورمون‌ها و متابولیت‌ها) می‌تواند چرخه تولیدمثل (افزایش نرخ تخمک‌ریزی، بره‌زایی و دوقلو‌زایی) را تحت تأثیر قرار دهد (Khorasani et al., 1994). افزایش انرژی جیره با مکمل‌سازی با چربی، یکی از روش‌های بهبود وضعیت انرژی و در نتیجه، بهبود عملکرد تولیدمثل در نشخوارکنندگان است (Khorasani et al., 1994).

عملکرد تولیدمثلی به‌وسیله چربی جیره، مستقل از وضعیت انرژی جیره بهبود می‌یابد. اثرات سودمند افزایش چربی جیره در مطالعات زیادی نشان داده شده است، به‌طوری‌که مکمل کردن اسیدهای چرب غیراشباع در جیره به روش‌های مختلف می‌تواند بر عملکرد تولیدمثل تأثیر گذارد (Lucy and Stevenson, 1986).

بنابراین، با توجه به افزایش نرخ چندقلو‌زایی در گوسفند به‌دلیل برنامه‌های اصلاح نژادی در سال‌های اخیر و بیشتر شدن مشکلات پیرامون زایش، توجه به تغذیه می‌شود برای افزایش نرخ آبستنی ضروری می‌باشد. به همین منظور، این پژوهش با هدف مطالعه بررسی اثرات سطح و منبع مختلف روغن و چربی بر عملکرد تولیدمثلی و فاکتورهای خونی میش‌های کردی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در بخش تحقیقات گوسفند و بز ایستگاه اصلاح نژاد دام سبک شرکت سهامی شیفتگان دلاور در شهرستان فردوس انجام

متابولیت‌ها، نمونه‌های پلاسما پس از ذوب در دمای اتاق، برای تعیین مقدار سرمی کلاسترول، گلوکز، آلبومین، تری‌گلیسیرید و پروتئین کل پلاسما از کیت‌های آزمایشگاهی بیوسیستم و دستگاه اتوآنالایزر (مدل جدول ۱) - اجزای مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

Table 1– The Ingredients and chemical composition of the experimental diets

تیمارهای آزمایشی							
Experimental treatments							
اجزای جیره‌های آزمایشی (درصد در جیره)	گروه ۱ (جیره شاهد)	گروه ۲	گروه ۳	گروه ۴	گروه ۵	گروه ۶	گروه ۷
Ingredients	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
علوفه یونجه Alfalfa hay	19.47	19.47	19.47	19.47	19.47	19.47	19.47
روغن آفتابگردان Sunflower oil	0	2	0	0	0	0	0
روغن کانولا Canola oil	0	0	2	0	0	0	0
پیه Tallow	0	0	0	2	0	0	0
روغن آفتابگردان Sunflower oil	0	0	0	0	4	0	0
روغن کانولا Canola oil	0	0	0	0	0	4	0
پیه Tallow	0	0	0	0	0	0	4
سیلاژ ذرت Corn silage	18.33	11.83	11.83	11.83	18.83	18.83	18.83
کاه جو Barley straw	15.52	16.82	17.82	17.82	12.82	15.82	15.82
دانه جو Barley grain	15.35	16.35	16.35	15.35	14.35	11.35	11.35
دانه ذرت Corn grain	7.15	7.35	6.35	7.35	6.35	6.35	6.35
کنجاله سویا Soybean meal	6.22	7.22	7.22	7.22	6.22	6.22	6.22
پودر چربی Fat powder	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
سبوس گندم Wheat bran	8.95	8.95	8.95	8.95	8.95	8.95	8.95
کربنات کلسیم Calcium carbonate	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
کنجاله تخم پنبه Cotton seed meal	6.60	7.60	7.60	7.60	6.60	6.60	6.60
ترکیبات شیمیایی							
Chemical composition (calculated)							
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	14.10	14.26	14.26	14.16	14.02	14.06	14.06
ماده خشک (درصد) Dry matter (%)	71.7	70.17	70.27	70.7	70.22	70.53	70.12
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent-insoluble fiber (%)	40.36	40.36	40.36	40.36	40.36	40.36	40.36
چربی خام (درصد) Crude fat (%)	4.28	4.28	4.28	4.28	4.28	4.28	4.28
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم) ME (Mcal/kg ⁻¹)	2.81	2.88	2.89	2.93	2.96	2.92	2.97
کربوهیدرات غیر الیافی (درصد) NFC (%)	34.01	34.21	34.31	34.11	34.71	34.21	34.11
فسفر (درصد) P (%)	0.45	0.46	0.44	0.42	0.47	0.46	0.42
کلسیم (درصد) Calcium (%)	0.88	0.85	0.87	0.88	0.84	0.85	0.83

مرحله شیردهی، شرایط اقلیمی، عوامل مدیریتی، وضعیت بدنی، نوع و کیفیت اجزای خوراک به‌ویژه علوفه بستگی دارد (Broderick, 2003). نتایج پژوهش‌ها در مورد اثر منبع روغن بر فرآیند تخمیر شکمبه متفاوت است (Stockdale, 2007).

برخی از محققین کاهش مصرف خوراک را در جیره‌های حاوی کنجاله کانولا در مقایسه با جیره‌های حاوی کنجاله سویا گزارش کردند (Mazhari et al., 2009) که به دلیل وجود گلوکوزینولات بالا در کنجاله کانولا، مصرف خوراک کاهش یافت (Mahmoud et al., 2001)؛ اما چون کنجاله کانولایی که امروزه در ایران استفاده می‌شود، دارای گلوکوزینولات و اسید اروسیک پایینی است، اثری بر مصرف جیره‌ها نداشته و گاوها در آن آزمایش هر دو جیره را تقریباً به‌طور یکسان مصرف کردند (Mahmoud et al., 2001).

مصرف اختیاری ماده خشک علوفه در گوسفند بیشتر به محتوای الیاف نامحلول در شوینده خنثی بستگی دارد و همبستگی منفی میان حجم خوراک مصرفی و مقدار دیواره سلولی وجود دارد (Allen, 2000).

پژوهشگران نشان دادند که افزودن مخلوط روغن سویا و ماهی به جیره‌های پرواری تأثیر منفی بر قابلیت هضم مواد مغذی (ماده آلی، ماده خشک، دیواره سلولی و کربوهیدرات‌های غیرفیبری) و ماده خشک مصرفی نداشت (Ferreira et al., 2016)، هر چند استفاده از روغن‌ها در جیره حیوانات، مزایای متعددی دارد، اما به دلیل فسادپذیری زیاد و مشکلات نگهداری، استفاده از آن‌ها با محدودیت همراه است و استفاده از سطوح بالا روغن به علت اثرات منفی روغن‌های غیرا شعاع باعث کاهش خوراک مصرفی می‌گردد (Allen, 2000).

قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی

نتایج مربوط به قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی حاصل از جیره‌های مکمل شده با مقادیر متفاوت روغن و چربی در جدول ۳ نشان داده شده است.

نتایج آماری داده‌های حاصل از این آزمایش نشان داد که میانگین ضرایب قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، چربی خام و ماده آلی مواد مغذی بین جیره‌های مختلف آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). به طوری که بیشترین ضریب قابلیت هضم ماده خشک، چربی خام و ماده آلی مربوط به گروهی بود که روغن کانولا مصرف کرده بودند و با گروه‌های ۱، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) داشت.

در انتهای آزمایش (هفت روز پایانی) کل مدفوع گو سفندها به‌طور جداگانه جمع‌آوری و توزین شد و یک نمونه ۲۰ درصدی از کل مدفوع جمع‌آوری شده جهت آنالیز شیمیایی برداشت شد و ترکیب شیمیایی نمونه‌های مدفوع و جیره آزمایشی شامل ماده خشک، چربی، ماده آلی و پروتئین طبق روش AOAC اندازه‌گیری شد (AOAC., 1990).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه داده‌های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و هشت تکرار بود و به شرح مدل زیر تجزیه شدند.

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

که در آن، Y_{ij} : مقدار هر مشاهده، μ : اثر میانگین جامعه، T_i : اثر تیمارهای مختلف و ε_{ij} : مقدار خطای باقی‌مانده است.

تحلیل داده‌های نظیر مصرف خوراک، وزن بدن با استفاده از رویه Mixed و تجزیه واریانس صفاتی نظیر قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی و ماده خشک با استفاده از رویه GLM و تو سطر نرم‌افزار SAS (نسخه ۱/۹) انجام شد. میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح پنج درصد و جهت مقایسه فراسنجه‌های تولیدمثل که ماهیت درصد داشت، از آزمون کای مربع استفاده شد.

نتایج و بحث

شاخص‌های عملکردی

نتایج مربوط به عملکرد (متوسط تغییر وزن روزانه، ماده خشک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک) در جدول ۲ نمایش داده شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میانگین تغییر وزن روزانه بدن میش‌ها تحت تأثیر گروه‌های آزمایشی قرار گرفت. به طوری که بیشترین میانگین تغییر وزن بدن میش‌ها مربوط به تیمار حاوی دو درصد روغن آفتابگردان بود و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P < 0.05$).

بهترین ضریب تبدیل خوراک مربوط تیمار حاوی دو درصد روغن آفتابگردان بود و با گروه شاهد که بیشترین ضریب تبدیل (۷/۷۵) را داشت، تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

استفاده از جیره‌های حاوی چربی و روغن، میانگین خوراک مصرفی روزانه، ماده خشک مصرفی کل دوره و وزن نهایی را در بره‌ها تحت تأثیر قرار نداد. ولی ضریب تبدیل خوراک به وزن زنده، میانگین افزایش وزن روزانه در کل دوره و اضافه وزن نهایی را تحت تأثیر قرار داد و اختلاف معنی‌داری گروه شاهد با سایر گروه‌ها داشت ($P < 0.05$). مصرف خوراک به عوامل متعددی مانند وزن زنده، تولید شیر،

جدول ۲- اثر جیره‌های آزمایشی بر میانگین خوراک مصرفی و میانگین افزایش وزن

Table 2- Effect of experimental diets on average feed intake

فراسنج‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی Experimental diets							خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری P-value
	گروه ۱ (جیره شاهد) Group 1	گروه ۲ Group 2	گروه ۳ Group 3	گروه ۴ Group 4	گروه ۵ Group 5	گروه ۶ Group 6	گروه ۷ Group 7		
متوسط افزایش وزن روزانه (گرم) Average daily weight gain (g)	205 ^b	245 ^a	236 ^a	229 ^a	241 ^a	236 ^a	230 ^a	76.15	00.0
مصرف خوراک روزانه (کیلوگرم) Daily feed intake (kg)	52.1	49.1	53.1	55.1	47.1	53.1	50.1	413.0	14.0
خوراک مصرفی کل دوره (کیلوگرم) Average dry matter (kg)	20.91	40.89	80.91	00.93	20.88	80.91	00.90	501.4	21.0
اضافه وزن کل دوره (کیلوگرم) Average total weight gain(kg)	30 ^b .12	70 ^a .14	16 ^a .14	74 ^a .13	60 ^a .14	16 ^a .14	80 ^a .13	231.2	00.0
ضریب تبدیل (خوراک خورده شده به اضافه وزن زنده) (کیلوگرم / کیلوگرم) Feed conversion ratio (kg/kg)	41 ^a .7	08 ^b .6	48 ^b .6	76 ^b .6	04 ^b .6	48 ^b .6	52 ^b .6	951.0	00.0

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: گروه ۱- جیره پایه بدون روغن، گروه ۲- دو در صد روغن آفتابگردان، گروه ۳- دو در صد روغن کانولا، گروه ۴- دو در صد پیه، گروه ۵- چهار در صد روغن آفتابگردان، گروه ۶- چهار درصد روغن کانولا، گروه ۷- چهار درصد پیه
^۲ اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

^۱ Experimental diets including: Group 1- control group (no additive), Group 2- (2% sunflower oil), Group 3- (2% canola oil), Group 4- (2% tallow), Group 5- (4% oil) Sunflower, group 6 (4% canola oil), group 7 (4% tallow).

^۲ Means within same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

در نتیجه، به کاهش هضم الیاف منجر شود (Jenkins and Palmquist, 1984)

تفاوت در اثرات مکمل چربی بر قابلیت هضم مواد مغذی به‌میزان اسیدهای چرب آزاد و درجه اشباع چربی‌ها بستگی دارد (Wu et al., 1989).

گروهی دیگر از محققین گزارش کردند که با افزودن ۵۰ گرم در کیلوگرم روغن سویا به جیره قابلیت هضم اجزای الیاف و ماده خشک تحت تأثیر قرار نگرفت، با این حال قابلیت هضم چربی افزایش یافت (Bhatt et al., 2011).

عواملی همچون سن دام، مصرف خوراک و ترکیب شیمیایی جیره مصرفی بر قابلیت هضم مواد مغذی خوراک تأثیر دارند. در این میان، روغن افزوده شده به جیره به‌عنوان عامل اصلی تأثیرگذار بر قابلیت

کمترین ضریب قابلیت هضم ماده خشک، چربی خام و ماده آلی مربوط به گروه شاهد بود که هیچ‌گونه روغنی مصرف نکرده بودند. پس می‌توان نتیجه گرفت که منابع روغن و چربی باعث افزایش قابلیت هضم مواد مغذی می‌گردد، که با نتایج گروهی از محققین (Awawdeh et al., 2009) که روی بره‌های تغذیه‌شده با روغن سویا و روغن رستوران بود، مطابقت داشت. این جیره‌ها بر قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و پروتئین تأثیری نداشت (Awawdeh et al., 2009).

همان‌گونه که نشان داده شد، افزودن روغن در سطوح مختلف تأثیر معنی‌داری بر قابلیت هضم پروتئین نداشت.

برخی دیگر از محققین نشان دادند که تغذیه بیش‌ازحد اسیدهای چرب غیراشباع می‌تواند اثرات سمی بر میکروبیوم‌های شکمبه بگذارد و

دارد. وقتی دام بیشتر خوراک مصرف می‌کند، مواد هضمی با نرخ بیشتری از دستگاه گوارش عبور می‌کنند و قابلیت هضم ماده خشک کاهش می‌یابد (Varga and Kolver., 1997).

هضم مواد مغذی خوراک به جیره محسوب می‌شود (Wu et al., 1989). نرخ عبور خوراک، از شکمبه همبستگی مثبتی با مصرف خوراک

جدول ۳- اثر جیره‌های آزمایشی بر ضرایب قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی (درصد)

Table 3 - Effect of experimental diets on the average apparent digestibility coefficient of nutrients (percentages).

فراسنجه‌ها (درصد) Parameters (%)	جیره‌های آزمایشی Experimental diets							خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال داری P-value
	گروه ۱ (جیره شاهد) Group 1	گروه ۲ Group 2	گروه ۳ Group 3	گروه ۴ Group 4	گروه ۵ Group 5	گروه ۶ Group 6	گروه ۷ Group 7		
ماده خشک Dry matter	69.66 ^b	76.52 ^a	76.70 ^b	71.20 ^b	75.52 ^a	76.70 ^a	75.20 ^a	2.49	0.00
ماده آلی Organic matter	70.41 ^b	78.02 ^a	78.70 ^a	71.45 ^a	74.02 ^a	76.70 ^a	75.45 ^a	4.04	0.01
پروتئین خام Crude protein	75.21	77.52	77.25	74.95	75.52	76.95	76.95	8.33	0.12
چربی خام Fat crude	64.16 ^c	79.12 ^a	80.25 ^a	66.20 ^c	70.52 ^b	75.45 ^a	70.20 ^b	5.81	0.00

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: گروه ۱- جیره پایه بدون روغن، گروه ۲- دو در صد روغن آفتابگردان، گروه ۳- دو در صد روغن کانولا، گروه ۴- دو در صد پیه، گروه ۵- چهار در صد روغن آفتابگردان، گروه ۶- چهار درصد روغن کانولا، گروه ۷- چهار درصد پیه
^۲ اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

^۱ Experimental diets including: Group 1- control group (no additive) Group 2- (2% sunflower oil), Group 3- (2% canola oil), Group 4- (2% tallow), Group 5- (4% oil) Sunflower, group 6- (4% canola oil), group 7 (4% tallow).

^۲ Means within same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

های خونی بدون انجام آزمایشاتی در خصوص تعیین جمعیت باکتری های شکمبه، میزان آمونیاک، اسیدهای چرب فرار و پروتئین میکروبی کار دشواری است.

محققین گزارش کردند، سطح تری‌گلیسیرید و کلسترول خون با مصرف جیره حاوی دانه کانولای حفاظت شده نسبت به حفاظت نشده بالاتر بود و کدجاله کانولا اثر معنی‌داری بر انسولین، تری‌گلیسیرید و کلسترول نداشت (Delbecchi et al., 2001).

به نظر می‌رسد، در جیره‌های حاوی چربی، هضم و جذب اسیدهای چرب تأمین شده از جیره افزایش یافته و توانسته است بعضی از متابولیت‌های پلاسمایی مرتبط با چربی را افزایش دهد. ولی اینکه در بعضی حالات افزایش یافته ولی معنی‌دار نبوده است، می‌تواند به دلیل سطح پایین استفاده از چربی در آزمایش باشد. ناهمسو با پژوهش حاضر در برخی آزمایش‌ها استفاده از مکمل چربی، سطح تری‌گلیسیرید پلاسمای خون (Avial et al., 2000) و کلسترول تری‌گلیسیرید (Salado et al., 2004; Lacount et al., 1994) را افزایش داد.

متابولیت‌های پلازما

اثر جیره‌های آزمایشی بر متابولیت‌های پلازما در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که غلظت گلوکز پلازما در این آزمایش در جیره دارای روغن آفتابگردان، افزایش یافت.

این افزایش در غلظت گلوکز در جیره‌های مکمل شده احتمالاً به دلیل افزایش گلوکز در مسیر گلوکونئوز است. گلوکز یکی از پیش سازهای بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در بدن حیوانات می‌باشد و غلظت آن در خون به شدت کنترل می‌شود، به طوری که متوسط غلظت گلوکز خون در گاوهای پر تولید در سه تا چهار هفته اول پس از زایمان بین ۴۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر است. بنابراین اگر یکی از جیره‌ها پیش سازهای گلوکونئیک کمتری فراهم کند، تغییر متابولیسم برای حفظ هموستازی گلوکز اتفاق می‌افتد (Emanuelson, 1989).

برخلاف گلوکز و تری‌گلیسیرید، غلظت پروتئین کل پلازما و آلبومین پلازما تحت تأثیر منابع روغن و چربی در جیره‌ها قرار نگرفت و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین جیره‌ها مشاهده نشد.

با توجه به گزارش‌های متضادی که در مورد اثر روغن و چربی بر جمعیت باکتریایی و تخمیرات وجود دارد، قضاوت در مورد فرا سنجه

جدول ۴- اثر جیره‌های آزمایشی بر فراسنج‌های خونی
Table 4- Effect of experimental diets on plasma metabolites

فراسنج‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی Experimental diets							خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی داری P-value
	گروه ۱ (جیره شاهد) Group 1	گروه ۲ Group 2	گروه ۳ Group 3	گروه ۴ Group 4	گروه ۵ Group 5	گروه ۶ Group 6	گروه ۷ Group 7		
گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر) Glucose (g/dl ⁻¹)	58.68 ^b	55.60 ^b	56.85 ^b	62.85 ^a	61.68 ^a	60.60 ^a	60.85 ^a	0.69	0.00
کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر) Cholesterol (g/dl ⁻¹)	46.52 ^b	46.52 ^a	45.75 ^b	49.90 ^a	45.40 ^b	49.52 ^a	45.75 ^b	3.80	0.00
تری‌گلیسرید (میلی گرم در دسی لیتر) Triglyceride (g/dl ⁻¹)	14.75	15.20	15.25	14.27	14.45	14.20	14.25	0.38	0.00
کل پروتئین پلاسما (گرم در دسی لیتر) Total plasma protein (g/dl ⁻¹)	7.60	7.60	7.80	7.62	7.80	7.60	7.87	0.04	0.39
آلبومین (گرم در دسی لیتر) Albumin (g/dl ⁻¹)	4.27	4.25	4.32	4.31	4.37	4.52	4.02	0.03	0.11

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: گروه ۱- جیره پایه بدون روغن، گروه ۲- دو در صد روغن آفتابگردان، گروه ۳- دو در صد روغن کانولا، گروه ۴- دو در صد پیه، گروه ۵- چهار در صد روغن آفتابگردان، گروه ۶- چهار درصد روغن کانولا، گروه ۷- چهار درصد پیه
^۲ اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف با هم تفاوت معنی دار دارند (P<0/05).

^۱ Experimental diets including: Group 1- control group (no additive) Group 2- (2% sunflower oil), Group 3- (2% canola oil), Group 4- (2% tallow), Group 5- (4% oil) Sunflower), group 6 (4% canola oil), group 7 (4% tallow).
 Means within same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).²

عملکرد تولید مثلی

نتایج مربوط به عملکرد تولید مثلی در جدول ۵ نشان داده شده است. نرخ آبستنی، نرخ بره‌زایی و نرخ دوقلو‌زایی در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<0/05). بیشترین نرخ آبستنی (۱۰۰ درصد)، نرخ بره‌زایی (۱۲۵ درصد) مربوط به گروه‌های ۴ و ۵ بود و با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (P<0/05). نرخ فحلی در همه گروه‌های آزمایشی ۱۰۰ درصد بود و تمامی میش‌ها فحل شدند. بنابراین، هیچ اختلافی بین گروه‌های آزمایشی از نظر مشاهده علائم فحلی وجود نداشت.
 روغن کلزا یک روغن غذایی با کیفیت بالا، با کمترین مقدار اسیدهای چرب اشباع در بین همه روغن‌ها، مقدار بالای اسید اولئیک و مقادیر مفیدی از اسید لینولئیک و اسید لینولنیک با یک نسبت بسیار خوب است.

اثرات سودمند افزایش چربی جیره در مطالعات زیادی نشان داده شده است، به طوری که مکمل کردن اسیدهای چرب غیراشباع در جیره به طرق مختلف می‌تواند بر عملکرد تولید مثلی تأثیر گذار شود (Ferreira et al., 2016 and Lucy et al., 1986).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، استفاده از روغن‌های گیاهی و جانوری در میش در این تحقیق نشان داده شد که تأثیر مثبتی بر عملکرد تولید مثلی میش داشت و همچنین باعث بهبود شاخص‌های عملکردی در این تحقیق گردید. نتایج این تحقیق نشان داده شد که بین دو و چهار درصد روغن‌های استفاده شده در جیره تفاوت معنی‌دار و شاخصی وجود نداشت و به‌منظور کاهش نرخ هزینه‌های مصرفی، میزان دو درصد در جیره پیشنهاد می‌گردد.

جدول ۵- مقایسه عملکرد تولیدمثلی در گروه‌های مختلف آزمایش
Table 5- Comparison of reproductive performance in different experimental groups

فراسنجه‌ها Parameters	جیره‌های آزمایشی Experimental diets							خطای استاندارد میانگین SEM	احتمال داری P-value
	گروه ۱ (جیره شاهد) Group 1	گروه ۲ Group 2	گروه ۳ Group 3	گروه ۴ Group 4	گروه ۵ Group 5	گروه ۶ Group 6	گروه ۷ Group 7		
نرخ آبستنی (درصد) Pregnancy rates (%)	(6/8) ^c 75	(5/8) ^c 62.5	(7/8) ^b 87.5	(8/8) ^a 100	(8/8) ^a 100	(6/8) ^c 75	(7/8) ^b 87.5	6.22	0.00
نرخ بره‌زایی (درصد) Lambing rate (%)	(8/8) ^b 100	(9/8) ^b 112.5	(10/8) ^a 125	(10/8) ^a 125	(10/8) ^a 125	(9/8) ^b 112.5	(8/8) ^b 100	5.35	0.00
نرخ مرده‌زایی (درصد) Mortality rate (%)	(0/8) ^a 0	(0/8) ^a 0	(0/8) ^a 0	(0/8) ^a 0	(1/8) ^b 12.5	(0/8) ^a 0	(1/8) ^b 12.5	1.20	0.00
نرخ دو قلو‌زایی (درصد) Twin delivery rate (%)	(2/8) ^b 25	(4/8) ^a 50	(3/8) ^a 37.5	(2/8) ^b 25	(2/8) ^b 25	(3/8) ^a 37.5	(1/8) ^c 12.5	2.12	0.00

* نرخ آبستنی (تعداد میش‌های آبستن شده تقسیم بر تعداد میش‌های تلقیح شده)، نرخ بره‌زایی (بره‌های متولد شده تقسیم بر تعداد میش‌های زایمان کرده)، مرده‌زایی (بره‌های مرده متولد شده تقسیم بر تعداد میش‌های زایمان کرده) و دو قلو‌زایی (تعداد میش‌های دو قلو‌زا تقسیم بر تعداد میش‌های زایمان کرده).

^۱ تیمارهای آزمایشی شامل: گروه ۱- جیره پایه بدون روغن، گروه ۲- دو در صد روغن آفتابگردان، گروه ۳- دو در صد روغن کانولا، گروه ۴- دو در صد پیه، گروه ۵- چهار در صد روغن آفتابگردان، گروه ۶- چهار درصد روغن کانولا، گروه ۷- چهار درصد پیه

^۲ اعداد با حروف متفاوت در هر ردیف با هم تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

^۳ نرخ بره‌زایی (بره‌های متولد شده به میش‌های زایمان کرده)، دو قلو‌زایی (تعداد میش‌های دو قلو‌زا به میش‌ها زایمان کرده)، مرده‌زایی (بره‌های مرده متولد شده به میش‌های زایمان کرده) و نرخ آبستنی.

* Pregnancy rates (the number of pregnant ewes divided by the number of inseminated ewes), Lambing rate (born lambs divided by the number of ewes that gave birth), Twin delivery rate (number of twin ewes divided by the number of ewes that gave birth), and Mortality (stillborn lambs divided by the number of ewes that gave birth)

¹ Experimental diets including: Group 1- control group (no additive) Group 2- (2% sunflower oil), Group 3- (2% canola oil), Group 4- (2% tallow), Group 5- (4% oil) Sunflower), group 6 (4% canola oil), group 7 (4% tallow)

² Means within same row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

³ Lambing rate (lambs born to ewes that gave birth), twinning (number of ewes that gave birth to twins), Mortality rate (dead lambs born to ewes that gave birth) and pregnancy rate.

References

- Allen, M.C. (2000). Effects of diet on short term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 90,2897-2904. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75030-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75030-2)
- AOAC. (1990). Official methods of analysis. Vol. I. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., de laFuente, L. F., & dePaz, P. (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, 63,1235–1247. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.001>
- Avial, C. D., Depeters, E. J., Perez-Monti, H., Taylor, J., & Zinn, R. A. (2000). Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83,1505-1519.
- Awawdeh, M. S., Obeidat, B. S., Abdullah, A. Y., & Hananeh, W. M. (2009). Effects of yellow grease or soybean oil on performance, nutrient digestibility and carcass characteristics of finishing Awassi lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 153,216-227. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.06.013>
- Babaei Kafiabad, M., Sadeghipanah, H., & Karimi, K. (2014). Timing of eCG injection in hormonal treatment program of estrus induction in TorkiGhashghaei ewes during deep anestrus. *Journal of Ruminant Research*, 2,113-132. (In Persian).
- Barrell, G. K., Moenter, S. M., Caraty, A., & Karsch, F. J. (1992). Seasonal changes of gonadotrophin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biology of Reproduction*, 46,1130-1135. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.6.1130>
- Bessa, R. J. B., Portugal, P. V., Mendes, I., & Santos-Silva, J. (2005). Effect of lipid supplementation on growth performance, carcass and meat quality and fatty acid composition of intramuscular lipids of lambs fed dehydrated lucerne or concentrate. *Livestock Production Science*, 96,185-194. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.017>
- Bhatt, R., Soren, N., Tripathi, M., & Karim, S. (2011). Effects of different levels of coconut oil supplementation on performance, digestibility, rumen fermentation and carcass traits of Malpuralambs. *Journal Animal Feed Science Technology*, 164,29–37.
- Broderick, G. A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86,1370-1381. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73721-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73721-7)
- Cognie, Y. (1990). Current technologies for synchronization and artificial insemination of sheep (Ed.), Reproductive physiology of Merino sheep (pp. 202-215). The University of Western, Australia: Nedlands, Perth.

12. Delbecchi, L., Ahnadi, C. E., Kennelly, J. J., & Lacasse, P. (2001). Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. *Journal of Dairy Science*, 84(6),1375-1381. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70168-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70168-3)
13. Didarkhah, M. (2018). Overview browsing the different methods of synchronizing and triggering ovulation. *Journal of Biosafety*, 10,31-46. (In Persian).
14. Emanuelson, M. (1989). Rapeseed products of double low cultivars to dairy cows: Effects of long term feeding and studies on rumen metabolism. In: Report 189, Department of Animal Nutrition and Management, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
15. Ensminger, M. E., & Olentine, C. G. (1990). Feed and nutrition. First edition, The Ensminger Publishing Company. California. U.S.A.
16. Fair, S., Hanrahan, J. P., O'Meara, C. M., Duffy, P., Rizos, D., Wade, M., Donovan, A., Boland, M. P., Lonergan, P., & Evans, A. C. O. (2005). Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, 63,1995-2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.005>
17. Ferreira, E. M., Pires, A. V., Susin, I., Gentil, R. S., Parente, M. O. M., Nolli, C. P., Meneghini, R. C. M., Mendes, C. Q., & Ribeiro, C. V. D. M. (2014). Growth, feed intake, carcass characteristics, and meat fattyacid profile of lambs fed soybean oil partially replacedby fish oil blend. *Journal Animal Feed Science Technology*, 187,9-18. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.09.016>
18. Ferreira, E. M., Pires, A. V., Susin, I., Gentil, R. S., Parente, M. O. M., Nolli, C.P., Meneghini, R. C. M., Mendes, C. Q., & Ribeiro, C. V. D. M. (2016). Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Journal Animal Feed Science Technology*, 216,30-39. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007>
19. Fonseca, J., Maffili, V., Rodrigues, M., Santos, A., Rovay, H., & Neto, A. P. (2018). Effects of hCG on progesterone concentrations and fertility in cyclic, lactating Alpine goats. *Animal Reproduction*, 3(4),410-425.
20. Jenkins, T. C., & Palmquist, D. L. (1984). Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science*, 67,978-986. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81396-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81396-X)
21. Kellems, R. O., & Church, D. C. (2002). Livestock feeds and feeding, The Pearson Hall, New Jersey.
22. Khorasani, G. R., De Boer, G., Robinson, B., & Kennelly, J. J. (1994). Influence of dietary protein and starch on production and metabolic responses of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77,813-824.
23. Lacount, D. W., Drackley, J. K., Laesch, S. O., & Clark, J. H. (1994). Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusions of canola or high oleic sunflower fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 77,1372-1385.
24. Lucy, M. C., & Stevenson, J. S. (1986). Gonadotropin-releasing hormone at estrus: Luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. *Biology Reproduction*, 35,300-311.
25. Machmüller, A. (2006). Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Journal Agriculture Ecosystems & Environment*, 112,107-114. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.08.010>
26. Mazhari, M., DaneshMesgaran, M., & HeraviMoussavi, A. (2009). Effect of diet containing a variety of Iranian rapeseeds meal on high producing lactating Holstein cow responses. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8,265-269.
27. Mahmoud, O. M., Haroun, E. M., Sobaih, M. A., Omer, O. H., Adam, S. E. I. (2001). Comparative efficacy of *Calotropis procera* latex and sulfadimidine against experimentally-induced *Eimeria ovinoidalis* infection in Najdi lambs. *Small Rumin. Researche*, 42, 130-140. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(01\)00237-1](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(01)00237-1)
28. Roy, A., Mandal, G. P., & Patra, A. K. (2013). Evaluating the performance carcass traits and conjugated linoleic acid content in muscle and adipose tissues of black Bengal goats fed soybean oil and sunflower oil. *Animal Feed Science Technology*, 185,43-52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.07.004>
29. Salado, E. E., Gagliostro, G. A., Becu-Villalobos, D., & Lacou-Mengido, I. (2004). Partial replacement of corn grain by hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 87,1265-1278. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73277-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73277-4)
30. SAS, Institute. (2003). SAS, user 's Guide. Version 9.1 Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
31. Stockdale, C.R. (2007). Effects of body conditionscore at calving and feeding various types ofconcentrate7 National Research Council. *National Academy of Sciences., Washington Livestock Science*, 116, 191-202.
32. Varga, G. A., & Kolver, E. S. (1997). Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. *Journal Nutrition*, 127,819-823. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.819s>
33. Wu, Z., Ohajmata, A., & Palmqaist, D. (1989). Ruminant synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 74,3025. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78488-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78488-9)
34. Zeleke, M., Greyling, J., & Schwalbach, L. (2005). Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Researche*, 56,47-53. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.12.006>



The Effect of Ginger on Frozen-Thawed Sperm Quality and Fertility of Broiler Breeder Roosters

Khalil Mirzadeh^{1*}, Amin Kazemizadeh²

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Khuzestan, Iran.

2- Ph.D. Graduated, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Khuzestan, Iran.

*Corresponding Author's Email: mirzadeh2019@gmail.com

Received: 27-01-2023
Revised: 20-03-2023
Accepted: 28-06-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Mirzadeh, K., & Kazemizadeh, A. (2023). The effect of ginger on frozen-thawed sperm quality and fertility of broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 515-527. (in Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80826.1125>

Introduction: Fertility is one of the main factors influencing the economic result in poultry flocks and it is influenced by several variables including breed, nutrition quality, flock age and sperm quality. As a result, the decrease in the fertility of beef mother herds after the peak of production is one of the most important factors in reducing the economic profit of breeding units. It has been shown that fertility decline at the end of the productive period can be partially prevented through artificial insemination. The requirement for optimal use of artificial insemination in any species is the possibility of storing sperm in liquid and frozen form. Fertility rate of poultry sperm in frozen conditions is facing a serious challenge compared to other species, this challenge may be related to some special physiological characteristics of rooster sperm that lead to increased sensitivity in frozen conditions. Ginger is a plant that has strong antioxidant substances, which increases the level of antioxidant enzymes and collects free radicals and protects the cell membrane against the risk of oxidation and peroxidation of fats. The main antioxidant compounds in ginger are gingerols, sesquiterpenes, shogaols and some phenolic ketone derivatives, which have the ability to neutralize superoxide and hydroxyl radicals. This evidence shows that adding ginger powder to the diet of broilers can improve the quality of sperm after thawing and increase the fertility rate by improving the antioxidant properties of semen and protecting sperm from damage caused by freezing-thawing.

Materials and Methods: In this research, twenty-seven Ras 308 breeding broilers were tested in the southern desert research farm in collaboration with Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. At the age of 47 weeks, the sows were habituated for two weeks in individual cages and fed with basic ration and abdominal rubbing method for sperm collection. From the age of 49 to 60 weeks for 12 weeks, the sows were fed with a basic diet (control group) or diets with different levels of ginger powder (treatment groups) and kept at a temperature of 19-23 degrees Celsius and a photoperiod of 14 hours of light and 10 hours of darkness. Experimental treatments included: control diet (no feeding of ginger powder), daily feeding of 7.5 grams of ginger powder and daily feeding of 15 g of ginger powder per kg of diet. During the test period, sperm samples were collected weekly by abdominal rub method and after initial evaluation, from the age of 51 weeks, they were frozen, and the quality parameters of semen, including total and progressive aspect, plasma membrane function, sperm viability and morphology after thawing were evaluated. took Frozen semen samples from weeks



59 and 60 were inoculated into broiler hens to evaluate sperm fertility after thawing.

Results and Discussion: The effect of treatment and test weeks on most of the parameters measured including total and progressive motility, viability and function of sperm plasma membrane was significant. The interaction of treatment and test weeks significantly affected overall and progressive behavior, but its effect on survival tended to be significant. The effects of treatment, week and the interaction of treatment in week had no significant effect on the percentage of abnormal sperms. The study by Shafiq et al. (2015) improved the storage of rooster sperm using rosemary essential oil after the freezing and thawing process; The results of the research showed that the use of rosemary essential oil in the diluent improves the quality of rooster sperm, which is consistent with the present research. Ginger comprises essential antioxidant compounds such as gingerols, sesquiterpenes, shogaols, and certain phenolic ketone derivatives. These compounds possess the remarkable ability to neutralize superoxide and hydroxyl radicals, contributing to their sustained antioxidant activity. Furthermore, the antioxidant enzyme glutathione peroxidase plays a crucial role in safeguarding sperm in the tissues of the testis and epididymis. A decline in the levels of this enzyme within the body has been associated with infertility. Recognizing the significance of these antioxidant components and enzymes underscores their continuous impact on maintaining reproductive health. By being placed in the sperm plasma membrane, this enzyme protects the sperm nucleus and epididymal fluid from the attack of free radicals and causes the final swelling and development of sperms. Fertility percentage and sperm yield in chicks of hens fed with 7.5 and 15 g/kg of ginger powder in the diet increased significantly compared to the control group. Among the sperm parameters, sperm motility and viability are considered to be the most important factors influencing sperm transfer to SSTs; In this research, the total and progressive motility and survival were increased in the groups of 7.5 and 15 grams per kg of diet, which can be the reasons for increasing the fertility and hatching of chicks in these groups. In a research by Masoudi et al. (2021), they investigated the effect of milk thistle, carob and ginger on the reproductive performance of Ras breed broilers and reported that supplementing the diet with plant additives significantly improved the quality of sperm and fertility of the sows compared to the control group.

Conclusion: In generally, the results of the present study showed that the addition of 7.5 and 15 g per kg of ginger powder in the diet significantly increased the total and progressive motility, the integrity and function of the plasma membrane, and finally, the fertility and egg retrieval of sperm after thawing.

Keyword: Antioxidant, Insemination, Fertility, Reproductive function, Sperm abnormality, Membrane integrity

تأثیر زنجبیل بر کیفیت باروری و جوجه‌درآوری اسپرم منجمد- ذوب شده در خروس ماده گوشتی

خلیل میرزاده^{۱*}، امین کاظمی‌زاده^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷

چکیده

هدف این پژوهش، مطالعه اثر پودر زنجبیل بر فراسنجه‌های اسپرم، باروری و نرخ جوجه‌درآوری نمونه‌های منی اخذ شده از خروس‌های مادر گوشتی تغذیه شده با زنجبیل بود. این پژوهش با تعداد ۲۷ قطعه خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ با سن ۴۷ هفته و به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و نه تکرار در هر تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره شاهد (عدم تغذیه پودر زنجبیل)، تغذیه روزانه ۷/۵ گرم پودر زنجبیل و تغذیه روزانه ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره بود. پس از گذشت یک دوره عادت‌دهی (۴۸-۴۷ هفتگی) و یک دوره دو هفته‌ای تغذیه پودر زنجبیل (۵۰-۴۹ هفتگی)، فراسنجه‌های کیفی اسپرم طی هشت هفته (۵۱ تا ۵۸ هفتگی) پس از یخ‌گشایی ارزیابی شد. نمونه‌های منی هفته‌های ۵۹ و ۶۰ پس از یخ‌گشایی برای ارزیابی نرخ باروری و جوجه‌درآوری، به ۶۰ قطعه مرغ مادر گوشتی (n=۲۰) تلقیح شد. نتایج نشان داد، تحرک کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم در پرندگانی که سطح ۷/۵ و ۱۵ گرم پودر زنجبیل دریافت کرده بودند نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد ($P < 0.05$). بالاترین عملکرد غشای پلاسمایی در پرندگان دریافت‌کننده سطح ۱۵ گرم پودر زنجبیل مشاهده شد ($P < 0.05$). فراسنجه ناهنجاری اسپرم تحت تأثیر تیمار آزمایشی قرار نگرفت ($P > 0.05$). درصد باروری اسپرم و جوجه‌درآوری در تیمارهای ۷/۵ و ۱۵ گرم پودر زنجبیل به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). در کل، نتایج این پژوهش نشان از تأثیرات مثبت تغذیه‌ی پودر زنجبیل بر کیفیت اسپرم، باروری و جوجه‌درآوری خروس‌های مادر گوشتی پس از یخ‌گشایی داشت.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تلقیح، جنبای، عملکرد تولیدمثل، ناهنجاری اسپرم، یکپارچگی غشا

مقدمه

خروس‌ها به دلیل نسبت کمتر در گله‌های جوجه‌های گوشتی نقش مهمی در باروری دارند. بنابراین، تمرکز بر بهبود کیفیت مایع منی و عملکرد اسپرم برای به حداکثر رساندن عملکرد تولیدمثل ضروری است (Sabzian-Melei et al., 2022). نشان داده شده است که کاهش باروری در انتهای دوره تولیدی از طریق تلقیح مصنوعی تا حدی قابل جلوگیری است. لازمه استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی در هر گونه‌ای، امکان ذخیره‌سازی اسپرم به صورت مایع و منجمد می‌باشد.

نرخ باروری اسپرم طیور در شرایط منجمد در مقایسه با دیگر گونه‌ها با چالش جدی مواجه است، این چالش ممکن است به برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاص اسپرم خروس مربوط شود که به افزایش حساسیت آن در شرایط منجمد می‌انجامد (Shahverdi et al., 2015). فاکتورهای غشایی اسپرم از جمله سیالیته غشا، نفوذپذیری و همچنین ترکیبات لیپیدی آن در شرایط مایع (چهار درجه

کاهش باروری گله‌های مادر گوشتی پس از اوج تولید از مهم‌ترین عوامل کاهش سود اقتصادی واحدهای پرورشی به‌شمار می‌آید). اگر چه این کاهش باروری هم به مرغ و هم خروس نسبت داده می‌شود، بخش عمده کاهش باروری گزارش شده پس از اوج مربوط به خروس است؛ زیرا جایگزینی خروس‌های پیر با جوان در گله‌های تجاری باعث افزایش باروری می‌شود (Sabzian-Melei et al., 2022).

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

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

*- نویسنده مسئول: (Email: mirzadeh2019@gmail.com)

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80826.1125>

مواد و روش‌ها

زنجبیل: برای تهیه پودر زنجبیل مورد استفاده در پژوهش، ابتدا پودر زنجبیل از شرکت تجاری سبزیجات خشک و خشکبار طلای سبز (مشهد- ایران) خریداری و به تأیید مرکز گیاه‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان رسید.

برنده‌ها، شرایط محیطی و جیره‌ی آزمایشی: در این پژوهش، ۲۷ قطعه خروس مادرگوشی راس ۳۰۸ در مزرعه تحقیقاتی صحرای جنوب زیر مجموعه شرکت زنجیره‌ای تولید گوشت مرغ کیمند راه‌مرز (مجهز به دستگاه زمان‌سنج، دماسنج، هیتر برقی و هواکش) با همکاری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان مورد آزمون قرار گرفت. خروس‌ها در سن ۴۷ هفتگی به مدت دو هفته در قفس‌های انفرادی و تغذیه با جیره‌پایه و روش مالش شکمی برای اسپرم‌گیری عادت‌دهی شدند. از سن ۴۹ تا ۶۰ هفتگی به مدت ۱۲ هفته، خروس‌ها با جیره‌ی پایه (گروه شاهد) یا جیره‌های دارای سطوح مختلف پودر زنجبیل (گروه‌های تیماری) تغذیه و با دمای ۲۳-۱۹ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جیره پایه بر اساس توصیه کاتالوگ راس ۳۰۸ (۲۰۱۶) (جدول ۱) تنظیم شد. تیمارهای آزمایشی شامل: جیره شاهد (عدم تغذیه پودر زنجبیل)، تغذیه روزانه ۷/۵ گرم پودر زنجبیل و تغذیه روزانه ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره بود.

جمع‌آوری و ارزیابی منی: طی مدت آزمایش، نمونه‌های منی به صورت هفتگی با روش مالش شکمی جمع‌آوری و پس از ارزیابی اولیه (حجم منی، غلظت اسپرم و تحرک)، از سن ۵۱ هفتگی، منجمد شد، و فراسنجه‌های کیفی منی شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، عملکرد غشای پلاسمایی، زنده‌مانی و ریخت‌شناسی اسپرم پس از یخ‌گشایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های منی منجمد مربوط به هفته‌های ۵۹ و ۶۰ برای ارزیابی باروری اسپرم پس از یخ‌گشایی به مرغ‌های مادر گوشتی تلقیح شد.

تهیه رقیق‌کننده: گلوتامات سدیم ۱ آبه (۰/۸۶۷ گرم)، هیدروژن منو فسفات بازیگ (۰/۰۷ گرم)، پتاسیم سیترات ۱ آبه (۰/۰۶۴ گرم)، منیزیم کلراید ۶ آبه (۰/۰۳۴ گرم)، هیدروژن فسفات پتاسیم دی بازیگ (۰/۷۵۹ گرم)، تریس (۰/۲۷ گرم در لیتر)، سدیم استات ۳ آبه (۰/۳۱ گرم در لیتر)، فروکتوز (۰/۵ گرم در لیتر) و آب مقطر ۱۰۰ سی سی خواهد بود. فشار اسمزی رقیق‌کننده ۳۱۰ و pH آن ۷/۴ بود (Ansari et al., 2017).

سانتی‌گراد) تحت تأثیر قرار می‌گیرد، به طوری که میزان سیالیت غشا و مقدار این ترکیبات کاهش یافته و در نتیجه، کیفیت اسپرم و باروری پرندگانه کاهش می‌یابد (Blesbois et al., 2015).

غشای پلاسمایی اسپرم دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه است، که از این لحاظ آن‌ها را به آسیب‌های پراکسیداتیو بسیار حساس می‌کند. این آسیب‌های پراکسیداتیو موجب کاهش یکپارچگی غشا، آسیب به عملکرد سلول، کاهش جنبایی و در نهایت، کاهش کیفیت و توانایی باروری اسپرم می‌شود. بنابراین، برای جلوگیری از آسیب‌های پراکسیداسیون، به‌ویژه هنگام فرآیند انجماد، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها مفید به نظر می‌رسد (Leboeuf et al., 2000). با توجه به اثرات شناخته شده رادیکال‌های آزاد بر کاهش عملکرد تولیدمثلی، استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص درمانی و آنتی‌اکسیدانی بالا سبب افزایش عملکرد تولیدمثلی می‌شود (Zini et al., 2009).

گیاه زنجبیل (Ginger) با نام علمی *Zingiber officinale* گیاهی است دو تا چند ساله، که بخش اصلی و مورد استفاده آن ساقه زیرزمینی یا ریزوم آن است (Heidarzadeh et al., 2018; Ibtisham et al., 2019). ترکیبات فیتوشیمیایی زنجبیل اسانس‌ها، ترکیبات فنلی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها و تانن‌ها را شامل می‌شود (Dugasani et al., 2010; Ibtisham et al., 2019). زنجبیل گیاهی است که مواد آنتی‌اکسیدانی قوی‌ای داشته که با افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد از غشای سلولی در مقابل خطر اکسیداسیون و پراکسیداسیون چربی‌ها محافظت به عمل می‌آورد (Heidarzadeh et al., 2018). اصلی‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در زنجبیل جینجروول‌ها، سز کوئی‌ترین‌ها، شوگانول‌ها و برخی مشتقات کتون فنولیک آن‌ها هستند که از توانایی خنثی کردن رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل برخوردار می‌باشند (Dugasani et al., 2010; Ibtisham et al., 2019). این شواهد نشان می‌دهد که احتمالاً افزودن پودر زنجبیل به جیره خروس‌های مادرگوشی می‌تواند از طریق بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی منی و محافظت از اسپرم در مقابل آسیب‌های حاصل از انجماد- یخ‌گشایی، کیفیت منی پس از یخ‌گشایی را بهبود دهد و نرخ باروری را افزایش دهد. لذا، با در نظر گرفتن خواص آنتی‌اکسیدانی پودر زنجبیل و همچنین عدم وجود مطالعه درون تنی این ترکیب بر کیفیت منی منجمد شده خروس، در این مطالعه تأثیر تغذیه‌ی پودر زنجبیل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادرگوشی و باروری و جوجه‌درآوری آن‌ها پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- مواد تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه

Table 1- Ingredients and the chemical composition of basal diet

اجزای جیره Ingredients	درصد %	ترکیب شیمیایی Chemical composition	درصد %
ذرت Corn	۵۶/۳۰	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم) Metabolizable energy (kcal/kg)	۲۷۹۰/۰۰
کنجاله سویا (۴۴٪ پروتئین) Soybean meal (44% protein)	۹/۰۰	پروتئین خام Crude protein	۱۲/۶۰
سبوس گندم Wheat bran	۱۹/۰۰	لیزین Lysine	۰/۵۷
جو Barley	۷/۰۰	متیونین Methionine	۰/۲۸
روغن سویا Soybean oil	۳/۰۰	متیونین + سیستین Methionine+ cystine	۰/۵۲
دی کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	۱/۳۰	ترئونین Threonine	۰/۴۸
پودر صدف Oyster shell	۱/۲۵	کلسیم Calcium	۰/۸۳
جوش شیرین Sodium bicarbonate	۰/۲۵	فسفر قابل دسترس Available phosphorus	۰/۳۶
نمک Common salt	۰/۲۰	سدیم Sodium	۰/۱۸
دی ال - متیونین DL-methionine	۰/۰۷	کلر Chlorine	۰/۱۸
ال - لیزین Lysine	۰/۰۴		
ترئونین Threonine	۰/۰۴		
کولین کلراید Choline chloride	۰/۰۵		
بنتونیت Bentonite	۲/۰۰		
مکمل ویتامینی و معدنی Vitamin and mineral premix*	۰/۵۰		

* در جیره پایه پودر زنجبیل جایگزین سبوس شد.

** هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، چهار میلی‌گرم ویتامین K₃، ۳۰ میکروگرم ویتامین B₁₂، ۳۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۷/۵ میلی‌گرم B₂، ۵۰ میلی‌گرم B₃، ۱۸ میلی‌گرم B₅، ۵/۵ میلی‌گرم B₆ و ۵۰ میکروگرم B₇ بود.
*** هر کیلوگرم جیره حاوی ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۳۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۲۰ میلی‌گرم روی، دو میلی‌گرم ید و ۰/۴ میلی‌گرم سلنیوم بود.

* Ginger powder was replaced with bran in the basic ration.

** Supplied per kg diet: vitamin A, 15000 IU; vitamin E, 100 IU; vitamin K₃, 4 mg; vitamin B₁₂, 3 µg; vitamin D₃, 3,500 IU; riboflavin, 7.5 mg; niacin, 50 mg; pantothenic acid, 18 mg; pyridoxine, 5.5 mg; biotin, 50 µg, Fe, 75000 mg; Mn, 74500 mg; Zn, 64775 mg; I, 869 mg and Se, 142000 mg.

*** Supplied per kg diet: 50 mg of iron, 130 mg of manganese, 120 mg of zinc, 2 mg of iodine and 0.4 mg of selenium.

بلافاصله از یخچال بیرون آورده و به مدت ۱۰ دقیقه در فاصله شش سانتی‌متری ازت مایع قرار داده شد. پس از غوطه‌ورسازی در ازت، پایوت‌های مربوط به هر گروه تیماری داخل گالبت‌های مخصوص قرار داده شد و به تانک ازت انتقال یافت. برای یخ‌گشایی، پایوت‌ها پس از بیرون آوردن از ازت، به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Shahverdi et al., 2015).

روش انجماد - یخ‌گشایی: انزال هر خروس به صورت جداگانه جمع‌آوری و با رقیق‌کننده ذکر شده با غلظت نهایی 4×10^8 رقیق‌سازی شد، و در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد. از پودر پلی‌وینیل‌الکل برای بستن سر پایوت‌ها استفاده شد. سپس پایوت‌ها به داخل یخچال با دمای پنج درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت برای رسیدن به دمای تعادل قرار داده شد. در مرحله بعد، پایوت‌ها را

آنالیز آماری

تمامی داده‌های آزمایشی از نظر داشتن توزیع نرمال با آزمودن توزیع باقی‌مانده داده‌ها توسط رویه UNIVARIATE نرم‌افزار آماری (SAS, 2002) مورد آزمایش قرار گرفت. فراسنجه‌های کیفی منی که در طول زمان تکرار شده بودند توسط رویه MIXED و داده‌های مربوط به باروری با استفاده از تابع لجستیک و رویه GENMOD واکاوی شدند. مقایسه میانگین تیمارها برای هر صفت با آزمون چند دامنه‌ای توکی و در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد. وزن بدن به عنوان عامل همبسته برای صفات در نظر گرفته شد و در صورتی که اثر آن در مدل معنی‌دار نبود، از مدل حذف و آنالیز مجدد انجام شد.

مدل ۱ به صورت زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + \delta(i)k + (T \times P)_{ij} + e_{ijk} \quad (1)$$

که در آن، Y_{ijk} : مقدار هر مشاهده، μ : اثر میانگین، T_i : اثر تیمار i ($i=1, 2, 3, 4$)، P_j : اثر ژامین زمان اندازه‌گیری، $\delta(i)k$: اثر تصادفی پرند، $(T \times P)_{ij}$: برهم‌کنش i آمین تیمار در ژامین زمان اندازه‌گیری و e_{ijk} : اثرات باقی‌مانده هستند.

مدل آماری برای نرخ باروری و جوجه‌درآوری به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (2)$$

که در آن، Y : داده‌های باروری، μ : اثر میانگین، T_i : اثر تیمار i ($i=1, 2, 3, 4$) و e_{ij} : اثرات باقی‌مانده هستند.

نتایج و بحث

تأثیر تغذیه پودر زنجبیل بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی در جدول ۲ گزارش شده است. اثر تیمار و هفته‌های آزمایش بر اغلب فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم معنی‌دار بود ($P < 0.01$). برهم‌کنش تیمار و هفته‌های آزمایش به‌طور معنی‌داری جنبایی کل و پیش‌رونده را تحت تأثیر قرار داد، اما اثر آن بر زنده‌مانی تمایل به معنی‌داری داشت ($P = 0.07$). اثرات تیمار، هفته و برهم‌کنش تیمار در هفته اثر معنی‌داری بر درصد اسپرم‌های نابهنجار نداشت ($P > 0.01$).

پودر زنجبیل به‌طور خطی میانگین جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم را افزایش داد (جدول ۲؛ $P < 0.05$)؛ روند تغییرات در میزان جنبایی اسپرم‌های جمع‌آوری شده طی هفته‌های مختلف آزمایش (شکل ۱ و ۲) نشان داد، فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده در پرندگان تغذیه شده با پودر زنجبیل با گذشت زمان روند افزایشی نشان داد.

همه سطوح پودر زنجبیل درصد اسپرم‌های زنده را نسبت به گروه شاهد افزایش داد ($P < 0.05$). آن‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، زنده‌مانی اسپرم برای گروه شاهد در طول دوره پژوهش با

ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم پس از فرآیند

یخ‌کشایی: درصد تحرک اسپرم‌های هر نمونه، با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست (Labomed Inc., Los Angeles, USA) و بزرگ‌نمایی $\times 400$ تعیین شد (Akhlaghi et al., 2014). برای اندازه‌گیری یکپارچگی غشای اسپرم از آزمون تورم هایپواسموتیک (Hypo Osmotic Swelling test) استفاده شد (Khaki et al., 2009). بدین منظور، ۱۰ میکرولیتر از منی با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول هایپواسموتیک (یک گرم سترات سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم)، ($pH = 7$) مخلوط شد، و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی $\times 400$ ، حداقل در پنج میدان دید، ۲۰۰ اسپرم بررسی شد. اسپرم‌های با دم متورم به‌عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم غیرمتورم، به‌عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند (Kazemizadeh et al., 2019). درصد اسپرم زنده با رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین ارزیابی شد. یک قطره از مایع منی روی لام قرار گرفته و با یک قطره کوچک رنگ ائوزین-نیگروزین مخلوط و گسترش یافت. درصد اسپرم زنده با شمارش ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی $\times 400$ مشخص شد (Akhlaghi et al., 2014; Ibtisham et al., 2019). اسپرم‌های رنگ نگرفته، به‌عنوان اسپرم زنده و اسپرم‌هایی که رنگ را جذب کرده بودند، به‌عنوان اسپرم مرده در نظر گرفته شد. همچنین برای بررسی ریخت‌شناسی اسپرم در نمونه‌های منجمد-یخ‌کشایی شده، اسپرم‌های با سر جدا شده، سر ناقص، سر دوتایی، دم پیچ خورده، دم دوتایی و دم جدا شده به‌عنوان اسپرم‌های غیرطبیعی در نظر گرفته شد (Akhlaghi et al., 2014).

تلقیح مصنوعی و گردآوری تخم مرغ: برای تلقیح

مصنوعی، تعداد ۶۰ قطعه مرغ مادر گوشتی راس ۳۰۸ (۲۰ مرغ به‌ازای هر تیمار) با میانگین سنی ۵۹ هفته انتخاب گردید و با یک جیره مشترک دارای ۲۷۶۰ کیلوکالری در کیلوگرم انرژی، ۱۵ درصد پروتئین، فسفر ۰/۳۳ درصد و کلسیم ۰/۳ درصد تغذیه شدند. برای تلقیح مصنوعی، ۲۰۰ میکرولیتر (200×10^6 اسپرم برای هر مرغ) منی یخ‌کشایی شده از هر تیمار به مرغ‌ها در طول دو هفته (سه تلقیح به فاصله سه روز) تلقیح شد. جمع‌آوری تخم‌مرغ‌ها به‌منظور تعیین باروری و جوجه‌درآوری، دو روز بعد از اولین تلقیح مصنوعی شروع شد، و چهار روز بعد از آخرین تلقیح مصنوعی ادامه یافت و روزانه پس از گازدهی با فرمالین به مدت ۲۰ دقیقه، به دستگاه جوجه‌کشی انتقال پیدا کرد.

روندی ثابت کاهش یافت، اما زنده‌مانی اسپرم خروس‌ها تغذیه شده با پودر زنجبیل با افزایش سن بهبود یافت.

جدول ۲- تأثیر پودر زنجبیل (LSM±SE) بر فراستجه‌های کیفی اسپرم پس از انجماد-بخ‌گشایی در خروس‌های مادرگوشتی مسن (نه پرنده در هر تیمار)
Table 2- The effect of ginger powder (LSM±SE) on sperm quality parameters after freezing-thawing in old broilers (9 birds per treatment)

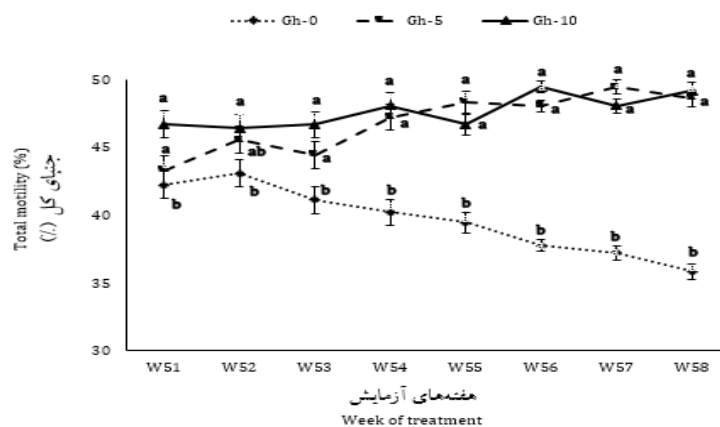
صفات Trait	پودر زنجبیل گرم / کیلوگرم / جیره ginger powder, mg/kg/diet			سطح احتمال معنی‌داری P-value		
	سطح صفر پودر زنجبیل GH0	سطح ۷/۵ پودر زنجبیل GH7.5	سطح ۱۵ پودر زنجبیل GH15	جیره diet	هفته week	هفته×جیره diet × week
	جنبایی کل (%) Total motility (%)	36.73 ^b ±0.12	44.72 ^a ±0.12	45.27 ^a ±0.12	0.001	0.001
جنبایی پیش‌رونده (%) Forward motility (%)	32.91 ^b ±0.10	40.52 ^a ±0.10	41.25 ^a ±0.10	0.001	0.001	0.001
زنده‌مانی اسپرم (%) Sperm viability (%)	39.61 ^b ±0.17	47.15 ^a ±0.17	47.36 ^a ±0.17	0.001	0.001	0.070
غشای فعال اسپرم (%) Membrane Integrity (%)	29.13 ^c ±0.13	34.51 ^b ±0.13	35.83 ^b ±0.13	0.001	0.001	0.002
اسپرم ناهنجاری (%) Abnormal sperm (%)	20.51±0.11	21.13±0.11	22.39±0.11	0.430	0.090	0.110

^{a-c}: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است (p<0.05).

پرندگان جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر زنجبیل شامل: صفر (GH-0)، ۷/۵ (GH-7.5) و ۱۵ (GH-15) گرم در کیلوگرم جیره دریافت کردند.

^{a-c}: Means with different letters within a row are statistically significant (p<0.05).

The birds received diets containing increasing levels of ginger powder including 0 (C0), 10 (C10), 20 (C20), or 30 (C30) g/kg diet.



شکل ۱- تغییرات هفتگی جنبایی کل اسپرم پس از انجماد و بخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم

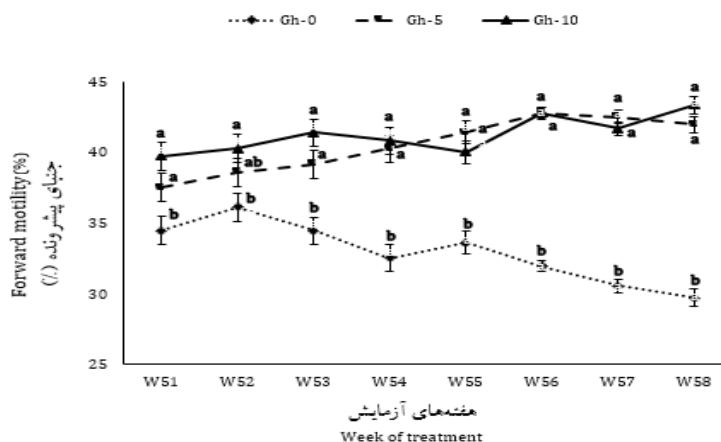
Figure 1- Weekly changes in Total motility after freezing and thawing

تیمارها شامل: GH-0= جیره پایه فاقد پودر زنجبیل (شاهد)، GH-7.5= جیره حاوی ۷/۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره، GH-15= جیره حاوی ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره

a-b: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است (p<0.05).

The treatments include: GH-0= basic diet without ginger powder (control), GH-7.5= diet containing 7.5 g of ginger powder per kg of diet, GH-15= diet containing 15 g of ginger powder per kg of diet

a- b: Means with different letters within a row are statistically significant (p<0.05).



شکل ۲- تغییرات هفتگی جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم

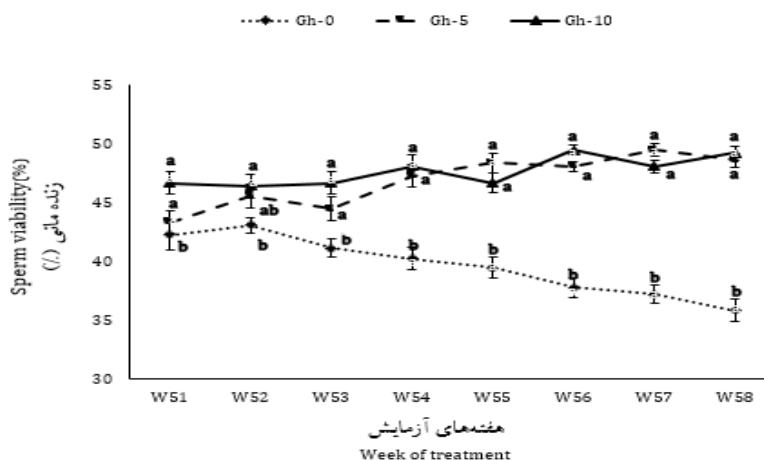
Figure 2- Weekly forward motility changes of sperm after freezing and thawing

تیمارها شامل: GH-0= جیره پایه فاقد پودر زنجبیل (شاهد)، GH-7.5= جیره حاوی ۷/۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره، GH-15= جیره حاوی ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره

a-b: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

The treatments include: GH-0= basic diet without ginger powder (control), GH-7.5= diet containing 7.5 g of ginger powder per kg of diet, GH-15= diet containing 15 g of ginger powder per kg of diet

a-b: Means with different letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).



شکل ۳- تغییرات هفتگی زنده‌مانی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم

Figure 3- Weekly changes of sperm viability after freezing and thawing

تیمارها شامل: GH-0= جیره پایه فاقد پودر زنجبیل (شاهد)، GH-7.5= جیره حاوی ۷/۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره، GH-15= جیره حاوی ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره

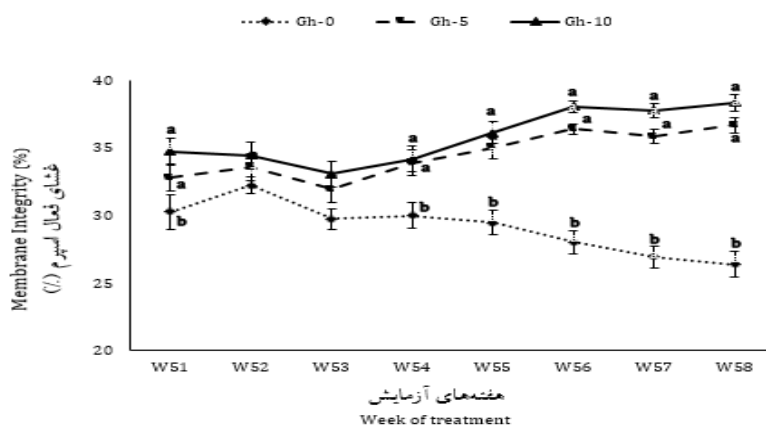
a-b: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

The treatments include: GH-0= basic diet without ginger powder (control), GH-7.5= diet containing 7.5 g of ginger powder per kg of diet, GH-15= diet containing 15 g of ginger powder per kg of diet

a-b: Means with different letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

(شکل ۴)؛ از هفته ۵۴ تا هفته پایانی پژوهش روند افزایشی در پزندگان دریافت‌کننده پودر زنجبیل نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۴).

تغذیه پودر زنجبیل درصد اسپرم‌های دارای یکپارچگی غشا را در تیمارهای GH-15 و GH-7.5 به ترتیب حدود پنج و شش درصد نسبت به گروه شاهد افزایش داد. روند تغییرات هفتگی نشان می‌دهد که در هفته‌های ۵۲ و ۵۳ تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود ندارد



شکل ۴- تغییرات هفتگی غشای فعال اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم

Figure 4- Weekly changes of active sperm membrane of sperm after freezing and thawing

تیمارها شامل: GH-0 = جیره پایه فاقد پودر زنجبیل (شاهد)، GH-7.5 = جیره حاوی ۷/۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره، GH-15 = جیره حاوی ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره

a-b: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

Treatments include: GH-0 = basic diet without ginger powder (control), GH-7.5 = diet containing 7.5 g of ginger powder per kg of diet, GH-15 = diet containing 15 g of ginger powder per kg of diet

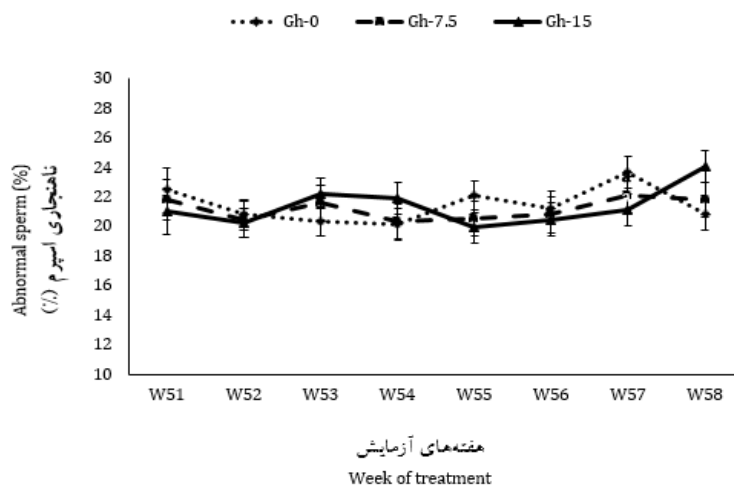
a-b: Means with different letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

شده با سطح GH-15 مشاهده شد (شکل ۵).

فراسنجه ناهنجاری اسپرم در تمام هفته‌های پژوهش تحت

گروه‌های تیماری قرار نگرفت ($P > 0.05$). تغییرات هفتگی نشان

می‌دهد در هفته‌های پایانی روند رو به افزایشی در خروس‌های تغذیه



شکل ۵- تغییرات هفتگی ناهنجاری اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی نمونه‌های اسپرم

Figure 5- Weekly changes of sperm abnormality after freezing and thawing

تیمارها شامل: GH-0 = جیره پایه فاقد پودر زنجبیل (شاهد)، GH-7.5 = جیره حاوی ۷/۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره، GH-15 = جیره حاوی ۱۵ گرم پودر زنجبیل در کیلوگرم جیره

Treatments include: GH-0 = basic diet without ginger powder (control), GH-7.5 = diet containing 7.5 g of ginger powder per kg of diet, GH-15 = diet containing 15 g of ginger powder per kg of diet.

2009). در نتیجه مصرف زنجبیل، به میزان قابل توجهی میزان آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز افزایش می‌یابد و با تکثیر و تمایز اسپرم‌ها باعث افزایش باروری می‌شود (Kota et al., 2008). به‌طور کلی، پودر زنجبیل می‌تواند موجب افزایش سطوح گلوکوتاتیون درون سلولی شود (Kota et al., 2008)؛ که در بسیاری از اعمال فیزیولوژیکی سلول از جمله محافظت سلولی از تنش اکسیداتیو، ساخت پروتئین و DNA و لقاح گامت‌ها نقش دارد (Kota et al., 2008). نشان داده شده است که ROSها می‌توانند فعالیت برخی آنزیم‌های حیاتی دخیل در تولید ATP را مهار و فسفریلاسیون پروتئین‌های آکسون اسپرم را کاهش دهند (Saeid et al., 2011). بنابراین، بهبود مشاهده شده در جنبایی اسپرم در گروه‌های تیماری دارای پودر زنجبیل احتمالاً می‌تواند به دلیل کاهش ROS، افزایش تولید ATP و بهبود فسفریلاسیون پروتئین‌های آکسون نسبت داده شود. از طرفی، زنجبیل به دلیل دارا بودن مواد آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین E و سلنیوم و گلوکوتاتیون پراکسیداز احتمالاً از طریق کاهش آثار سمی گونه‌های فعال اکسیژن سبب بهبود تحرک اسپرم خروس طی فرآیند انجماد می‌شود؛ در نهایت، بر اساس مطالبی که بیان شد، پودر زنجبیل از طریق افزایش سطوح گلوکوتاتیون و افزایش فعالیت سوپراکسید دسموتاز (به‌طور کل، از طریق بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام) و بهبود استروئیدسازی در بیضه خروس‌ها، و همچنین وجود ترکیبات مانند ویتامین E و سلنیوم، موجب کاهش تنش اکسیداتیو و بهبود کیفیت اسپرم می‌شود.

در این پژوهش، افزودن سطح ۷/۵ و ۱۵ گرم در کیلوگرم پودر زنجبیل در جیره باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم شد؛ در راستای پژوهش حاضر، نعمتی و همکاران (Nemati et al., 2022) که به بررسی اثرات مکمل زنجبیل بر بافت‌شناسی بیضه، خصوصیات مایع منی و عملکرد تولیدمثلی در خروس‌های گوشتی مسن پرداختند، گزارش کردند، مکمل‌های ریشه زنجبیل در جیره غذایی خروس‌های مسن اثر مفیدی بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم، وضعیت آنتی‌اکسیدانی منی و شاخص اسپرم‌زایی بیضه داشت. از آنجایی که تجمع رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون چربی‌های غشا و اختلال در عملکرد غشای اسپرم و میتوکندری شده و باعث کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود، به نظر می‌رسد زنجبیل به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی (ویتامین E، ویتامین C و سلنیوم) از طریق تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد و از بین بردن عوامل سمی باعث سلامت غشای پلاسمایی اسپرم و غشای میتوکندری شده از طرفی، ترکیبات آنتی‌اکسیدان زنجبیل با کنترل تنظیم مصرف ATP از هدر رفتن انرژی سلولی جلوگیری کرده (Sanocka and Kurpisz, 2004) و باعث افزایش زنده‌مانی اسپرم می‌شود. گلوکوتاتیون پراکسیداز با قرار گرفتن در غشای پلاسمایی اسپرم و هسته اسپرم و مایع اپیدیدیم و ناحیه اپیدیدیم، اسپرم‌ها را گزند ROSها و رادیکال‌ها آزاد حفظ

اسیدهای چرب غالب در اسپرم طیور، اسید آرشیدونیک و اسید دکوزاترانوئیک (امگا ۶) می‌باشد؛ بنابراین مشخصه اسپرم طیور مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چندین باند دوگانه از سری امگا ۶ است، با در نظر گرفتن اینکه اسیدهای چرب بلند زنجیره سری امگا ۳ در اسپرم پستانداران غالب است (Dugasani et al., 2007)، غشای اسپرم پرندگان نسبت به پستانداران از درجه غیراشباع بالاتری برخوردار است. به این دلیل، اسپرم طیور نسبت به پراکسیداسیون لپیدی حساس‌تر است (Blesbois et al., 2005). پراکسیداسیون لپیدی باعث پایین آمدن کیفیت اسپرم خروس و فراسنجه‌های مربوط به آن می‌شود، بنابراین برای جلوگیری از این امر و همچنین برای بهبود نگه‌داری منی طیور جهت انجام کارهای تحقیقاتی و یا انجام تلقیح مصنوعی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها امری بدیهی به نظر می‌رسد (Kazemizadeh et al., 2011; Bilodeau et al., 2001; 9).

همان‌گونه که بیان شد، زنجبیل حاوی ترکیباتی از قبیل شوگاوال‌ها، جینجروال‌ها و سزکوی‌ترین است که آنتی‌اکسیدان بوده و موجب مهار متابولیت‌های فعال و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود (Akhlaghi et al., 2014; Dugasani et al., 2010). زنجبیل همچنین حاوی مواد آنتی‌اکسیدان شناخته‌شده‌ای مانند سلنیوم، ویتامین E و C، فلاونوئیدها و گلوکوتاتیون است (Nemati et al., 2022). اخلاقی و همکاران (Akhlaghi et al., 2014) به مطالعه بررسی تأثیر زنجبیل بر بازده خروس‌های مادر گوشتی تجاری پرداخته و بهبود معنی‌دار کیفیت منی، افزایش میزان اسیدهای چرب اسپرم و بالا رفتن بازدهی تولیدمثلی در خروس‌های تغذیه شده گزارش نمودند. در مطالعه این محققین، افزایش معنی‌دار تحرک پیش‌رونده اسپرم، افزایش قابلیت زنده‌مانی سلول‌های جنسی و یکپارچگی بیشتر غشای سیتوپلاسمی اسپرم را در خروس‌های دریافت‌کننده پودر زنجبیل مشاهده نمودند.

مطالعه شفیق و همکاران (Shafiq et al., 2015) به بهبود ذخیره‌سازی اسپرم خروس با استفاده از اسانس رزماری بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی پرداختند؛ نتایج پژوهش نشان دادند، که استفاده از اسانس رزماری در رقیق‌کننده، کیفیت اسپرم خروس را بهبود می‌بخشد، که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. احتمالاً پودر زنجبیل باعث ترمیم DNAهای شکسته و آسیب‌دیده می‌شود، در نتیجه، موجب می‌شوند که سلول‌های ژرمینال به تقسیمات میوزی و میتوزی خود ادامه دهند (Kota et al., 2008). علاوه‌براین، آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در حفظ اسپرم‌ها در بافت بیضه و اپیدیدیم نقش ویژه‌ای ایفا می‌کند و کاهش این آنزیم در بدن سبب نازایی می‌شود. این آنزیم با قرار گرفتن در غشای پلاسمایی اسپرم، هسته اسپرم و مایع اپیدیدیم را از گزند رادیکال‌های آزاد حفظ نموده و سبب بالیدگی نهایی و تکامل اسپرم‌ها می‌شود (Khaki et al.,).

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، درصد باروری و جوجه‌درآوری به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر مکمل‌سازی پودر زنجبیل در جیره قرار گرفت. درصد باروری و جوجه‌درآوری اسپرم خروس‌های تغذیه شده با سطح ۷/۵ و ۱۵ گرم بر کیلوگرم پودر زنجبیل در جیره به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که باروری و جوجه‌درآوری در گروه‌های تیماری ۷/۵ و ۱۵ گرم پودر زنجبیل در جیره به‌ترتیب ۷/۱۵ و ۱۲/۴۰، و ۷/۳۵ و ۱۲/۴۶ درصد بیش‌تر از باروری و جوجه‌درآوری در گروه شاهد بود. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های ۷/۵ و ۱۵ گرم پودر زنجبیل از نظر درصد باروری و جوجه‌درآوری وجود نداشت ($P < 0.05$).

می‌کنند و سبب بلوغ نهایی و تکامل اسپرم‌ها می‌شوند (Rejraji and Drevet, 2004).

سطح ۱۵ گرم در کیلوگرم پودر زنجبیل در جیره، باعث بهبود عملکرد غشایی اسپرم نسبت به تیمار ۷/۵ گرم در کیلوگرم پودر زنجبیل در جیره و شاهد شد؛ احتمالاً این نتیجه از طریق تأثیر ترکیبات فلاونوئیدی روی گروه‌های قطبی فسفولیپیدهای غشایی سلولی است که مانع از اکسیداسیون و از هم پاشیدگی غشا می‌شوند (Erlejman et al., 2004). زنجبیل از طریق دارا بودن برخی ترکیبات فلاونوئیدی باعث سلامت غشایی اسپرم خروس بومی و کاهش اثرات مضر ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی در غشای پلاسمایی سلول می‌شود و غشای پلاسمایی را محافظت می‌کند.

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف پودر زنجبیل (LSM±SE) بر باروری اسپرم پس از انجماد-یخ‌گشایی در خروس‌های مادرگوشتی مسن (نه پرنده در هر تیمار)

Table 3- Effect of different levels of ginger powder (LSM±SE) on sperm fertility after freezing-thawing in old broilers (9 birds per treatment)

صفات Trait	پودر زنجبیل گرم/کیلوگرم/جیره ginger powder, mg/kg/diet			سطح احتمال معنی‌داری P-value
	سطح صفر پودر زنجبیل GH0	سطح ۷/۵ پودر زنجبیل GH7.5	سطح ۱۵ پودر زنجبیل GH15	
باروری (%) Fertility (%)	31.50 ^b	38.66 ^a	43.91 ^a	0.010
جوجه‌درآوری (%) Hatchability (%)	27.39 ^b	34.66 ^a	39.86 ^a	0.002

a-c: میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

پرنده‌گان جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر زنجبیل شامل: صفر (GH-0)، ۷/۵ (GH-7.5) و ۱۵ (GH-15) گرم در کیلوگرم در جیره دریافت کردند.

a-c: Means with different letters within a row are statistically significant ($p < 0.05$).

The birds received diets containing increasing levels of ginger powder including 0 (C0), 10 (C10), 20 (C20), or 30 (C30) g/kg diet.

و زنده‌مانی اسپرم در لوله‌های ذخیره اسپرم داشته باشد که در نتیجه، باعث بهبود باروری شود (Ali et al., 2017; Ansari et al., 2017). در میان فراسنجه‌های اسپرمی، تحرک اسپرم و زنده‌مانی مهم‌ترین عوامل مؤثر بر انتقال اسپرم به لوله‌های ذخیره اسپرم در نظر گرفته می‌شود (Kazemizadeh et al., 2019)؛ در این پژوهش، جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی در گروه‌های ۷/۵ و ۱۵ گرم در کیلوگرم جیره افزایش یافته بود که می‌تواند دلایلی برای افزایش باروری و جوجه‌درآوری در این گروه‌ها باشد. در پژوهشی، مسعودی و همکاران (Masoudi et al., 2021)، تأثیر خارخاسک، خرنوب و زنجبیل را بر توان تولیدمثلی خروس‌های مادر گوشتی سویه راس مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند، مکمل‌سازی جیره با افزودنی‌های گیاهی موجب بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم و توان باروری خروس‌ها نسبت به گروه کنترل شد. نعمتی و همکاران (Nemati et al., 2022) عنوان کردند که زنجبیل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی که دارد، می‌تواند با ایجاد اختلال در روند تولید رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی

فرآیند انجماد-یخ‌گشایی به‌طور معنی‌داری توانایی باروری اسپرم خروس را کاهش می‌دهد (Ali et al., 2017). از سوی دیگر، برای ایجاد باروری بین تلقیح‌ها، تعداد نسبتاً زیادی اسپرم زنده در لوله‌های ذخیره اسپرم مورد نیاز است (Ali et al., 2017). همچنین، فراسنجه‌های منی مرتبط با باروری، مانند جنبایی کل و پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم ممکن است نفوذ اسپرم به مخاط سرویکس و ادغام با تخمک را تحت تأثیر قرار دهند (Ali et al., 2017; Ansari et al., 2017). با توجه به این که دستگاه تولیدمثلی پرنده ماده، انقباض‌های خاصی برای انتقال اسپرم از واژن به محل لقاح ندارد، از این رو، جنبایی پیش‌رونده اسپرم در ماکیان از اهمیت بیش‌تری نسبت به اسپرم پستانداران برخوردار است (Hammerstedt and Graham, 1992). بنابراین، فراسنجه‌هایی مانند جنبایی و زنده‌مانی برای توانایی باروری اسپرم خروس اهمیت دارند (Ali et al., 2017; Ansari et al., 2017). گزارش کردند که بهبود فراسنجه‌های اسپرمی در خروس‌های مادر گوشتی ممکن است اثرات قابل ملاحظه‌ای بر ذخیره

معنی‌دار جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی و در نهایت، باروری و جوجه‌درآوری اسپرم پس از یخ‌کشایی شد.

استرس اکسیداتیو، سبب بهبود کمی و کیفی شاخص‌های باروری اسپرم و افزایش نطفه‌داری در خروس گردد.

نتیجه‌گیری کلی

در کل، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن ۷/۵ و ۱۵ گرم در کیلوگرم پودر زنجبیل در جیره خروس مادر گوشتی موجب افزایش

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z. A., Zhandi, M., Deldar, H., Rezvani, M. R., Dadpasand, M., Hashemi, S. R., Poureslami, R., & Peebles, E. D. (2014). Improvements in semen quality, sperm fatty acids and reproductive performance in aged Cob 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingib officinale*). *Poultry Science*, 93(5), 1236-1244. (in persian). <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03617>.
2. Ali, E. A., Zhandi, M., Towhidi, A., Zaghari, M., Ansari, M., Najafi, M., & Deldar, H. (2017). Letrozole, an aromatase inhibitor, reduces post-peak age-related regression of rooster reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, 183, 110-117. (in persian) <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.010>.
3. Ansari, M., Zhandi, M., Kohram, H., Zaghari, M., Sadeghi, M., & Sharafi, M. (2017). Improvement of post-thawed sperm quality and fertility of Arian rooster by oral administration of d-aspartic acid. *Theriogenology*, 92, 69-74. (in persian). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.014>.
4. Bhattaria, S., Tran, V. H., & Duke, C. C. (2001). The stability of gingerol and shogaol in aqueous solutions. *Journal of Pharmacological Science*, 90(10), 1658-1664.
5. Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Sirard, M. A. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-86. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3).
6. Blesbois, E., Grasseau, I., & Seigneurin, F. (2005). Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction*, 129 (3), 371-378.
7. Dugasani, S., Pichika, M. R., Nadarajah, V. D., Balijepalli, M. K., Tandra, S., & Korlakunta, J. N. (2010). Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 515-520. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.004>.
8. Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2004). The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radical Research*, 38(12), 1311-1320. <https://doi.org/10.1080/10715760400016105>.
9. Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26-38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-L](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-L).
10. Heidarzadeh, S., Azarbayjani, M. A., Matinhomae, H., & Hedayati, M. (2018). A review of aphroditic plants and physical activity on testosterone concentrations. *Journal of Medicinal Plants*, 17(66), 1-26. (InPersian).
11. Ibtisham, F., Nawab, A., Niu, Y., Wang, Z., Wu, J., Xiao, M., & An, L. (2019). The effect of ginger powder and Chinese herbal medicine on production performance, serum metabolites and antioxidant status of laying hens under heat-stress condition. *Journal of Thermal Biology*, 81, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.02.002>.
12. Kazemizadeh, A., Zare Shahneh, A., Zeinoaldini, S., Yousefi, A. R., Mehrabani Yeganeh, H., Ansari Pirsaraei, Z., & Akhlaghi, A. (2019). Effects of dietary curcumin supplementation on seminal quality indices and fertility rate in broiler breeder roosters. *British Poultry Science*, 60(3), 256-264. (in persian) <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1571165>.
13. Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., & Khaki, A. A. (2009). The effects of Ginger on spermatogenesis and sperm parameters of rat. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 7, 7-12. (in persian) <http://ijrm.ssu.ac.ir/article-1-135-en.html>.
14. Kota, N., Krishna, P., & Polasa, K. (2008). Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. *Food Chemistry*, 106(3), 991-996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.073>.
15. Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 113-141. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00156-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00156-1).
16. Masoudi, R., Javaheri Barfouroushi, H., Hosseini, S. A., Zarei, F., & Abdollahi, Z. (2021). Effect of *Tribulus terrestris*, *Ceratonia siliqua* and *Zingiber officinale* on reproductive potential of Ross broiler breeder roosters. *Veterinary Researches Biological Products*, 34(4), 177-186. 10.22092/VJ.2020.351390.1750. (InPersian).
17. Nemati, Z., Dehgani, P., Karimi, A., Amirdahri, S., & Kianifard, D. (2022). Effects of ginger (*Zingiber officinale*) supplementation on testicular histology, semen characteristic, blood plasma parameters and reproductive

- performance in aged broiler breeder roosters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 107(3), 907-919. (in persian). <https://doi.org/10.1111/jpn.13779>.
18. Pourazad, L., Sharafi, M., Torshizi, M. A. K., Shahverdi, A., & Alizadeh, A. (2022). Modulatory effects of pioglitazone as a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor on semen quality and fertility potential of broiler breeder roosters. *Poultry Science*, 101(5),101795. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101795>.
 19. Rejraji, H., & Drevet, J. R. (2004). Sécrétions apocrines dans le tractus génital mâle: Rôles potentiels dans la maturation des gamètes. *Andrologie*, 14(1),22-33.
 20. Sabzian-Melei, R., Zare-Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefi, A. R., & Rafieian-Naeini, H. R. (2022). Effects of dietary supplementation of different sources and levels of selenium on the semen quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. *Poultry Science*, 101(10),101908. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101908>.
 21. Saeid, J. M., Shanoon, A. K., & Marbut, M. M. (2011). Effects of *Zingiber officinale* aqueous extract on semen characteristic an some blood plasma, semen plasma parameters in the broilers breeder male. *International Journal of Poultry Science*, 10(8),629-633.
 22. Sanocka, D., & Kurpysz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2,1-7.
 23. Shafiq, H., Shakri, M., Zain Al-Dini, S., Kahram, H., Moqbli, V., & Masoumi, R. (2015). Improvement of cock sperm storage using rosemary alcohol essence. *Animal Production*, 18(3),624-615. (InPersian).
 24. Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., Esmaili, V., Sharbatoghli, M., & Mostafayi, F. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83(1),78-85. (in persian) <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.044>.
 25. Zini, A., San Gabriel, M., & Baazeem, A. (2009). Antioxidants and sperm DNA damage: A clinical perspective. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(8),427-432.



Effect of Wet Litter Biochar, Probiotic and Zeolite on Performance, immunity and Small Meat Quality of Broiler Chickens Reared under Cold Stress

Shokoufeh Hasanvand¹ , Ali Khatibjoo^{2*} , Hassan Shirzadi³ , Yahya Mohammadi² , Mohammad-Amir Karimi-Torshizi⁴ , Derakhshandeh Rahimi⁵ 

1- Ph.D Candidate in Poultry Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

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

3- Assistant Prof., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

4- Associate Prof. of Poultry Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

5- Assistant Professor, Animal Science Research Department, Ilam Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ilam, Iran.

*Corresponding Author's Email: a.khatibjoo@ilam.ac.ir

Received: 23-02-2023
Revised: 25-06-2023
Accepted: 10-07-2023
Available Online: 10-07-2023

How to cite this article:

Hasanvand, S., Khatibjoo, A., Shirzadi, H., Mohammadi, Y., Karimi-Torshizi, M. A., & Rahimi, D. (2023). Effect of wet litter biochar, probiotic and zeolite on performance, immunity and small meat quality of broiler chickens reared under cold stress. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 529-546. (in Persian with English abstract)
<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.81245.1130>

Introduction: During the winter months in most parts of Iran, the external temperature often drops below 0 °C. Typically, these temperatures fall below the optimal conditions for chick growth, resulting in cold stress and potential diseases. This can subsequently impact meat quality negatively and reduce breeding efficiency. The environmental temperature beyond the upper and lower limit of the thermoneutral zone is supposed to produce heat or cold stress in animals (Meltzer, 1983). The adverse climatic condition produces physiological stress which has profound economic influence on the productive efficiency including health and disease resistant capacity (Phuong et al., 2016). Exposure of poultry birds to extreme temperature stressor modulates the immune responsiveness and hematic-biochemical parameters of birds (Hangalapura et al., 2004). Among all the environmental stressors, cold stress induces physiological responses which are of high priority and energy demanding for homeotherms. Cold temperature can increase ascites susceptibility by increasing both metabolic oxygen requirements and pulmonary hypertension (Stolz et al., 1992). The biggest obstacle in raising broilers at high altitudes and cold conditions is the ascites syndrome. This condition can be characterized by an accumulation of fluid in the abdominal cavity and elevated mortality that tends to peak between 4-6 weeks of age (James, 2005). The International Biochar Initiative (2017) defines biochar as, "Solid material obtained from thermochemical conversion of biomass in an oxygenlimited environment." Biochar is an ash substance that is produced from the burning of biological material via pyrolysis. This process heats the biological material in an anaerobic environment causing it to decompose into an ash form. Growth promotion and therapeutic antibiotics have been used to compensate for the high levels of stress, including cold stress, that can be present in intensive animal production. Stress can lower resistance to many of the microorganisms present in the environment; however, stress in general has been reported to have variable effects on the immune system and can both enhance and suppress responses (Siegel, 1995); cold stress has been shown to both stimulate and suppress chickens' immune response (Regnier and Kelley, 1981; Hangalapura et al., 2006). Probiotics contain live microorganisms and spores which when administered in adequate amount, confer health benefits to the host.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2023.81245.1130>

Bacillus subtilis (B. Subtilis) and *Bacillus licheniformis* (B. Licheniformis) are the two most widely used strains of probiotic bacteria in animal diets. Oral administration of B. Subtilis and B. Licheniformis can have a myriad of beneficial effects, such as improved growth and meat characteristics, optimized composition of intestinal microbiota, prevention of some diarrheal diseases, and reduced stresses. For such benefits, B. Subtilis and B. Licheniformis have attracted considerable attention as a potentially beneficial dietary supplement for animal health. For the many negative effects of antibiotic drugs used in chick production, we want to compare the positive effects of some additives on performance of cold-stressed broiler chickens.

Materials and Methods: In this experiment, in order to examine the effect of solid waste biochar, probiotic and zeolite on improvement of performance, blood indices and small intestine morphology of broiler chickens reared under cold stress, in a completely randomized design, 315 Ross-308 broiler chickens (as hatched) were allocated to 7 treatments, 5 replicates and 9 birds in each in cold and warm houses. Treatments are including: 1) positive control (basal diet in recommended temperature), 2) negative control (basal diet + cold stress), 3-7) negative control + %0.5, %0.75 and 1% solid waste biochar, 0.02% probiotic Ecobacto-P and 1% zeolite, respectively. In cold stress groups, house temperature decreased to 17° C from 7d until end of the experiment (42d).

Results and Discussion: As compared to group reared in warm house, cold stress significantly decreased broiler chickens daily FI and BWG, serum total protein, albumin and globulin concentrations, thymus relative weight, lymphocyte percentage, breast and thigh meat pH, breast meat redness (b) and thigh meat yellowness (a) while increased total and ascitic mortality, red and white blood cell count, blood hemoglobin, heterophile percentage and heterophil to lymphocyte ratio, antibody titer against SRBC, breast and thigh meat whiteness and breast meat MDA concentration ($P < 0.05$).

Conclusion: In order to orthogonal contrast analysis between negative control group and additive groups, solid waste biochar, probiotic or zeolite couldn't improve broiler chicken's growth performance, breast and thigh meat quality parameters, blood metabolites concentration and cell count and did not ameliorate negative effects of cold stress.

Keywords: Broiler Chicken, Cold Stress, Immune Response, Meat Quality, Performance, Probiotic, Solid Waste Biochar

اثر بیوچار پسماند تر شهری، پروبیوتیک و ژئولیت بر بهبود عملکرد، ایمنی و کیفیت گوشت جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی

شکوفه حسونند^۱، علی خطیب جو^{۲*}، حسن شیرزادی^۳، یحیی محمدی^۲، محمد امیر کریمی ترشیزی^۴، درخشنده رحیمی^۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۹

چکیده

در این آزمایش، به منظور بررسی اثر بیوچار پسماند تر بر بهبود عملکرد و مورفولوژی روده جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی، ۳۵۰ قطعه جوجه گوشتی راس-۳۰۸ (مخلوط دو جنس با نسبت مساوی نر و ماده) در قالب طرح کاملاً تصادفی به هفت تیمار، پنج تکرار و ۱۰ جوجه در هر تکرار اختصاص یافتند. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره شاهد مثبت (دما توصیه شده)، (۲) جیره شاهد منفی (جیره پایه؛ تنش سرمایی)، (۳ تا ۷) به ترتیب جیره شاهد منفی + ۰/۵، ۰/۷۵ و یک درصد بیوچار پسماند تر، ۰/۰۲٪ پروبیوتیک اکوباکتو-پی (Ecobacto-P) و یک درصد ژئولیت بودند. در گروه تنش سرمایی، از ابتدای هفته دوم تا انتهای آزمایش (۴۲ روزگی) دمای سالن به ۱۷ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. نسبت به گروه شاهد پرورش یافته در شرایط دمایی نرمال، تنش سرمایی منجر به کاهش خوراک مصرفی و کاهش افزایش وزن روزانه و افزایش تلفات کل و آسیبی شد. همچنین، سبب کاهش غلظت پروتئین کل، گلوبولین و آلبومین سرم خون و درصد لنفوسیت و افزایش شمار گلبول سفید خون، هموگلوبین، درصد هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت، عبار آنتی‌بادی علیه SRBC شد. تنش سرمایی وزن نسبی تیموس، pH گوشت ران و سینه، قرمزی گوشت سینه و زردی گوشت ران را کاهش و میزان روشنایی گوشت ران و سینه و غلظت مالون‌دی‌آلدهید گوشت سینه را افزایش داد ($P < 0/05$). با توجه به مقایسات گروهی بین گروه شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و گروه‌های دریافت‌کننده افزودنی‌ها، پروبیوتیک، بیوچار و ژئولیت قادر به بهبود عملکرد رشد در کل دوره، کیفیت گوشت سینه و ران، غلظت متابولیت‌ها و شمار سلول‌های خونی نشدند و در شرایط این آزمایش نتوانستند اثرات منفی تنش سرمایی جبران کنند.

واژه‌های کلیدی: بیوچار، پاسخ ایمنی، پروبیوتیک، تنش سرمایی، جوجه گوشتی، عملکرد، کیفیت گوشت

مقدمه

استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد و جایگزین

آنتی‌بیوتیک در جیره جوجه‌های گوشتی مانع از رشد باکتری‌های مضر روده (از جمله *شریشیاکلی*) در دستگاه گوارش شده و سبب بهبود سلامتی میزبان می‌شود (Nawaz et al., 2021). همچنین، افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره منجر به افزایش مقاومت در برابر پاتوژن‌ها، سنتز مواد آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی، تحریک ایمنی موضعی، تعدیل پاسخ التهابی (Montalto et al., 2004)، بهبود عملکرد ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی، کاهش آسیب به مخاط روده کوچک و افزایش جذب مواد مغذی می‌شود (Qi et al., 2018). اتصالات محکم بین سلول‌های انتروسیت ساختارهای کلیدی در نفوذپذیری مخاط روده هستند و تغییر در نفوذپذیری روده به آسیب اتصالات محکم مربوط می‌شود. پروبیوتیک‌ها ارتباط کامل و یکپارچه

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

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

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

۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

۵- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران.

*- نویسنده مسئول: (Email: a.khatibjoo@ilam.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.81245.1130>

بین سلول‌های اپیتلیال روده را در طول عفونت افزایش می‌دهند (Montalto et al., 2004).

زئولیت‌ها، آلومینوسیلیکات‌های کریستالی و هیدراته از کاتیون‌های قلیایی و قلیایی خاکی هستند که ساختار سه‌بعدی نامحدودی دارند. زئولیت‌ها توانایی مبادله انتخابی انواع کاتیون‌ها در ساختار خود بدون تغییر عمده در ساختار خود را دارا هستند و قادرند سمیت ناشی از سموم را کاهش دهند. امروزه به‌منظور پالایش و حذف سموم از اصلاح‌کننده‌های آلی دوست‌دار محیط زیست نیز بهره‌برده می‌شود (Meier et al., 2012; Kim et al., 2015). یکی از این اصلاح‌کننده‌های آلی، بیوپارها هستند که از سوختن منابع آلی در دماهای بین ۴۰۰ تا ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد و در غیاب یا حضور اکسیژن کم، تولید می‌شوند (Lehmann et al., 2011). بیوپار، زغال و زغال فعال ویژگی‌های مشابهی دارند، به طوری که همه آن‌ها از مواد غنی از کربن آلی و در شرایط پیرولیز (حضور بسیار کم اکسیژن) تولید شده‌اند. بیوپار در واقع فرم پیش‌ساز زغال فعال است (Azargohar & Dalai, 2006) که در فرایند سم‌زدایی و خارج کردن سموم از بدن حیوانات و بهبود جمعیت میکروبی دستگاه گوارش کاربرد دارد (Sanchez-Monedero et al., 2018). بیوپار یک ماده متخلخل است که شباهت زیادی به زغال فعال دارد و ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی آن مانند قطر، اندازه، سطح ویژه کل منافذ و مقدار مواد غذایی به شرایط سوختن آن و نوع ماده خام اولیه بستگی دارد و می‌تواند فلزات سنگین را با جذب سطحی روی سطوح خودش غیرفعال سازد (Rajapaksha et al., 2015; Joseph et al., 2010). تنش‌های سرمایی موجب افزایش نیاز به انرژی و متعاقباً افزایش خوراک مصرفی طیور می‌شود (Ferket & Blahova et al., 2007; Gernat, 2006). همچنین در اثر تنش سرمایی، تغییراتی در دستگاه گوارش از قبیل تغییر یا افزایش جمعیت باکتری‌های مضر دستگاه گوارش از جمله /شریشیاکلی/ (Huff et al., 2007; Huff et al., 2015) و شل شدن اتصالات محکم بین سلول‌های انتروسیت و افزایش نفوذپذیری باکتری‌ها به جریان خون به وجود می‌آید که در نتیجه، سبب بروز عفونت و التهاب در بافت‌های بدن می‌شود. (Adjei et al., 1994; Zhou et al., 2021). وقوع همزمان افزایش تولید توکسین باکتریایی و افزایش فاصله بین انتروسیت‌ها می‌تواند منجر به بروز آنتریت و التهاب روده و افزایش تلفات جوجه‌های گوشتی شود. بنابراین، افزودن پروبیوتیک‌ها به‌عنوان تعدیل‌کننده جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور محافظت از جوجه‌های جوان در برابر تنش سرمایی و عفونت‌های باکتریایی عمل کند (Huff et al., 2015). بین جایگزین‌های بی‌خطر آنتی‌بیوتیک‌ها، تاکنون در زمینه تأثیر بیوپار حاصل از پسماند تر بر ممانعت از رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها و جذب توکسین آن‌ها تحقیقی انجام نشده است. تنش سرمایی منجر به تغییر جمعیت

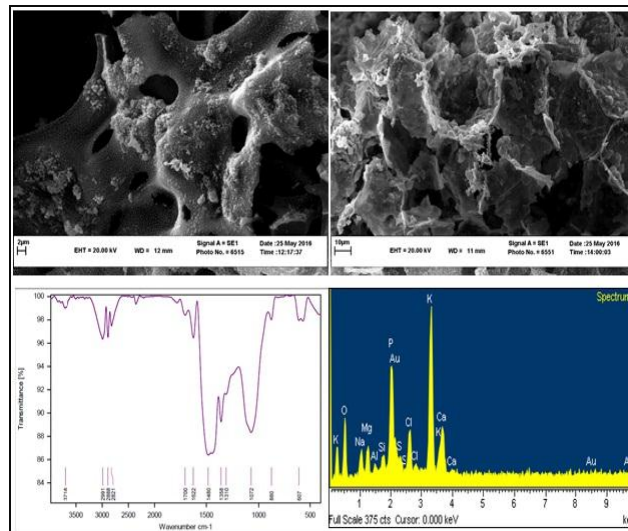
باکتریایی و افزایش نیاز به اکسیژن در دستگاه گوارش می‌شود. در این آزمایش، فرض بر این است که افزودن بیوپار پسماند تر محصولات کشاورزی به جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند با جذب سموم باکتریایی و کاهش اثرگذاری توکسین باکتری‌ها بر دستگاه گوارش سبب کاهش نیاز به اکسیژن و کاهش بروز آسیب و مرگ و میر جوجه‌ها و بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش سرمایی شود. این تحقیق، به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف بیوپار بر بهبود عملکرد و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش سرمایی و مقایسه آن با پروبیوتیک و زئولیت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در زمستان سال ۱۳۹۹ در مرغداری تحقیقاتی دانشگاه ایلام در دو سالن مجزا (سالن سرد و سالن با دمای مطابق توصیه سویه راس-۳۰۸) انجام شد. ابعاد سالن با دمای توصیه شده ۴×۴ متر و ابعاد سالن سرد ۷×۷ مترمربع و فاصله این دو سالن از همدیگر ۱۰۰ متر بود. تعداد ۳۵۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس-۳۰۸ (مخلوط دو جنس) به نسبت مساوی نر و بود. ماده با میانگین وزنی ۳۸/۵ گرم (سن مرغ مادر ۳۹ هفته)، به‌طور تصادفی در ۳۵ پن آزمایشی (دارای ابعاد ۱ در ۱/۱ متر) به هفت تیمار، پنج تکرار و ۱۰ قطعه پرنده در هر تکرار اختصاص داده شدند و تا پایان سن ۴۲ روزگی با سه جیره مختلف مطابق توصیه‌های سویه راس-۳۰۸ تغذیه شدند. در سالن گرم، ۵۰ جوجه در پنج پن آزمایشی با ابعاد ۱ در ۱/۱ متر و در سالن سرد ۳۰ پن آزمایشی با ابعاد ۱ در ۱/۱ متر وجود داشت. دمای سالن مطابق توصیه شده سویه راس-۳۰۸ در هنگام ورود جوجه‌ها به سالن، ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود و در هفته‌های بعد طبق توصیه راهنمای پرورش سویه راس سال ۲۰۱۹ تنظیم شد. دمای سالن سرد در هفته اول ۳۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. به منظور اعمال تنش سرمایی، از ابتدای هفته دوم دمای سالن به یکباره از ۲۹ درجه سانتی‌گراد به ۱۷ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد و تا آخر دوره پرورش (۴۲ روزگی) در همین دما باقی ماند (Varmaghany et al., 2015). میزان روشنایی برای هر دو سالن، در سه روز ابتدایی دوره پرورش ۲۴ ساعت و پس از آن تا انتهای دوره پرورش ۲۳ ساعت بود و میزان رطوبت سالن در محدوده ۵۵-۵۰ درصد حفظ شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱) جیره شاهد مثبت (بدون افزودنی) و پرورش در سالن با دمای توصیه شده سویه راس-۳۰۸، ۲) جیره شاهد منفی (بدون افزودنی) و تحت تنش سرمایی، ۳ تا ۵) به ترتیب جیره شاهد منفی + ۰/۵، ۰/۷۵ و یک درصد بیوپار پسماند تر و ۶ و ۷) به ترتیب جیره شاهد منفی + ۰/۰۲ پروبیوتیک اکوباکتو-پی (Ecobacto-P) یا یک درصد زئولیت. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت-سویا و توسط نرم‌افزار جیره‌نویسی

بقایای میوه‌ها، سبزیجات و پسماند غذایی پس از خشک کردن در دمای اتاق، در آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه ایلام با استفاده از گرماکافت در دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد و در بازه زمانی دو ساعت در شرایط اکسیژن محدود تولید شد و به‌منظور بررسی قابلیت جذب توکسین‌های قارچی، برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن اندازه‌گیری شد.

UFFDA تنظیم شدند. مواد خوراکی تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ آورده شده است. افزودنی‌های خوراکی بعد از آماده‌سازی جیره پایه، به آن اضافه شدند و همه جوجه‌ها در طول آزمایش به جیره و آب دسترسی آزاد داشتند. به‌منظور تهیه بیوجار ابتدا، پسماند شهری از محل جمع‌آوری زباله شهری تهیه و بخش‌های خشک آن جدا شده و بخش تر زباله شامل



شکل ۱- تصویر الکترونی و طیف بیوجار تولیدی از پسماند تر

Figure 1- Electronic image and spectrum of produced solid waste biochar

واکسیناسیون علیه نیوکاسل و آنفلوآنزا در روز ۷ به‌روش تزریق زیرپوستی و در روز ۱۲ علیه نیوکاسل به‌روش خوراکی انجام گرفت. تیتراژ آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوآنزا، ۲۰ روز پس از آخرین واکسیناسیون، با روش هم‌اکلوئیناسیون (HI) اندازه‌گیری شد. برای بررسی پاسخ ایمنی هم‌موال اولیه و ثانویه علیه گلبول قرمز خون گوسفندی (SRBC) در روزهای ۲۸ و ۳۵ دوره پرورش به دو پرنده از هر تکرار میزان ۰/۵ میلی‌لیتر گلبول قرمز خون گوسفندی ۲/۵ درصد در عضله سینه هر پرنده تزریق شد. سپس هفت روز بعد از تزریق دوم، از پرندگان مذکور خون‌گیری به عمل آمده و عیار آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز خون گوسفندی از روش رقیق‌سازی متوالی (سنجش هم‌اکلوئیناسیون) اندازه‌گیری شد (Cheema et al., 2003).

در روز ۴۲ (پایان آزمایش)، به‌طور تصادفی دو پرنده (یک نر و یک ماده) از هر تکرار با شرایط نزدیک به میانگین وزنی گروه، برای کشتار انتخاب شده و چهار ساعت قبل از کشتار به جوجه‌ها گرسنگی داده شد. جوجه‌ها پس از توزین، کشتار شده و وزن نسبی تیموس، طحال و بورس فابریسیوس به‌صورت جداگانه توزین شد. به‌منظور تعیین pH گوشت سینه و ران، بعد از کشتار، یک نمونه ۵۰ گرمی از گوشت سینه و ران جدا گردید و با استفاده از pH متر الکترو سوزنی

وزن بدن، افزایش وزن بدن، خوراک مصرفی، درصد تلفات کل و آسیتی (بر اساس مشاهده آب آوردگی شکم و شاخص وزن بطن راست به کل وزن بطن‌ها) (Varmaghany et al., 2015) و شاخص بازده تولید اروپایی جوجه‌ها در پایان هر دوره (آغازین، رشد و پایانی) اندازه‌گیری شد. ضریب تبدیل خوراک تصحیح شده بر اساس تلفات کل محاسبه گردید و در پایان آزمایش نیز فاکتور تولید بازده اروپایی با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد.

معادله (۱)

$$= \text{شاخص بازده تولید اروپایی} \\ \{ 10 \times (\text{ضریب تبدیل خوراک} \times \text{سن فروش}) \div (\text{وزن زنده} \times \text{درصد ماندگاری}) \}$$

در سن ۴۰ روزگی، دو جوجه نر و ماده از هر تکرار انتخاب و از سیاه‌رگ زیر بال آن‌ها دو نمونه خون گرفته شد. بعد از تهیه نمونه سرم از خون‌های گرفته شده، یک نمونه برای اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های خونی (پروتئین کل، گلوبولین و آلبومین) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمو و نمونه خون دیگر برای شمارش تعداد کل گلبول‌های سفید و قرمز، هتروفیل، لنفوسیت و محاسبه نسبت هتروفیل به لنفوسیت (با استفاده از دستگاه سل‌کاتر) اختصاص داده شد (Nazifi, 1997).

($P > 0.05$). در دوره آغازین و کل دوره بین گروه شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای دارای افزودنی، تفاوت معنی‌داری از لحاظ خوراک مصرفی روزانه وجود نداشت و در دوره رشد، برخلاف انتظار محققین، افزودن ۲۰۰ گرم در تن پروبیوتیک اکوباکتو- پی نسبت به گروه دریافت‌کننده جیره حاوی یک درصد بیوچار و گروه شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی سبب کاهش خوراک مصرفی روزانه جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$).

نتایج جدول ۲ نشان داد که اعمال تنش سرمایی سبب کاهش معنی‌دار افزایش وزن بدن روزانه جوجه‌های گوشتی در دوره‌های آغازین، رشد و پایانی پرورش و همچنین کاهش میزان افزایش وزن بدن روزانه جوجه‌های گوشتی در طی دوره رشد شد ($P < 0.05$), اما بر افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی در دوره پایانی تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای دارای افزودنی، در دوره آغازین تفاوت معنی‌داری از لحاظ افزایش وزن بدن روزانه وجود داشت، به طوری که افزودن ۱ و ۰/۵ درصد بیوچار سبب افزایش وزن روزانه جوجه‌های گوشتی نسبت به گروه شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی شد ($P < 0.05$). ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های آغازین، پایانی و کل دوره تحت تأثیر تنش سرمایی یا افزودنی‌های جیره قرار نگرفت ($P < 0.05$), در حالی که در دوره رشد افزودن ۲۰۰ گرم در تن پروبیوتیک اکوباکتو- پی به جیره سبب کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$). اعمال تنش سرمایی سبب افزایش معنی‌دار تلفات کل و آسیتی جوجه‌های گوشتی شد، در حالی که با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، افزودنی‌های مورد آزمایش قادر به کاهش تلفات آسیتی شدند، به طوری که جوجه‌های دریافت‌کننده ۰/۵ درصد بیوچار و پروبیوتیک کمترین تلفات آسیتی را در شرایط سرمایی داشتند ($P < 0.05$), اما افزودنی‌ها کل تلفات جوجه‌های گوشتی را کاهش ندادند ($P > 0.05$). با توجه به عدم تأثیرگذاری تیمارهای آزمایشی بر ضریب تبدیل خوراک، میزان تلفات هر تیمار تأثیر خود را در شاخص کارائی تولید اروپایی نشان داد، به طوری که اعمال تنش سرمایی سبب کاهش معنی‌دار این شاخص شد و بین افزودنی‌ها نیز تفاوت معنی‌داری از لحاظ شاخص کارائی تولید اروپایی جوجه‌های گوشتی وجود نداشت ($P > 0.05$).

(مدل 330i/SET WTW) میزان pH عضله تعیین شد و رنگ نمونه‌های گوشت در ۲۴ ساعت پس از کشتار با استفاده از رنگ‌سنج الکتریکی^۱ در چهار نقطه متفاوت از هر نمونه تعیین شد. این روش بر اساس سیستم سنجش رنگ RGB بود و با استفاده از فرمول، داده‌ها به فرمت Lab تبدیل شدند که دارای سه درجه روشنی (L)، قرمزی (a) و زردی (b) بود (Traffano-Schiffo et al., 2021). درصد ماده خشک، اتلاف آب گوشت سینه در اثر فشار و همچنین بعد از پخت، ۲۴ ساعت بعد از کشتار اندازه‌گیری شد (Zhuang et al., 2020). چربی و پروتئین گوشت سینه و ران (Biesek et al., 2020)، کلسترول (Salma et al., 2007) و غلظت مالون‌دآلدهید گوشت سینه (Placer et al., 1966) (نیز اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل از آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی و بر اساس مدل آماری زیر توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) سال ۲۰۰۴ و رویه GLM (تعداد متفاوت جوجه در هر تکرار به دلیل بروز تلفات) تجزیه و تحلیل و آنالیز شدند و میانگین تیمارها در سطح معنی‌داری پنج درصد و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم مقایسه شدند (SAS, 2004).

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (2)$$

که در آن، Y_{ij} : مشاهدات؛ μ : میانگین مشاهدات؛ T_i : اثر تیمار i و e_{ij} : اثر خطای تصادفی مربوط به هر مشاهده است.

نتایج و بحث

عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که توکسین‌بایندر بیوچار ماده‌ای متخلخل، ناهمگن و عمدتاً دارای کربن و مقداری فلزات قلیایی است و با توجه به گروه‌های عاملی سطحی و پیک‌های ارائه شده توسط دستگاه Spectra FTIR مشخص شد که پیک ۳۸۱۴ نشان‌دهنده گروه‌های هیدروکسیل و پیک‌های ۳۰۰۰، ۲۹۰۰ و ۲۸۳۲ نشان‌دهنده گروه‌های CH_2^- و CH_3^- که مربوط به ترکیبات بلند زنجیر آلیفاتیک و پیک‌های ۱۷۰۰ و ۱۶۲۲ مربوط به پیوندهای $\text{C}=\text{O}$ در حلقه‌های آروماتیک، و پیک ۱۰۷۲ مربوط به گروه هیدروکسیل هستند، زیرا ترکیب بیوچار دارای دو پیک هیدروکسیلی است. با توجه به تهیه بیوچار در دمای ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد، هیچگونه آلودگی میکروبی در بیوچار مشاهده نشد.

تأثیر جیره‌های آزمایشی بر خوراک مصرفی روزانه، افزایش وزن بدن روزانه، ضریب تبدیل خوراک و شاخص بازده تولید در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس داده‌های جدول، اعمال تنش سرمایی سبب کاهش معنی‌دار خوراک مصرفی روزانه در دوره آغازین، رشد و کل دوره پرورش شد ($P < 0.05$), اما بر میانگین خوراک مصرفی روزانه جوجه‌های گوشتی در دوره پایانی تأثیر معنی‌داری نداشت

جدول ۱- مواد خوراکی تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه (درصد)

Table 1- Ingredients and chemical composition of basal diet (%)

ماده خوراکی Ingredients	آغازین (۱-۱۰ روزگی) Starter (1- 10 days)	رشد (۱۱-۲۴ روزگی) Grower (11- 24 days)	پایانی (۲۵-۴۲ روزگی) Finisher (25- 42 days)
ذرت Corn	53.1	60.6	66.7
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین) Soybean meal (%44 CP)	35.0	29.8	28.1
روغن آفتابگردان Sunflower oil	1.0	1.0	1.6
گلوتن ذرت (۶۰ درصد پروتئین) Corn gluten (%60) CP	6.5	4.6	0
دی کلسیم فسفات DiCalcium phosphate	1.52	1.45	1.2
کربنات کلسیم Calcium carbonate	1.32	1.14	1.1
دی-ال-متیونین DL- methionine	0.24	0.2	0.19
ال-لیزین هیدروکلرید L- lysine HCl	0.28	0.26	0.16
ال-ترونین L- threonine	0.05	0.042	0.004
نمک Salt	0.24	0.25	0.28
جوش شیرین NaHCO ₃	0.2	0.2	0.15
مکمل ویتامینه ^۱ Vitamin premix	0.25	0.25	0.25
مکمل معدنی ^۲ Mineral premix	0.25	0.25	0.25
ترکیب مواد مغذی محاسبه شده (درصد) Calculated nutrient composition (%)			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم) Metabolizable energy (kcal/kg)	3000.00	3030.00	3030.00
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	23.50	20.90	19.00
لیزین قابل هضم (درصد) ^۳ Digestible lysine (%)	1.25	1.10	0.98
متیونین قابل هضم (درصد) Digestible methionine (%)	0.60	0.52	0.44
سیستین قابل هضم (درصد) Digestible cysteine (%)	0.30	0.28	0.27
متیونین + سیستین قابل هضم (درصد) Digestible methionine + cystine (%)	0.90	0.80	0.71

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامینی حاوی: ۳۶۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۸۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۷/۲ گرم ویتامین E، ۰/۸ گرم ویتامین K، ۰/۷ گرم B₁، ۲/۶۴ گرم B₂، ۱۱/۸۸ گرم B₃، ۳/۹۲ گرم کلسیم پنتونات، ۱/۱۷۶ گرم B₆، ۰/۴ گرم B₉، شش میلی‌گرم B₁₂ و ۴۰ میلی‌گرم H₂.

^۲ هر کیلوگرم مکمل مواد معدنی حاوی: ۱۰۰ گرم کولین کلراید، ۳۹/۶۸ گرم منگنز (اکسید)، ۳۳/۸۸ گرم روی، ۲۰ گرم آهن، چهار گرم مس، ۰/۳۹۶ گرم ید و ۰/۰۸ گرم سلنیوم.
^۳ اسید آمینه قابل هضم استاندارد شده ایلنومی = SID.

^۱ Every kilogram vitamin supplement containing: vitamin A, 3600000 Iu; vitamin D₃, 800000 Iu; vitamin K, 0.8 g; vitamin B₁, 0.7 g; vitamin B₂, 2.64 g; D- calcium pantothenate, 3.92 g; vitamin B₆, 1.176 g; vitamin B₉, 0.4 g; vitamin B₁₂, 6 mg; H₂, 40 mg

^۲ Every kilogram mineral supplement containing: choline chloride, 100g; manganese (Oxide), 39.68 g; Zinc, 33.88 g; iron, 20 g; copper, 4 g; iodine, 0.396 g and selenium, 0.08 g

^۳ standardized ileal digestible amino acid = SID.

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر خوراک مصرفی، افزایش وزن بدن روزانه و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی

Table 2- Effect of experimental treatments on daily feed intake and body weight gain and feed conversion ratio of broiler chickens

	تیمارهای آزمایشی ^۱							SEM	P-value ^۳	
	Experimental treatments ^۱								1	2
	1	2	3	4	5	6	7			
خوراک مصرفی (گرم/روز)										
Feed intake (g/d)										
آغازین	39.4 ^a	17.5 ^b	20.4 ^b	20.8 ^b	20.7 ^b	19.2 ^b	20.3 ^b	1.51	0.0001	0.13
Starter										
رشد	82.3 ^a	71.6 ^b	70.1 ^b	69.6 ^{bc}	69.6 ^{bc}	59.9 ^c	63.3 ^{bc}	3.07	0.001	0.17
Grower										
پایانی	165.0	159.0	160.0	160.0	149.0	156.0	165.0	5.44	0.423	0.89
Finisher										
کل دوره	108.0 ^a	96.2 ^b	96.9 ^b	97.0 ^b	91.6 ^b	91.6 ^b	96.6 ^b	3.31	0.040	0.71
Total										
وزن بدن (گرم/روز)										
Weight gain (g/d)										
آغازین	28.5 ^a	13.1 ^c	15.3 ^b	14.7 ^{bc}	15.2 ^b	14.2 ^{bc}	14.1 ^{bc}	0.62	0.0001	0.04
Starter										
رشد	52.1 ^a	45.4 ^{ab}	42.1 ^b	45.4 ^{ab}	45.4 ^{ab}	42.9 ^b	38.9 ^b	2.14	0.009	0.63
Grower										
پایانی	84.8	87.1	79.1	80.7	77.7	78.9	84.6	2.39	0.209	0.47
Finisher										
کل دوره	60.5 ^a	51.7 ^b	51.6 ^b	53.2 ^b	52.0 ^b	51.5 ^b	52.6 ^b	1.33	0.001	0.78
Total period										
ضریب تبدیل خوراک										
Feed conversion ration										
آغازین	1.38	1.33	1.32	1.42	1.35	1.36	1.44	0.07	0.88	0.59
Starter										
رشد	1.58 ^{ab}	1.58 ^{ab}	1.67 ^a	1.54 ^{ab}	1.51 ^{ab}	1.39 ^c	1.63 ^{ab}	0.04	0.007	0.57
Grower										
پایانی	1.94	2.03	2.02	1.99	1.92	1.98	1.95	0.07	0.885	0.45
Finisher										
کل	1.78	1.86	1.88	1.82	1.76	1.78	1.84	0.05	0.585	0.51
Total										
تلفات کل (درصد)	1.9 ^c	22.0 ^a	11.0 ^b	14.7 ^{ab}	17.6 ^{ab}	11.4 ^b	24.2 ^a	3.92	0.01	0.19
Total mortality (%)										
تلفات آسیتی (درصد)	0.26 ^c	8.39 ^a	3.18 ^b	5.09 ^b	5.72 ^{ab}	3.61 ^b	6.59 ^{ab}	1.31	0.007	0.03
Ascite mortality (%)										
شاخص کارائی تولید اروپایی	315 ^a	193 ^b	201 ^b	227 ^b	229 ^b	230 ^b	194 ^b	12	0.0001	0.11
European production efficiency factor										

^۱ ۱- جیره پایه (شاهد مثبت- پرورش در دمای توصیه شده سویه راس)، ۲- جیره پایه (شاهد منفی- پرورش در شرایط تنش سرمایی)، ۳- شاهد منفی + ۰/۵ درصد بیوجار، ۴- شاهد منفی + ۰/۷۵ درصد بیوجار، ۵- شاهد منفی + ۱ درصد بیوجار، ۶- شاهد منفی + پروبیوتیک (۲۰۰ گرم در تن)، ۷- شاهد منفی + زئولیت (یک کیلوگرم در تن) آغازین (۱- ۱۰ روزگی)، رشد (۱۱-۲۵ روزگی)، پایانی (۲۶-۴۲ روزگی) و کل دوره (۱-۴۲ روزگی)

^۲ ۱- P-value مقایسات میانگین کل تیمارها و ۲- P-value مقایسه گروهی بین تیمار ۲ با تیمارهای ۳-۷.

^۱ 1- Basal ration (positive control- rearing in recommended temperature of Ross strain), 2) negative control (fed basal diet and rearing in cold stress), 3) negative control + %0.5 solid waste biochar, 4) negative control + %0.75 solid waste biochar, 5) negative control + 1% solid waste biochar, 6) negative control + probiotic Ecobacto-P (200 g/ton), 7) negative control + 1 kg /ton zeolite

^۲ Starter (1- 10 days), Grower (11- 25 days), Finisher (26- 42 days) and Total Period (1- 42 days).

^۳ 1- P-value of total analysis and 2- P-value of contrast analysis between treatment 2 and treatments 3-7.

۰/۳۳ درصد ماده خشک جیره) خوراک موجب افزایش وزن، مصرف خوراک و بهبود مصرف مواد مغذی در گاوهای زرد محلی شده است (Winders et al., 2018; Saroeun et al., 2018). در مطالعه دیگری ایوانز و همکاران (Evans et al., 2017) نشان دادند که افزودن بیوجار فضولات طیور (PLB)^۱ به جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش مصرف خوراک، کاهش افزایش وزن بدن و افزایش ضریب تبدیل خوراک شد و علت آن را میزان بالای آرسنیک در بیوجار فضولات مرغ ذکر کردند. بیوجار مورد استفاده در این آزمایش چرون و همکاران (Cheron, 2017) در سال ۲۰۱۷، حاوی ۹۹ ppm آرسنیک بود، ولی سایر اشکال بیوجار (مانند بیوجار نیشکر)، سطح قابل توجهی آرسنیک ندارند و ممکن است نسبت به بیوجار حاصل از فضولات طیور به میزان کمتری برای عملکرد پرند مضر باشند. در مقابل، تغذیه جوجه‌های گوشتی یک روزه با جیره حاوی دو درصد بیوجار کود مرغی، اثر نامطلوبی بر عملکرد رشد جوجه‌ها نداشت و منجر به افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک مشابه در مقایسه با خوراک شاهد شد.

موافق با نتایج آزمایش حاضر، محققین با افزودن یک درصد بیوجار کود مرغی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی راس-۳۰۸ گزارش کردند که عملکرد جوجه‌های گوشتی (خوراک مصرفی، وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک) تحت تأثیر مکمل بیوجار قرار نگرفت (Rashidi et al., 2020). به نظر می‌رسد که توکسین‌بایندر بیوجار به دلیل ویژگی‌های ساختمانی و ساختار جذبی که دارد می‌تواند با سموم باکتریایی و قارچی باند شده و مانع از جذب این سموم توسط دستگاه گوارش و جلوگیری از اثرات مخرب اندوتوکسین‌ها بر بدن شود و اثرات مثبتی بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و زنده‌مانی پرند ها دارد (Gerlach & Schmidt, 2012). موافق با نتایج آزمایش حاضر، در گزارشی در سال ۲۰۱۴، تغییر معنی‌داری در وزن بدن، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با بیوجار مشاهده نشد (ARDCorp, 2014). کاهش عملکرد رشد طیور دریافت‌کننده بیوجار می‌تواند به دلیل باند شدن بیوجار با مواد مغذی موجود در دستگاه گوارش باشد، زیرا توانایی بیوجار برای اتصال به آب ممکن است هر گونه اثرات منفی هضم مواد مغذی را تشدید کند. اگر میزان آب موجود در محتویات روده زیاد باشد، در هنگام عبور محتویات از روده کوچک ممکن است به دلیل رقیق شدن و پایین آمدن سطح تماس بین اپیتلیوم روده کوچک و محتویات گوارشی آن، از جذب مواد مغذی جلوگیری شود. به‌طور دقیق مشخص نیست که چرا پرندگان با تغذیه جیره حاوی بیوجار بالاتر نسبت به پرندگانی که از جیره شاهد یا جیره حاوی میزان کمتری

موافق با نتایج آزمایش حاضر، نشان داده شده است که تنش سرمایی حاد، منجر به سرکوب رشد و عملکرد تولید طیور می‌شود (Sahin et al., 2003). قرار دادن جوجه‌ها در معرض تنش سرمایی در طی دوره‌های مختلف قبل از مصونیت‌سازی منجر به کاهش وزن بدن (به‌صورت عددی) شد و افزایش وزن بدن پرندگان با طول مدت تنش سرمایی رابطه معکوس داشت (Hangalapura, 2006). درحالی‌که محققین با بررسی تأثیر اعمال دوره‌ای تنش سرمایی به جوجه‌های گوشتی (روز سوم و چهارم به مدت ۳-۴ ساعت در دمای دو تا هشت درجه سانتی‌گراد و از هفته سوم تا هفته ششم در دمای ۲۵ درجه یا ۲-۸ درجه سانتی‌گراد) گزارش کردند که تنش سرمایی موجب افزایش خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی شد، درحالی‌که وزن بدن و افزایش وزن بدن تحت تأثیر تیمارهای دمایی مختلف قرار نگرفت و تلفات کل و آسیتی جوجه‌های تحت تنش سرمایی بالاتر از گروه شاهد بود (Qureshi et al., 2018). گزارش شده است که با کاهش دما و اعمال تنش سرمایی مقادیر زیادی از انرژی دریافتی جوجه در روده کوچک صرف می‌شود که در این رابطه، محققین گزارش کردند که در سلول‌های انتروسیت در اثر تنش سرمایی کوتاه مدت (۷۲ ساعته) بیان ژن پروتئین‌کیناز فعال شده توسط آدنوزین مونوفسفات (AMPK) افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش مصرف انرژی در انتروسیت‌ها است (Zhou et al., 2021) و این مسئله می‌تواند افزایش ضریب تبدیل خوراک و کاهش عملکرد جوجه‌های گوشتی پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی را توضیح دهد. در آزمایش حاضر، احتمالاً به دلیل اعمال تنش سرمایی از ابتدای هفته دوم و همچنین کاهش شدید دما، جوجه‌های گوشتی به‌خصوص در هفته دوم قادر به حفظ دمای بدن با افزایش خوراک مصرفی نبودند و به‌منظور حفظ بقای خود بیشتر در کنار هم قرار گرفته و از خوردن خوراک امتناع کردند که می‌تواند دلیل احتمالی کاهش خوراک مصرفی باشد.

برخلاف نتایج پژوهش حاضر، محققین گزارش کردند که جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی چهار تا شش درصد بیوجار چوب ذرت نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با دو درصد بیوجار و جیره شاهد از نظر وزن نهایی سنگین‌تر بودند و ضریب تبدیل خوراک از ۳/۰۲ (گروه شاهد) به ۱/۸۹ (گروه شش درصد بیوجار) بهبود یافت (Dim et al., 2018). در مطالعه‌ای، پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ درصد بیوجار، افزایش وزن روزانه بالاتری در مقایسه با پرندگان تغذیه شده با جیره‌ی حاوی دو یا چهار درصد بیوجار داشتند (Cheron, 2017). همچنین، مکمل بیوجار موجب بهبود عملکرد رشد در نشخوارکنندگان (Man et al., 2021) و رشد و بقای ماهی‌ها نیز شده است (Mabe et al., 2018)، به‌طوری‌که افزودن بیوجار به مقدار دو تا هشت درصد (بیوجار دریافت شده ۰/۰۵ تا

ها، مکمل کردن سطوح مختلف بیوجار، پروبیوتیک اکوباکتو-پی یا ژئولیت بر غلظت سرمی گلوبولین و آلبومین جوجه‌های پرورش یافته تحت تنش سرمایی تأثیر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$).

در رابطه با تأثیر بیوجار بر متابولیت‌های خونی جوجه‌های گوشتی پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی اطلاعات زیادی در دسترس نیست و بیشتر تحقیقات انجام شده در شرایط تنش آلودگی با آفلاتوکسین بوده است. محققین دیگری با افزودن پروبیوتیک *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) و *باسیلوس لشنیفرمیس* (*B. licheniformis*) غنی شده با سلنیوم (۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول در ۱۰۰ کیلوگرم خوراک) (Se-enriched *Bacillus*: SECB) به جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی از ۵ تا ۸ هفته با دمای ۵/۵ تا ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، سوپراکسید کل توانایی دیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز در ماهیچه سینه افزایش و غلظت مالون‌دی‌آلدئید پلاسما به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. افزودن پروبیوتیک مذکور منجر به کاهش غلظت کلسترول کل پلاسما و غلظت تری‌گلیسیرید و LDL-کلسترول پلاسما و عضله سینه و افزایش HDL-کلسترول پلاسما در مقایسه با گروه شاهد شد (Yang et al., 2019). در رابطه با تأثیر ژئولیت بر متابولیت‌های خونی، صفایی کنولی و همکاران (Safaikatouli et al., 2010) نشان دادند که در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۳۰ گرم در کیلوگرم ژئولیت، مقدار پروتئین سرم خون افزایش و میزان کلسترول کل، HDL، LDL و VLDL کلسترول تحت تأثیر قرار نگرفت، اما میزان گلوکز سرم کاهش نشان داد و افزودن پنج گرم در کیلوگرم ژئولیت به جیره جوجه‌های گوشتی تأثیری بر غلظت گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید نداشت (Prvulovic et al., 2008).

تأثیر جیره‌های آزمایشی بر شمار سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج جدول نشان داد که در مقایسه با گروه پرورش یافته در دمای توصیه شده سویه راس، اعمال تنش سرمایی سبب افزایش شمار گلبول قرمز و سفید خون، میزان هموگلوبین، درصد هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت و کاهش درصد لنفوسیت شد ($P < 0.05$). در گروه تحت تنش سرمایی، افزودن یک درصد بیوجار و پروبیوتیک منجر به کاهش شمار گلبول سفید خون و غلظت هموگلوبین خون تا حد گروه شاهد پرورش یافته در دمای توصیه شده سویه شد ($P < 0.05$)، اما با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، افزودنی‌ها بر شمار گلبول قرمز خون، درصد لنفوسیت و هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت تأثیر معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$) و قادر به بهبود شمار سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی نبودند.

بیوجار استفاده می‌کنند، عملکرد خوبی ندارند (Cheron, 2017). برخلاف نتایج آزمایش حاضر، خوراک مصرفی و افزایش وزن کل دوره جوجه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک بیومین و پرورش یافته تحت تنش سرمایی نسبت به گروه شاهد کاهش داشت، درحالی‌که افزودن پروبیوتیک پروتکسین موجب افزایش وزن بدن و خوراک مصرفی جوجه‌های پرورش یافته تحت تنش سرمایی نسبت به گروه شاهد شد، اما ضریب تبدیل خوراک تحت تأثیر مکمل پروبیوتیک پروتکسین یا بیومین-ایمو قرار نگرفت (Ranjbar et al., 2013). همچنین در سال ۲۰۱۵، محققین گزارش کردند که افزودن پروبیوتیک تجاری PoultryStar® در شرایط تنش سرمایی منجر به بهبود وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل خوراک مصرفی شد، درحالی‌که بر میزان مرگ و میر جوجه‌های گوشتی تأثیر معنی‌داری نداشت (Huff et al., 2015). محققین دیگری با افزودن پروبیوتیک *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) و *باسیلوس لشنیفرمیس* (*B. licheniformis*) غنی شده با سلنیوم (۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول در ۱۰۰ کیلوگرم خوراک) (Se-enriched *Bacillus*: SECB) به جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی از هفته ۵ تا ۸ با دمای ۵/۵ تا ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که جوجه‌های تغذیه شده با SECB یا ترکیب *باسیلوس* وزن بدن بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند و جوجه‌های دریافت‌کننده SECB یا پروبیوتیک *باسیلوس* وزن بدن بالاتری نسبت به جوجه‌های شاهد یا جوجه‌های دریافت‌کننده سلنیوم غیر آلی داشتند (Yang et al., 2019). در شرایط تنش سرمایی، مواد ضد میکروبی تولید شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* مانند ایتورین و سورفاکتین و آنزیم پروتاز، لپاز و آمیلاز تولید شده توسط *باسیلوس لشنیفرمیس* نقش مهمی در حفظ سلامت بدن و تجزیه خوراک برای جذب مواد مغذی دارند (Ohno et al., 1995).

در آزمایش حاضر (تنش سرمایی)، افزودن ژئولیت منجر به بهبود عملکرد و جبران کاهش رشد ناشی از تنش سرمایی در جوجه‌های گوشتی نشد و موافق با نتایج آزمایش حاضر، در زمینه تأثیر ژئولیت بر عملکرد و بروز آسیب در جوجه‌های گوشتی آربین محققین با افزودن ۱/۱۱۵ کیلوگرم ژئولیت (سولفات آلومینیوم) در ترکیب با آهک یا اسید سیتریک به هر مترمربع از بستر گزارش کردند که عملکرد جوجه‌های گوشتی (افزایش وزن، مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی)، درصد تلفات و درصد بروز آسیب تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (Farhadi et al., 2013).

تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های سرم خون جوجه‌های گوشتی در جدول ۳ نشان داده شده است. اعمال تنش سرمایی سبب کاهش معنی‌دار پروتئین کل، گلوبولین و آلبومین سرم خون جوجه‌های گوشتی شد ($P < 0.05$)، اما با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های سرم خون (گرم بر دسی‌لیتر) و جمعیت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی

Table 3- Effect of experimental treatments on blood serum indices (g/dl) and blood cell count of broiler chickens

فراسنجه Parameter	تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental treatments ¹							SEM	P-value ²	
	1	2	3	4	5	6	7		1	2
پروتئین کل (g/dl) Total protein (g/dl)	6.22 ^a	3.19 ^b	3.08 ^{bc}	2.49 ^c	2.79 ^{bc}	2.86 ^{bc}	2.75 ^{bc}	0.19	0.001	0.08
آلبومین (g/dl) Albumin	1.56 ^b	2.45 ^a	2.31 ^a	2.16 ^a	2.31 ^a	2.40 ^a	2.54 ^a	0.15	0.024	0.57
گلوبولین (g/dl) Globulin (g/dl)	4.66 ^a	0.75 ^b	0.77 ^b	0.33 ^b	0.48 ^b	0.46 ^b	0.30 ^b	0.19	0.003	0.13
گلبول قرمز (× ۱۰ ^{۱۲}) Red blood cell	2.30 ^b	3.40 ^a	3.44 ^a	3.40 ^a	3.48 ^a	3.60 ^a	4.01 ^a	0.16	0.03	0.63
گلبول سفید (× ۱۰ ^۶) White blood cell	3.38 ^b	3.62 ^a	3.66 ^a	3.56 ^a	3.41 ^b	3.89 ^b	4.03 ^{ab}	0.06	0.02	0.31
هموگلوبین (g/dl) Hemoglobin (g/dl)	8.0 ^c	11.0 ^{ab}	12.8 ^a	12.1 ^a	10.1 ^a	9.0 ^{bc}	10.3 ^{abc}	0.80	0.007	0.89
لنفوسیت (درصد) Lymphocyte (%)	74.8 ^a	55.8 ^b	55.2 ^b	54.2 ^b	52.0 ^b	54.8 ^b	55.6 ^b	1.96	0.001	0.56
هتروفیل (درصد) Heterophil (%)	24.8 ^b	42.3 ^a	42.8 ^a	44.6 ^a	46/0 ^a	43.4 ^a	42.4 ^a	1.79	0.001	0.47
نسبت هتروفیل به لنفوسیت Heterophile to lymphocyte ration	0.33 ^b	0.76 ^a	0.79 ^a	0.83 ^a	0.89 ^a	0.81 ^a	0.77 ^a	0.059	0.001	0.41

^۱ ۱- جیره پایه (شاهد مثبت- پرورش در دمای توصیه شده سویه راس)، ۲- جیره پایه (شاهد منفی- پرورش در شرایط تنش سرمایی)، ۳- شاهد منفی + ۰/۵ درصد بیوجار، ۴- شاهد منفی + ۰/۷۵ درصد بیوجار، ۵- شاهد منفی + ۱ درصد بیوجار، ۶- شاهد منفی + پروبیوتیک (۲۰۰ گرم در تن)، ۷- شاهد منفی + زئولیت (یک کیلوگرم در تن).
^۲ ۱- P-value مقایسات میانگین کل تیمارها و ۲- P-value مقایسه گروهی بین تیمار ۲ با تیمارهای ۳-۷.

¹ 1- Basal ration (positive control- rearing in recommended temperature of Ross strain), 2) negative control (fed basal diet and rearing in cold stress), 3) negative control + %0.5 solid waste biochar, 4) negative control + %0.75 solid waste biochar, 5) negative control + 1% solid waste biochar, 6) negative control + probiotic Ecobacto-P (200 g/ton), 7) negative control + 1 kg /ton zeolite.

² 1- P-value of total analysis and 2- P-value of contrast analysis between treatment 2 and treatments 3-7.

سرمایی شوند (Ranjbar et al., 2013).

اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی اندام‌های لنفاوی جوجه‌های گوشتی در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طوری که ملاحظه می‌شود، در مقایسه با گروه پرورش یافته در دمای توصیه شده سویه راس، اعمال تنش سرمایی سبب کاهش وزن نسبی غده تیموس شد و وزن نسبی طحال و بورس فابریسیوس تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، همه افزودنی‌های مورد آزمایش باعث کاهش وزن نسبی تیموس جوجه‌های گوشتی در مقایسه با تیمار تنش سرمایی شدند. موافق با نتایج آزمایش حاضر و انجام تحقیق در شرایط دمایی توصیه شده، گزارش شده است که استفاده از پنج گرم در کیلوگرم زئولیت به جیره جوجه‌های گوشتی، وزن نسبی پانکراس و بورس فابریسیوس را تحت تأثیر قرار نداد (Prvulovic et al., 2008) و در مقابل، در تحقیق دیگری در همین راستا در جوجه‌های گوشتی جنس نر، نشان داده شد که کلینوپتیلیت‌ها موجب کاهش وزن نسبی طحال شد (Lotfollahian et al., 2004).

نسبت هتروفیل به لنفوسیت به‌عنوان شاخص تنش در حیوانات مختلف از جمله جوجه‌های گوشتی است و در توافق با نتایج آزمایش حاضر، گزارش شده است که تنش سرمایی، منجر به کاهش تعداد لنفوسیت‌های خون جوجه‌های گوشتی شد که متعاقباً منجر به افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت شده است (Olfati et al., 2018) و گزارش شده است که بیوجار موجب بهبود پروفایل خون در حیوانات نشخوارکننده می‌شود (Man et al., 2021). موافق نتایج آزمایش حاضر، محققین با افزودن دو نوع پروبیوتیک (پروتکسین و بیومین-ایمبو) به جیره جوجه‌های گوشتی راس-۳۰۸ پرورش یافته در شرایط عادی و تحت تنش سرمایی از سن سه تا شش هفتگی گزارش کردند که تنش سرمایی منجر به کاهش لنفوسیت و افزایش هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت شد و افزودن هر دو پروبیوتیک پروتکسین و بیومین-ایمبو منجر به افزایش لنفوسیت و کاهش هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت شدند، به‌طوری‌که با شاهد پرورش یافته در دمای توصیه شده قابل رقابت بودند، اما نتوانستند موجب کاهش تعداد کل گلبول‌های سفید خون جوجه‌های تحت تنش

اثر تیمارهای مختلف آزمایشی بر پاسخ ایمنی همورال جوجه‌های گوشتی علیه گلبول قرمز خون گوسفند در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن نسبی (نسبت به وزن زنده) اندام‌های لنفاوی و عبار آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز خون گوسفند (Log2) در جوجه‌های گوشتی
Table 4- The effect of experimental treatments on relative weight of lymphoid organ (ratio as BW) and antibody levels against sheep red blood cells (Log2) in broiler chickens

فراسنجه Parameter	تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental treatments ¹							SEM	P-value ²	
	1	2	3	4	5	6	7		1	2
وزن نسبی اندام لنفاوی Relative weight of lymphoid organs										
طحال Spleen	0.128	0.128	0.118	0.125	0.135	0.118	0.098	0.028	0.978	0.78
بوس Bursa	0.190	0.218	0.185	0.325	0.168	0.183	0.175	0.056	0.481	0.87
تیموس Thymus	0.54 ^a	0.23 ^b	0.15 ^c	0.12 ^c	0.15 ^c	0.11 ^c	0.08 ^c	0.027	0.0001	0.001
ایمنی اولیه Primary immunity										
ایمنوگلوبولین-G Ig- G	1.88 ^b	2.38 ^{ab}	2.80 ^a	2.30 ^{ab}	2.70 ^a	2.40 ^{ab}	1.90 ^b	0.19	0.009	0.84
ایمنوگلوبولین-M Ig- M	1.13 ^b	2.00 ^a	2.00 ^a	2.10 ^a	2.10 ^a	1.60 ^{ab}	2.00 ^a	0.20	0.017	0.86
ایمنوگلوبولین کل Total Ig	3.00 ^b	4.38 ^a	4.80 ^a	4.40 ^a	4.80 ^a	4.00 ^a	3.90 ^{ab}	0.31	0.004	0.98
ایمنی ثانویه Secondary immunity										
ایمنوگلوبولین-G Ig- G	2.00 ^b	4.75 ^a	5.30 ^a	5.00 ^a	5.80 ^a	5.00 ^a	4.80 ^a	0.35	0.0001	0.31
ایمنوگلوبولین-M Ig- M	1.50 ^b	3.25 ^a	3.60 ^a	3.80 ^a	3.70 ^a	3.80 ^a	3.80 ^a	0.28	0.0001	0.14
ایمنوگلوبولین کل Total Ig	3.50 ^c	8.00 ^b	8.90 ^{ab}	8.80 ^{ab}	9.50 ^a	8.80 ^{ab}	8.60 ^{ab}	0.44	0.0001	0.08

^۱ ۱- جیره پایه (شاهد مثبت- پرورش در دمای توصیه شده سویه راس)، ۲- جیره پایه (شاهد منفی- پرورش در شرایط تنش سرمایی)، ۳- شاهد منفی + ۰/۵ درصد بیوجار، ۴- شاهد منفی + ۰/۷۵ درصد بیوجار، ۵- شاهد منفی + ۱ درصد بیوجار، ۶- شاهد منفی + پروبیوتیک (۲۰۰ گرم در تن)، ۷- شاهد منفی + زئولیت (یک کیلوگرم در تن).

^۲ ۱- P-value مقایسات میانگین کل تیمارها و ۲- P-value مقایسه گروهی بین تیمار ۲ با تیمارهای ۳-۷.

^۱ 1- Basal ration (positive control- rearing in recommended temperature of Ross strain), 2) negative control (fed basal diet and rearing in cold stress), 3) negative control + %0.5 solid waste biochar, 4) negative control + %0.75 solid waste biochar, 5) negative control + 1% solid waste biochar, 6) negative control + probiotic Ecobacto-P (200 g/ton), 7) negative control + 1 kg /ton zeolite.

^۲ 1- P-value of total analysis and 2- P-value of contrast analysis between treatment 2 and treatments 3-7.

ریزجانداران موجود در محیط کاهش دهد؛ با این حال، به‌طور کلی تنش سرمایی به‌طور ثابتی بر سیستم ایمنی تأثیر نمی‌گذارد و می‌تواند سبب تقویت و یا سرکوب پاسخ‌ها در جوجه‌های گوشتی شود (Hangalapura et al., 2006; Siegel, 1995) و محققین دیگری نیز هیچ مدرکی مبنی بر سرکوب ایمنی همورال تحت شرایط تنش سرمایی القا شده پیدا نکردند (Dabbert et al., 1997). در مقابل، اثرات اندک تنش سرمایی حاد بر عیار آنتی‌بادی گلبول قرمز گوسفند در جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار گزارش شده است

نتایج نشان داد که اعمال تنش سرمایی سبب افزایش عیار آنتی‌بادی ثانویه جوجه‌های گوشتی علیه SRBC شد ($P < 0/05$)، اما بر پاسخ ایمنی اولیه تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). در رابطه با تأثیر افزودنی‌ها بر پاسخ ایمنی همورال جوجه‌های گوشتی روند یا پاسخ دقیقی مشاهده نشد و بین تأثیر افزودنی‌های مختلف بر عیار آنتی‌بادی علیه SRBC تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). در رابطه با تأثیر تنش سرمایی بر پاسخ ایمنی طیور گوشتی نظرات مختلفی وجود دارد. تنش سرمایی می‌تواند مقاومت بدن را در مقابل

نگهداری می‌شدند، این طور نبود (Hangalapura, 2006). در رابطه با تأثیر زئولیت بر ایمنی جوجه‌های گوشتی، محققین با افزودن ۱/۱۱۵ کیلوگرم زئولیت (سولفات آلومینیوم) در ترکیب با آهک یا اسید سیتریک به هر مترمربع از بستر گزارش کردند که عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند و پاسخ به تزریق فیتوهماکلوتنین تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (Farhadi et al., 2013). استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره، موجب بهبود پاسخ ایمنی در حیوانات آبی از (Amoah et al., 2021)، مرغ (Xu et al., 2018) و خوک (Nawaz et al., 2021) می‌شود.

(Regnier & Kelley, 1981).

ایمنی سلولی در خروس‌هایی که در معرض سرما قرار گرفته‌اند کاهش می‌یابد، در حالی که اثر تقویت‌کننده تنش سرمایی بر ایمنی سلولی در جوجه‌های در حال رشد و افزایش فعالیت فاگوسیتی و بهبود ایمنی سلولی نیز گزارش شده است (Hangalapura, 2006). تنش سرمایی در دمای هفت درجه سانتی‌گراد تولید آنتی‌بادی را افزایش می‌دهد. با این حال، هستر و همکاران (HESTER et al., 1996) گزارش کردند که قرار گرفتن در دمای صفر درجه سانتی‌گراد پاسخ آنتی‌بادی را در مرغ‌های قفسی کاهش داد که تا حدی مبتنی بر اثرات سرکوب‌کننده ایمنی در اثر افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدها تحت تأثیر تنش سرمایی است، اما در مرغ‌هایی که به‌صورت گروهی

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر رنگ و pH گوشت سینه و ران جوجه‌های گوشتی تحت آزمایش

Table 5- Effect of experimental treatments on color and pH of breast and thigh meat of broiler chickens

	تیمارهای آزمایشی ^۱							SEM	P-value ^۲	
	1	2	3	4	5	6	7		1	2
گوشت سینه										
Breast meat										
pH	5.9 ^c	4.4 ^d	5.8 ^c	7.2 ^b	7.6 ^{ab}	8.0 ^a	8.0 ^a	0.24	0.001	0.01
روشنایی (L)	24.8 ^c	104 ^a	111 ^a	105 ^a	94 ^{ab}	99.3 ^{ab}	84 ^b	5.0	0.001	0.32
زردی (b)	11.6 ^b	10.3 ^b	14.4 ^{ab}	12.3 ^{ab}	16.8 ^a	15.3 ^{ab}	15.4 ^{ab}	1.5	0.04	0.68
قرمزی (a)	21.6 ^a	13.3 ^b	13.5 ^b	15.4 ^b	12.8 ^b	15.7 ^b	12.0 ^b	1.4	0.01	0.06
گوشت ران										
Thigh meat										
PH	6.7 ^{bc}	4.6 ^d	6.3 ^c	7.1 ^b	7.63 ^{ab}	7.8 ^a	7.90 ^a	0.19	0.001	0.001
روشنایی (L)	28.8 ^d	94.2 ^a	100 ^a	83.5 ^{ab}	69 ^{bc}	83.0 ^{ab}	59.4 ^c	5.2	0.001	0.009
زردی (b)	16.8 ^c	14.6 ^d	22.1 ^a	17.3 ^{bc}	18.1 ^{bc}	19.0 ^b	15.4 ^{cd}	1.0	0.001	0.21
قرمزی (a)	22.8	18.0	19.1	21.0	20.9	18.3	19.7	1.3	0.29	0.009

^۱ ۱- جیره پایه (شاهد مثبت- پرورش در دمای توصیه شده سویه راس)، ۲- جیره پایه (شاهد منفی- پرورش در شرایط تنش سرمایی)، ۳- شاهد منفی + ۰/۵ درصد بیوجار، ۴- شاهد منفی + ۰/۷۵ درصد بیوجار، ۵- شاهد منفی + ۱ درصد بیوجار، ۶- شاهد منفی + پروبیوتیک (۲۰۰ گرم در تن)، ۷- شاهد منفی + زئولیت (یک کیلوگرم در تن).

^۲ ۱- P-value مقایسات میانگین کل تیمارها و ۲- P-value مقایسه گروهی بین تیمار ۲ با تیمارهای ۳-۷.

^۱ 1- Basal ration (positive control- rearing in recommended temperature of Ross strain), 2) negative control (fed basal diet and rearing in cold stress), 3) negative control + %0.5 solid waste biochar, 4) negative control + %0.75 solid waste biochar, 5) negative control + 1% solid waste biochar, 6) negative control + probiotic Ecobacto-P (200 g/ton), 7) negative control + 1 kg /ton zeolite.

^۲ 1- P-value of total analysis and 2- P-value of contrast analysis between treatment 2 and treatments 3-7.

قرمزی گوشت سینه جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی شد ($P < 0/05$)، اما بر زردی گوشت سینه تأثیر معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). در رابطه با رنگ گوشت ران، اعمال تنش سرمایی

اثر تیمارهای آزمایشی بر رنگ گوشت سینه و ران جوجه‌های گوشتی در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. نتایج این جدول نشان داد که اعمال تنش سرمایی سبب افزایش روشنایی و کاهش pH و

DFD^۱ گوشت افزایش می‌یابد (Leishman et al., 2021): (Adzitey & Nurul, 2011).

احتمال دارد که افزودنی‌ها با بهبود قابلیت هضم یا فراهم کردن مواد مغذی بیشتر یا افزایش ذخایر عضلات سبب بهبود رنگ گوشت شوند. در این رابطه، محققین با افزودن پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*) و باسیلوس لشنیفرمیس (*B. licheniformis*) غنی شده با سلنیوم (۱۰۰۰ میلی‌لیتر از محلول در ۱۰۰ کیلوگرم خوراک) (*Se-enriched Bacillus: SECB*) به جیره جوجه‌های گوشتی تحت تنش سرمایی از هفته ۵ تا ۸ با دمای ۵/۵ تا ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که افزودن SECB به غذا باعث افزایش روشنی، قرمزی و زردی گوشت سینه شد و ظرفیت نگهداری آب گوشت سینه را بهبود بخشید و اتلاف بعد پخت را کاهش داد (Yang et al., 2019) و مکمل پروبیوتیک موجب کاهش میزان pH عضله‌ی ران در جوجه‌های گوشتی شد (Mahajan et al., 2000). در مقابل، ایوانوویچ و همکاران (Ivanovic et Aksu et al., 2005; al., 2012) گزارش کردند که تغذیه پروبیوتیک در جوجه‌های گوشتی موجب افزایش معنی‌دار pH گوشت نسبت به گروه شاهد شد. گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها قادر به مهار مالون‌دی‌آلدئید هستند و در نتیجه، نقش حفاظتی بر اکسیداسیون چربی دارند و موجب کاهش تولید مالون‌دی‌آلدئید می‌شوند (Lin & Ivanovic et al., 2012; Yen, 1999). آکسو و همکاران (Aksu et al., 2005) تأثیر پروبیوتیک را بر کیفیت گوشت ران بررسی کردند و بیان نمودند که در اثر استفاده از پروبیوتیک مقدار TBARS تولید شده در گوشت ران کاهش می‌یابد. همچنین، باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در روده (لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم‌ها) موجب مهار تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Lin & Chang, 2000). آهن موجب افزایش روند اکسیداسیون چربی می‌شود و پروبیوتیک‌ها آهن را کیلات می‌کنند (KOT et al., 1995) که احتمالاً یکی از سازوکارهای آنتی‌اکسیدان بودن پروبیوتیک‌ها به همین دلیل است. از طرف دیگر، گزارش شده است که در اثر استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره، انباشت چربی بدنی در بلدرچین کاهش می‌یابد (Homma & Shinohara, 2004). این دو مورد احتمالاً توجیه کارآمدی پروبیوتیک‌ها در کاهش اکسیداسیون چربی‌ها است.

روشنایی گوشت ران را افزایش و pH و زردی آن را کاهش داد (۰/۰۵ < P)، اما بر قرمزی گوشت ران تأثیر معنی‌داری نداشت (۰/۰۵ > P). با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، همه افزودنی‌ها سبب افزایش pH گوشت سینه و ران در مقایسه با گروه شاهد شدند، به طوری که تا حد شاهد مثبت (پرورش یافته در شرایط دمایی توصیه شده) یا حتی بالاتر افزایش یافت. در رابطه با تأثیر افزودنی‌ها بر رنگ گوشت ران داده‌ها نشان دادند که رنگ گوشت سینه تحت تأثیر تیمارهای تغذیه‌ای قرار نگرفت، اما با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، در مقایسه با گروه شاهد، روشنایی گوشت ران در اثر افزودن یک درصد بیوجار یا زئولیت کاهش یافت و افزودن بیوجار در همه سطوح و پروبیوتیک سبب افزایش زردی و افزودن بیوجار در همه سطوح و زئولیت سبب افزایش قرمزی گوشت ران شدند (۰/۰۵ < P). همان طور که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود، تنش سرمایی و افزودنی‌های مختلف بر درصد ماده خشک، پروتئین خام، ظرفیت نگهداری آب، اتلاف آب ناشی از تراوش و پخت و پز گوشت سینه تأثیر معنی‌داری نداشتند (۰/۰۵ > P) و فقط غلظت مالون‌دی‌آلدئید گوشت سینه تحت تأثیر تنش سرمایی افزایش یافت (۰/۰۵ < P). با توجه به مقایسات گروهی بین شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و تیمارهای افزودنی‌ها، در مقایسه با گروه شاهد، افزودن زئولیت به جیره جوجه‌های گوشتی در شرایط تنش سرمایی به‌طور معنی‌داری سبب افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید گوشت سینه شد (۰/۰۵ < P).

رنگ گوشت تحت تأثیر pH گوشت و همچنین بروز یا عدم بروز تنش قبل از کشتار قرار دارد. تنش مزمن تأثیر قابل توجهی بر صفات رنگ (a و L) گوشت دارد (Leishman et al., 2021) و افزایش pH عضله پس از مرگ به دلیل دمای پایین قبل از مرگ جوجه منجر به تولید محصول تیره‌تر می‌شود که مورد پسند مصرف‌کننده نیست (Dadgar et al., 2011) و دلیل این مسئله می‌تواند به کاهش دریافت و افزایش مصرف انرژی به‌منظور مقابله با کاهش دمای بدن و کاهش ذخایر سلول‌های عضلانی باشد که سبب افزایش pH و تیره تر شدن گوشت می‌شود. پرندگان جهت حفظ دمای مرکزی بدن در شرایط سرد مجبور به استفاده از گلیکوژن ماهیچه‌ای به‌عنوان منبع انرژی می‌شوند (Haman et al., 2005). کاهش گلیکوژن عضله، قبل از کشتار، تشکیل لاکتات پس از مرگ را در گوشت کاهش می‌دهد و منجر به pH بالاتر عضله می‌شود (Dadgar et al., 2011). تنش دمایی حاد تأثیر بیشتری نسبت به تنش دمایی مزمن بر pH نهایی دارد (Leishman et al., 2021). تنش دمایی موجب کاهش کیفیت گوشت می‌شود (Barbut et al., 2005). با کاهش دما میزان

جدول ۶- اثر تیمارهای آزمایشی بر کیفیت گوشت سینه جوجه‌های گوشتی

Table 6- Effect of experimental treatments on breast meat quality of broiler chickens

خصوصیات Specification	تیمارهای آزمایشی ^۱ Experimental treatments ¹							SEM	P-value ²	
	1	2	3	4	5	6	7		1	2
ماده خشک (درصد) Dry matter (%)	26.8	27.9	26.9	28.4	28.9	27.8	28.4	0.47	0.73	0.21
پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)	22.3	22.8	23.3	24.3	24.7	23.1	24.2	0.58	0.51	0.09
مالون دی‌آلدئید (میکرومول/گرم) MDA (μmol/g)	0.106 ^c	1.50 ^b	1.84 ^{ab}	1.90 ^{ab}	1.63 ^b	1.98 ^{ab}	2.19 ^a	0.167	0.001	0.03
ظرفیت نگهداری آب (درصد) Water holding capacity (%)	13.8	12.7	14.1	16.8	15.1	9.57	12.1	1.65	0.121	0.66
اتلاف ناشی از تراوش (درصد) Drip loss (%)	9.6	11.9	12.3	12.4	12.9	13.2	12.6	1.2	0.24	0.4
اتلاف آب ناشی از پخت و پز (درصد) Cooking loss (%)	14.3	14.8	15.2	18.8	17.0	12.2	14.0	1.8	0.113	0.75

^۱ ۱- جیره پایه (شاهد مثبت- پرورش در دمای توصیه شده سویه راس)، ۲- جیره پایه (شاهد منفی- پرورش در شرایط تنش سرمایی)، ۳- شاهد منفی + ۰/۵ درصد بیوجار، ۴- شاهد منفی + ۰/۷۵ درصد بیوجار، ۵- شاهد منفی + ۱ درصد بیوجار، ۶- شاهد منفی + پروبیوتیک (۲۰۰ گرم در تن)، ۷- شاهد منفی + زئولیت (یک کیلوگرم در تن).

^۲ ۱- P-value مقایسات میانگین کل تیمارها و ۲- P-value مقایسه گروهی بین تیمار ۲ با تیمارهای ۳-۷.

¹ 1- Basal ration (positive control- rearing in recommended temperature of Ross strain), 2) negative control (fed basal diet and rearing in cold stress), 3) negative control + %0.5 solid waste biochar, 4) negative control + %0.75 solid waste biochar, 5) negative control + 1% solid waste biochar, 6) negative control + probiotic Ecobacto-P (200 g/ton), 7) negative control + 1 kg /ton zeolite.

² 1- P-value of total analysis and 2- P-value of contrast analysis between treatment 2 and treatments 3-7.

نتیجه گیری کلی

به‌طور کلی، تنش سرمایی منجر به کاهش عملکرد و تضعیف پاسخ ایمنی و کیفیت گوشت جوجه‌های گوشتی شد و با توجه به مقایسات گروهی بین گروه شاهد پرورش یافته در شرایط تنش سرمایی و گروه‌های دریافت‌کننده افزودنی‌ها، پروبیوتیک، بیوجار و زئولیت سبب کاهش تلفات آسیتی و وزن نسبی غده تیموس و افزایش وزن بدن در دوره آغازین، pH گوشت ران و سینه و قرمزی و زردی گوشت ران جوجه‌های گوشتی شدند، اما قادر به بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی در کل دوره، کیفیت گوشت سینه و ران، غلظت متابولیت‌ها و شمار سلول‌های خونی نشدند و در شرایط این آزمایش نتوانستند اثرات منفی تنش سرمایی جبران کنند. بنابراین، استفاده از این افزودنی‌ها در شرایط تنش سرمایی به‌منظور بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی قابل توصیه نمی‌باشد و با توجه به این که پژوهش

حاضر، اولین تحقیق در زمینه تأثیر بیوجار در زمینه تنش سرمایی می‌باشد، تا حصول نتیجه قطعی و دقیق‌تر نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان و محققین این پژوهش از مدیریت بازافت شهرداری ایلام و مدیریت پژوهش دانشگاه ایلام بابت تأمین هزینه‌ها و آزمایش‌های این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Adjei, A. A., Matsumoto, Y., Oku, T., Hiroi, Y., & Yamamoto, S. (1994). Dietary agrinine and glutamine combination improves survival in septic mice. *Nutrition Research*, 14(10), 1591-1599.
2. Adzitey, F., & Nurul, H. (2011). Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences-a mini review. *International Food Research Journal*, 18(1).
3. Aksu, M. I., Karaoğlu, M., Esenbuğa, N., Kaya, M., Macit, M., & Ockerman, H. W. (2005). Effect of a dietary

- probiotic on some quality characteristics of raw broiler drumsticks and breast meat. *Journal of Muscle Foods*, 16(4), 306-317. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2005.00023.x>
4. Amoah, K., Dong, X.-h., Tan, B.-p., Zhang, S., Kuebutornye, F. K., Chi, S.-y., Yang, Q.-h., Liu, H.-y., Zhang, H.-t., & Yang, Y.-z. (2021). In vitro assessment of the safety and potential probiotic characteristics of three *Bacillus* strains isolated from the intestine of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀× *Epinephelus lanceolatus*♂). *Frontiers in Veterinary Science*, 426. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.675962>
 5. ARDCorp, B. (2014). Investigating Benefits of Supplementing Broiler Feed with Broiler Litter Biochar.
 6. Azargohar, R., & Dalai, A. (2006). Biochar as a precursor of activated carbon. Twenty-seventh symposium on biotechnology for fuels and chemicals. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-268-7_62
 7. Barbut, S., Zhang, L., & Marcone, M. (2005). Effects of pale, normal, and dark chicken breast meat on microstructure, extractable proteins, and cooking of marinated fillets. *Poultry Science*, 84(5), 797-802. <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.797>
 8. Biesek, J., Kuźniacka, J., Banaszak, M., Maiorano, G., Grabowicz, M., & Adamski, M. (2020). The effect of various protein sources in goose diets on meat quality, fatty acid composition, and cholesterol and collagen content in breast muscles. *Poultry Science*, 99(11), 6278-6286. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.074>
 9. Blahova, J., Dobšiková, R., Strakova, E., & Suchý, P. (2007). Effect of low environmental temperature on performance and blood system in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Acta Veterinaria Brno*, 76(8), 17-23. <https://doi.org/10.2754/avb200776S8S017>
 10. Cheema, M., Qureshi, M., & Havenstein, G. (2003). A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science*, 82(10), 1519-1529.
 11. Cheron, B. M. (2017). Evaluation of Biochar as a Feed Additive in Commercial Broiler Diets.
 12. Dabbert, C., Lochmiller, R. L., & Teeter, R. G. (1997). Effects of acute thermal stress on the immune system of the Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*). *The Auk*, 114(1), 103-109. <https://doi.org/10.2307/4089069>
 13. Dadgar, S., Lee, E., Leer, T., Crowe, T., Classen, H., & Shand, P. (2011). Effect of acute cold exposure, age, sex, and lairage on broiler breast meat quality. *Poultry Science*, 90(2), 444-457. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00840>
 14. Dim, C., Akuru, E., Egom, M., Nnajiolor, N., Ossai, O., Ukaijwe, C., & Onyimonyi, A. (2018). Effect of dietary inclusion of biochar on growth performance, haematology and serum lipid profile of broiler birds. *Agro-Science*, 17(2), 9-17.
 15. Evans, A., Boney, J., & Moritz, J. (2017). The effect of poultry litter biochar on pellet quality, one to 21 d broiler performance, digesta viscosity, bone mineralization, and apparent ileal amino acid digestibility. *Journal of Applied Poultry Research*, 26(1), 89-98. <https://doi.org/10.3382/japr/pfw049>
 16. Farhadi, D., Shariatmadari, F., & Karimi Torshiz, A. (2013). The Effect of Litter Chemical Additives on Performance, Immune System and Incidence of Ascites Syndrome in Broiler Chickens. *Research On Animal Production (Scientific and Research)*, 3(6), 1-14 (In persian).
 17. Ferket, P. R., & Gernat, A. G. (2006). Factors that affect feed intake of meat birds: A review. *International Journal of Poultry Science*, 5(10), 905-911.
 18. Gerlach, H., & Schmidt, H.-P. (2012). Biochar in poultry farming. *Ithaka Journal*, 2012(1), 262-264p.
 19. Haman, F., Péronnet, F., Kenny, G. P., Massicotte, D., Lavoie, C., & Weber, J. M. (2005). Partitioning oxidative fuels during cold exposure in humans: muscle glycogen becomes dominant as shivering intensifies. *The Journal of Physiology*, 566(1), 247-256. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.086272>
 20. Hangalapura, B. (2006). *Cold stress and immunity: do chickens adapt to cold by trading-off immunity for thermoregulation?* Wageningen University and Research.
 21. Hangalapura, B. N., Kaiser, M. G., van der Poel, J. J., Parmentier, H. K., & Lamont, S. J. (2006). Cold stress equally enhances in vivo pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(5), 503-511. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.07.001>
 22. Hester, P. Y., Muir, W., Craig, J., & Albright, J. (1996). Group selection for adaptation to multiple-hen cages: production traits during heat and cold exposures. *Poultry Science*, 75(11), 1308-1314. <https://doi.org/10.3382/ps.0751308>
 23. Homma, H., & Shinohara, T. (2004). Effects of probiotic *Bacillus cereus toyoi* on abdominal fat accumulation in the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Science Journal*, 75(1), 37-41. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2004.00152.x>
 24. Huff, G., Huff, W., Rath, N., de Los Santos, F. S., Farnell, M., & Donoghue, A. (2007). Influence of hen age on the response of turkey poults to cold stress, *Escherichia coli* challenge, and treatment with a yeast extract antibiotic alternative. *Poultry Science*, 86(4), 636-642. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.636>
 25. Huff, G., Huff, W., Rath, N., El-Gohary, F., Zhou, Z., & Shini, S. (2015). Efficacy of a novel prebiotic and a commercial probiotic in reducing mortality and production losses due to cold stress and *Escherichia coli* challenge of broiler chicks. *Poultry Science*, 94(5), 918-926. <https://doi.org/10.3382/ps/pev068>

26. Ivanovic, S., Pisinov, B., Maslic-Strizak, D., Savic, B., & Stojanovic, Z. (2012). Influence of probiotics on quality of chicken meat. *African Journal of Agricultural Research*, 7(14), 2191-2196.
27. Joseph, S. D., Camps-Arbestain, M., Lin, Y., Munroe, P., Chia, C., Hook, J., Van Zwieten, L., Kimber, S., Cowie, A., & Singh, B. (2010). An investigation into the reactions of biochar in soil. *Soil Research*, 48(7), 501-515. <https://doi.org/10.1071/SR10009>
28. Kim, H.-S., Kim, K.-R., Kim, H.-J., Yoon, J.-H., Yang, J. E., Ok, Y. S., Owens, G., & Kim, K.-H. (2015). Effect of biochar on heavy metal immobilization and uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.) in agricultural soil. *Environmental Earth Sciences*, 74(2), 1249-1259. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4116-1>
29. KOT, E., Furmanov, S., & Bezkorovainy, A. (1995). Accumulation of iron in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Science*, 60(3), 547-550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09823.x>
30. Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., & Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812-1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>
31. Leishman, E. M., Ellis, J., van Staaveren, N., Barbut, S., Vanderhout, R. J., Osborne, V. R., Wood, B. J., Harlander-Matauschek, A., & Baes, C. F. (2021). Meta-analysis to predict the effects of temperature stress on meat quality of poultry. *Poultry Science*, 100(11), 101471. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101471>
32. Lin, M. Y., & Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(8), 1617-1622. <https://doi.org/10.1023/A:1005577330695>
33. Lin, M. Y., & Yen, C. L. (1999). Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3661-3664. <https://doi.org/10.1021/jf9812351>
34. Lotfollahian, H., Shariatmadari, F., Shivazad, M., & Mirhadi, S. (2004). Study on the effects of two kinds of natural zeolite in diets on blood biochemical parameters, relative weight of body organs and broilers performance. *Pazhoohesh and sazandegi*, 3(17), 18-34 (in persian).
35. Mabe, L. T., Su, S., Tang, D., Zhu, W., Wang, S., & Dong, Z. (2018). The effect of dietary bamboo charcoal supplementation on growth and serum biochemical parameters of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture Research*, 49(3), 1142-1152. <https://doi.org/10.1111/are.13564>
36. Mahajan, P., Sahoo, J., & Panda, P. (2000). Effect of probiotic (Lacto-Sacc) feeding, packaging methods and seasons on the microbial and organoleptic qualities of chicken meat balls during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 37(1), 67-71.
37. Man, K. Y., Chow, K. L., Man, Y. B., Mo, W. Y., & Wong, M. H. (2021). Use of biochar as feed supplements for animal farming. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(2), 187-217. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1721980>
38. Meier, S., Borie, F., Bolan, N., & Cornejo, P. (2012). Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(7), 741-775. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.528518>
39. Montalto, M., Maggiano, N., Ricci, R., Curigliano, V., Santoro, L., Di Nicuolo, F., Vecchio, F. M., Gasbarrini, A., & Gasbarrini, G. (2004). *Lactobacillus acidophilus* protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion*, 69(4), 225-228. <https://doi.org/10.1159/000079152>
40. Nawaz, A. H., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Poultry response to heat stress: its physiological, metabolic, and genetic implications on meat production and quality including strategies to improve broiler production in a warming world. *Frontiers in Veterinary Science*, 814. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081>
41. Nazifi, S. (1997). Hematological and Clinical Biochemistry of Birds. Shiraz University Press. 276 (In persian).
42. Ohno, A., Ano, T., & Shoda, M. (1995). Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5), 517-519. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)80930-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)80930-5)
43. 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), e0505-e0505. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-12753>
44. Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
45. Prvulovic, D., Kojic, D., Grubor-Lajsic, G., & Kosarcic, S. (2008). The effects of dietary inclusion of hydrated aluminosilicate on performance and biochemical parameters of broiler chickens. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 32(3), 183-189.
46. Qi, X., Mu, X., Zhang, Z., Yu, J., Zhao, Q., Xu, H., & Gu, W. (2018). Effects of compound probiotics on immune function and mucosal structure of small intestine of broilers under stress. *Chinese Veterinary Science/Zhongguo*

- Shouyi Kexue*, 48(10), 1332-1340.
47. Qureshi, S., Khan, H. M., Mir, M. S., Raja, T., Khan, A., Ali, H., & Adil, S. (2018). Effect of cold stress and various suitable remedies on performance of broiler chicken. *The Journal of World's Poultry Research*, 8(3), 66-73.
 48. Rajapaksha, A. U., Ahmad, M., Vithanage, M., Kim, K.-R., Chang, J. Y., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2015). The role of biochar, natural iron oxides, and nanomaterials as soil amendments for immobilizing metals in shooting range soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6), 931-942. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9694-z>
 49. Ranjbar, A., Khatibjoo, A., & Karimi, K. (2013). Effect of Probiotic on Performance, Humoral Immunity, Gut Development and Ascites Incidence of Broiler Chickens Reared at Cold Environment. MSc thesis. University of Islamic Azad of Varamin, Iran (In Persian).
 50. Rashidi, N., Khatibjoo, A., Taherpour, K., Akbari-Gharaei, M., & Shirzadi, H. (2020). Effects of licorice extract, probiotic, toxin binder and poultry litter biochar on performance, immune function, blood indices and liver histopathology of broilers exposed to aflatoxin-B1. *Poultry Science*, 99(11), 5896-5906. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.034>
 51. Regnier, J., & Kelley, K. (1981). Heat-and cold-stress suppresses in vivo and in vitro cellular immune responses of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, 42(2), 294-299.
 52. Safaeikatouli, M., Jafariahangari, Y., & Baharlouei, A. (2010). Effects of dietary inclusion of sodium bentonite on biochemical characteristics of blood serum in broiler chickens. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(6), 877-880.
 53. Sahin, N., Onderci, M., Sahin, K., & Smith, M. O. (2003). Melatonin supplementation can ameliorate the detrimental effects of heat stress on performance and carcass traits of Japanese quail. *Biological Trace Element Research*, 96(1), 169-177. <https://doi.org/10.1385/BTER:96:1-3:169>
 54. Salma, U., Miah, A., Maki, T., Nishimura, M., & Tsujii, H. (2007). Effect of dietary *Rhodobacter capsulatus* on cholesterol concentration and fatty acid composition in broiler meat. *Poultry Science*, 86(9), 1920-1926. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.1920>
 55. Sanchez-Monedero, M., Cayuela, M. L., Roig, A., Jindo, K., Mondini, C., & Bolan, N. (2018). Role of biochar as an additive in organic waste composting. *Bioresource Technology*, 247, 1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.193>
 56. Sarooun, K., Preston, T., & Leng, R. (2018). Rice distillers' byproduct and molasses-urea blocks containing biochar improved the growth performance of local Yellow cattle fed ensiled cassava roots, cassava foliage and rice straw. *Bone*, 3(3), 3.
 57. SAS, I. (2004). SAS/WATTM User's Guide. SAS Institute, Inc., Cary NC.
 58. Siegel, H. (1995). Stress, strains and resistance. *British Poultry Science*, 36(1): 3-22. <https://doi.org/10.1080/00071669508417748>
 59. Traffano-Schiffo, M. V., Chuquizuta, T., Castro-Giraldez, M., & Fito, P. J. (2021). Development of a methodology to categorize poultry meat affected by deep pectoral myopathy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3), e15226. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15226>
 60. Varmaghany, S., Torshizi, M. A. K., Rahimi, S., Lotfollahian, H., & Hassanzadeh, M. (2015). The effects of increasing levels of dietary garlic bulb on growth performance, systolic blood pressure, hematology, and ascites syndrome in broiler chickens. *Poultry science*, 94(8), 1812-1820.
 61. Winders, T. M., Jolly-Breithaupt, M., Freeman, C., Mark, B., Erickson, G., & Watson, A. (2018). Evaluating the Effect of Feeding Biochar to Cattle on Methane Production and Diet Digestibility. 10th International Livestock Environment Symposium (ILES X),
 62. Xu, S., Lin, Y., Zeng, D., Zhou, M., Zeng, Y., Wang, H., Zhou, Y., Zhu, H., Pan, K., & Jing, B. (2018). *Bacillus licheniformis* normalize the ileum microbiota of chickens infected with necrotic enteritis. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20059-z>
 63. Yang, J., Zhang, M., & Zhou, Y. (2019). Effects of selenium-enriched *Bacillus* sp. compounds on growth performance, antioxidant status, and lipid parameters breast meat quality of Chinese Huainan partridge chicks in winter cold stress. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1015-6>
 64. Zhou, H., Kong, L., Zhu, L., Hu, X., Busye, J., & Song, Z. (2021). Effects of cold stress on growth performance, serum biochemistry, intestinal barrier molecules, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in broilers. *Animal*, 15(3), 100138. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100138>
 65. Zhuang, H., Rothrock Jr, M. J., Line, J. E., Lawrence, K. C., Gamble, G. R., Bowker, B. C., & Keener, K. M. (2020). Optimization of in-package cold plasma treatment conditions for raw chicken breast meat with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66, 102477. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102477>



Effect of Growth Hormone Locus Polymorphism on Weight Gain of Gosling

Ghorban Elyasi Zarringhabaie ¹*

1- Scientific Member of Animal Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

*Corresponding Author's Email: Gh.elyasi@areeo.ac.ir

Received: 10-10-2022
Revised: 16-11-2022
Accepted: 27-11-2022
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Elyasi Zarringhabaie, G. (2023). Effect of growth hormone Locus polymorphism on weight gain of gosling. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 547-556. (in Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2022.79036.1103>

Introduction: Compared to other poultry, geese are more resistant to adverse environmental factors, so they are less likely to get sick. Geese are fast-growing poultry, and they are easy to raise. Due to the importance of goose meat due to its high calorie content compared to the meat of other poultry species and its high palatability, as well as its resistance to many diseases, it is necessary to raise this bird on an economic scale. In industrial goose breeding, there arises a need to develop strains tailored for specific purposes such as meat, egg, and dual-purpose. This allows breeders to align breeding objectives with associated costs and optimize productivity for the industry's requirements. Consequently, the economic coefficients of breeding, coupled with the relative selection of products, necessitate consideration in four primary aspects: achieving high weight gain, reducing the food conversion ratio, increasing the egg count, and enhancing egg fertility. It is crucial to acknowledge the negative correlation coefficient with the egg production trait within the realms of management and breeding sciences. This is because an improvement in one trait may inversely impact the values of another trait. Among the effective strategies in breeding, the selection is based on genetic markers that lead to the reduction of the generation gap and increase in production. Due to the ever-increasing growth of the population, a lot of effort is needed to overcome unfavorable environmental conditions, including biological and non-biological factors, and to increase the quantity and quality of the product. In recent years, many advances have been made in the field of molecular biology and biotechnology, which has provided a powerful tool for the genetic study of animals. Considering that the growth hormone gene (GH indicator) is one of the candidate genes for various traits, especially weight gain, but it has not been used in goose breeding programs so far. Therefore, in order to determine the contribution of this gene in goose breeding, its relationship with the weight gain trait of chickens should be determined, which is actually the purpose of designing and implementing this study.

Materials and Methods: In order to implement this research, 300 gosling hatched from eggs of Malekan research station geese and reared for 5 months. The hatched goose chicks were kept and fed according to breeding standards. Gosling weighted monthly and blood samples were collected from them in vacuum tubes containing EDTA at end of raising period. Genomic DNA was extracted by Pronase procedure. A spectrophotometer was used to determine the quality of the extracted DNA, and for this purpose, a wavelength of 260 nm was used to determine the amount and concentration of DNA, and a wavelength ratio of 260/280 was used to determine the purity and quality of the extracted DNA. Amplification of the desired region from exon 2 of the growth hormone gene was done by thermocycler using the designed primers GH-G F and GH-G R to amplify 162 base pairs. 2% agarose gel with ethidium bromide staining was used to identify PCR products. The SSCP technique was used to determine the genotypes of the growth hormone gene. Denatured SSCP products was electrophoresed on 10% polyacrylamide gel and stained by silver nitrate. Effects of GH gene on growth performance were analyzed by SPSS software version 23 in CRD design.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2022.79036.1103>

Results and Discussion: Genotypes pattern of 1, 2 and 3 were recognized. Frequencies of 1, 2 and 3 patterns resulted 48.15, 44.44 and 7.15 percent, respectively. Results indicated that GH genotypes affected live weight of gosling in 1 and 2 month of age, the 3th pattern had heavier live weight in these periods. Despite of heavier live weight in pattern 3, for months of 3, 4 and 5 no significant differences observed among them. Low frequency of pattern 3, that affected live weight in gosling, can be increased in study population in favor of this pattern. The results of this research showed that the growth hormone gene and especially exon 2 of this gene can be considered as a genetic marker in the selection of geese for the weight gain trait.

Conclusion: Given the considerable importance of the economic coefficient of egg production in geese, which outweighs the emphasis on increasing the weight of breeding geese, and considering that the economic activities of the station align more closely with augmenting the number of chicks produced per breeding goose, the observed negative correlation between egg production and weight gain in geese suggests a lower prevalence of the effective genotype influencing the weight gain of geese in this station. The selection focus at Malekan station has predominantly aimed at enhancing the egg laying rate, in stark contrast to the growth rate of geese. Consequently, this deliberate selection has led to an increase in the frequency of the effective genotype impacting egg laying and concurrently a reduction in the frequency of genotypes influencing the weight gain of goose chicks.

Keywords: Body weight, Geese, Genotype, Growth hormone, SSCP

تأثیر جایگاه ژنی هورمون رشد بر افزایش وزن غذاهای بومی

قربان الیاسی زرین‌قبایی*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۶

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی اثر ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه آگزون ۲ هورمون رشد بر وزن زنده غاز می‌باشد. برای اجرای این تحقیق ابتدا تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه غاز از تخم تولیدی گله تحقیقاتی ایستگاه ملکان جوجه‌کشی شده و به مدت پنج ماه پرورش یافت. غذاهای پرورشی ماهانه به صورت انفرادی وزن‌کشی شده و در پایان دوره پرورش از آن‌ها خون‌گیری به عمل آمد. پس از اخذ نمونه خون و استخراج DNA ژنومی، ناحیه مورد نظر از آگزون ۲ ژن هورمون رشد با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر شد. چندشکلی ژن هورمون رشد و ژنوتیپ‌ها برای این ژن با روش SSCP و با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR واسرشته شده بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره تعیین گردید. تأثیر ژن هورمون رشد بر روی عملکرد رشد غاز با استفاده از نرم‌افزار SPSS و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. در این تحقیق، فراوانی الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۴۸/۱۵، ۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد حاصل گردید. با توجه به نتایج به دست آمده، تأثیر چندشکلی حاصل بر رشد جوجه‌ها در سنین یک و دو ماهگی معنی‌دار بوده و الگوی ژنوتیپی سوم میانگین وزن زنده بیشتری را نشان داد. در صورتی که در ماه‌های سه، چهار و پنج علی‌رغم بالا بودن وزن زنده در غذاهایی با ژنوتیپ سوم، اختلاف معنی‌داری حاصل نگردید. با توجه به پایین بودن فراوانی الگوی مؤثر در افزایش وزن جوجه‌ها، انتظار می‌رود که افزایش فراوانی این ژنوتیپ در گله‌های پرورشی موجب افزایش میانگین وزن زنده جوجه‌ها در مدت پرورش گردد.

واژه‌های کلیدی: ژنوتیپ، غاز، وزن بدن، هورمون رشد، SSCP

مقدمه

سایر گونه‌های طیور و خاصیت خوش‌خوراکی بسیار زیاد آن و همچنین مقاومت در برابر بسیاری از بیماری‌ها ایجاب می‌کند که این پرنده در مقیاس اقتصادی مورد پرورش قرار گیرد (Sarhangi et al., 2001). غازها از نظر تبدیل علوفه دارای الیاف خام بالا به پروتئین حیوانی قابل مصرف در تغذیه انسان، می‌توانند گزینه مناسبی به جای نشخوارکنندگان باشند، با توجه به ضرورت موجود در پرورش صنعتی غاز، باید سویه‌های گوشتی، تخمی و حتی دومنظوره به وجود آید تا بسته به هدف پرورش جوابگوی هزینه‌های پرورش بوده و بهره‌وری لازم برای صنعت را ایجاد نماید. لذا با توجه به اهمیت ضرایب اقتصادی پرورش و انتخاب نسبی محصول باید جمعیت و گله‌های پرورشی در چهار مسیر اصلی افزایش وزن بالا، کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش تعداد تخم و میزان بالای باروری تخم مورد توجه قرار گیرد، که استفاده از صفت افزایش وزن با توجه به ضریب همبستگی منفی با صفت تولید تخم باید با لحاظ علوم مدیریتی و اصلاح نژادی صورت پذیرد، چرا که افزایش در یک صفت موجب کاهش مقادیر صفت دیگر خواهد شد.

غازها نسبت به سایر طیور در برابر عوامل نامساعد محیطی مقاومت بیشتری داشته و از هشت هفتگی که رشد پرها تقریباً تکمیل می‌شود، مقاوم‌تر نسبت به عوامل محیطی نامناسب افزایش می‌یابد. غازها از ماکیان سریع‌الرشد هستند و پرورش آن‌ها به آسانی صورت می‌گیرد، زیرا گله‌های غاز احتیاج به جایگاه‌های پُرهزینه و تغذیه کاملاً دستی نداشته و با هزینه پایین می‌تواند پرورش یابد. در مکان‌هایی که مراتع سبز و چراگاه‌های خوب وجود دارد، گله‌های غاز می‌توانند به جز فصول سرد و زمستان، غذای خود را از محوطه چراگاه بدون هیچ‌گونه مشکلی به دست آورند (Ghelich, 1998). نظر به اهمیت گوشت غاز به دلیل داشتن مقدار کالری بالا نسبت به گوشت

۱- عضو هیأت علمی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تبریز، ایران.

(Email: Gh.elyasi@areeo.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2022.79036.1103>

دارای عملکردهای فیزیولوژیکی متعددی در حیوانات است (Ma et al., 2012) که می‌توان به تحریک رشد عضلات، تشکیل استخوان، تنظیم میزان چربی، متابولیسم، تولیدمثل، پیری و ... اشاره نمود که همگی مرتبط با رشد و تکامل حیوانات هستند (Millar et al., 2010). بنابراین، رشد در حیوانات یک ویژگی چندعلتی است که از اثرات متقابل مولکولی و ژنتیکی پیچیده‌ای برخوردار بوده و یک نقش اصلی در مهره‌داران در این خصوص بازی می‌کند. در کنار وظیفه اصلی آن در تنظیم رشد موجودات، در چند فرایند فیزیولوژیکی دیگر که متابولیسم چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، شرکت می‌کند (Moller and Norreland, 2003).

همچنین، ثابت شده است که در پایداری سیستم ایمنی نقش مهمی دارد (Jeay et al., 2002). این اثرات پلیوتروپی هورمون رشد معمولاً با واسطه‌گری عامل رشد شبه انسولین^۴ به صورت غیرمستقیم انجام می‌پذیرد، که در کبد و سایر بافت‌ها در پاسخ به تحریک هورمون رشد ساخته می‌شود.

مطالعه واریانت‌های اللی ژن هورمون رشد به صورت گسترده به عنوان روشی برای توضیح نقش ژن در فعالیت‌های پلیوتروپی در حیوانات اهلی به کار گرفته شده است (Chang et al., 2012). در پستانداران ژن هورمون رشد دارای ۶-۵ اگزون و به تبع آن ۵-۴ اینترون است (Mao et al., 1995). cDNA حاصل از آن در حدود ۱۲۰۰-۸۰۰ جفت باز بوده و طول پروتئین با ساختمان اولیه آن متشکل از ۲۷-۱۶ اسیدآمینو و طول پروتئین کامل از ۱۹۱-۱۸۶ اسیدآمینو تشکیل شده است (Harvey and Doughaday, 1995). ژن هورمون رشد در طیور دارای پنج اگزون و چهار اینترون است که دارای چندشکلی بالا در طیور می‌باشد (Qiao et al., 2011; Chang et al., 2012).

بسیاری از مطالعات مربوط به ارتباط نشانگر با صفات در گونه‌های مختلف گزارش گردیده است و در این میان، مطالعه با استفاده از ریزآرایه cDNA بر روی اردک نشان داد که هورمون رشد یکی از ترانسکرپت‌های بیان شده متفاوت در غده هیپوفیز اردک است (Chang et al., 2007). این محققین متوجه شدند که ژن هورمون رشد یک ژن هدف ارزشمند برای پیدا کردن جایگاه صفات اقتصادی است.

کاناساکو و همکاران (Kansaku et al., 2008) گزارش کردند که ژن GH اردک ۵/۲۵ کیلوباز بوده و دارای پنج اگزون و چهار اینترون می‌باشد. این محققین بیان داشتند که این ژن از نظر ساختمانی به ژن‌های GH مرغ و پستانداران شباهت دارد. در این ژن پنج جایگاه چندشکل تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتور ژن هورمون رشد اردک تعیین گردید، ولی ارتباط این چندشکلی با صفات تولیدی

از جمله راهکارهای مؤثر در اصلاح نژاد، انتخاب بر اساس نشانگرهای ژنتیکی است که منجر به کاهش فاصله نسلی و افزایش تولید می‌گردد. به دلیل رشد روزافزون جمعیت تلاش زیادی برای غلبه بر شرایط نامساعد محیطی، اعم از عوامل زیستی و غیرزیستی و افزایش کمیت و کیفیت محصول لازم است. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و زیست‌فناوری صورت گرفته است، اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای DNA امروزه کاربردهای گسترده‌ای یافته‌اند که عمده‌ترین آن‌ها در پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیص والدین، تشخیص بیماری‌های گیاهی و جانوری، مطالعات ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح نژاد دام و طیور می‌باشد (Elyasi et al., 2012). نشانگرهای ژنتیکی یا به عبارتی، نشانگرهای DNA در مدت دو دهه تکامل شگرف و حیرت‌آوری داشته‌اند که در این میان، انواع مختلف نشانگرهای DNA با تفاوت‌های زیادی از نظر تکنیک و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازدهی، تجزیه، تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفی شدند. در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA، ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز^۱ بیشترین نقش را داشته است، چرا که تکثیر قطعه خاصی از DNA توسط این واکنش اصول بسیاری از تکنیک‌های مولکولی است که به سرعت به عنوان یک ابزار قدرتمندی در ژنتیک مولکولی و روش‌های آزمایشگاهی به کار گرفته شده و کاربردهای آن روز به روز در حال توسعه و تکامل است (Elyasi et al., 2012).

نشانگرهای ژنتیکی متصل به جایگاه‌های ژنی صفات مهم اقتصادی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بنابراین می‌توانند سرعت و کارآمدی برنامه‌های اصلاحی در حیوانات را بهبود ببخشند. هنگامی که ارتباطی بین چندشکلی DNA و یک صفت آشکار می‌گردد، چندشکلی DNA می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی کاندیدا برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر^۲ مورد استفاده قرار گیرد (Chang et al., 2012)، چرا که عموماً توالی آمینواسیدها در پروتئین‌ها تعیین‌کننده بیان، تکرار و عملکرد آن‌ها می‌باشد، لذا جهش‌هایی که ساختمان اولیه پروتئین را تغییر می‌دهند، می‌توانند این پارامترها را تحت تأثیر قرار دهند. وقتی که ناحیه کدکننده تغییراتی مانند حذف‌شدگی، اضافه‌شدگی، جابجایی و یا وارونگی را در خود می‌بیند، این عمل ممکن است باعث تغییرات عملکردی در بیان ژن گردد (Yang et al., 2007).

هورمون رشد یک پلی‌پپتید ساده است که از گرانولوسیت‌های اتوزینوفیلی^۳ هیپوفیز قدامی ترشح می‌گردد (Kato et al., 2002) و

1- (PCR) Polymerase Chain Reaction

2- Marker-Assisted Selection (MAS)

3- Eosinophilic granulocytes

4- Insulin-like growth factor I (IGF-I)

کاندید برای صفات مختلف و به خصوص افزایش وزن می‌باشد، ولی تاکنون در برنامه‌های اصلاح نژادی غاز به کار برده نشده است. لذا جهت تعیین سهم این ژن در پرورش غاز باید ارتباط آن با صفت افزایش وزن جوجه‌ها مشخص گردد. در این میان، استفاده از فناوری‌های نوین و به‌ویژه زیست‌فناوری به جهت تسریع در فرایند و کاهش هزینه‌های اصلاح نژادی شایان توجه است که در واقع هدف طراحی و اجرای این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای تهیه جوجه غازها تعداد ۳۰۰ عدد جوجه از تخم‌های تولیدی گله غاز ایستگاه تحقیقات ملکان جوجه‌کشی گردید. جوجه‌های تفریخ شده بر اساس استاندارد پرورشی نگهداری و تغذیه شدند. پس از نصب شماره پا، در پایان هر ماه به صورت انفرادی وزن کشتی گردیدند. پس از گذشت پنج ماه و رسیدن غازها به وزن کشتار (مشاهده تغییرات کم در روند افزایش وزن)، خون‌گیری از آن‌ها در لوله‌های تحت خلأ حاوی EDTA (جهت جلوگیری از انعقاد خون) صورت گرفت. پس از خون‌گیری، نمونه‌های خون به آزمایشگاه منتقل شده و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری گردید.

استخراج DNA از نمونه‌های خون از ۱۰ میکرولیتر خون مطابق روش بایلس و همکاران (Bailes et al., 2007) و با استفاده از آنزیم پروناز به شرح زیر انجام گرفت. جهت تعیین کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید، که برای این منظور از طول موج ۲۶۰ نانومتر برای تعیین مقدار و غلظت DNA و از نسبت طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ برای تعیین میزان خلوص و کیفیت DNA استخراج شده استفاده گردید. تکثیر ناحیه مورد نظر از اگزون ۲ ژن هورمون رشد توسط دستگاه ترموسایکلر و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده GH-G R و GH-G F توسط نرم‌افزار اولیگو ۷ از ژنوم غاز با شماره دسترسی XM_005021748.1 برای تکثیر ۱۶۲ جفت باز با توالی زیر صورت گرفت.

GH-G F 5'- GTCGTGGT TTTTCTCTCTC - 3'
GH-G R 5'- AACTCTTTGTACGCTCTCTGC - 3'

به منظور تعیین دقیق دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی^۲ استفاده شده و سپس مرحله اصلی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با ۳۵ چرخه (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای واسرشته کردن^۳، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال^۴ آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه برای بسط^۵ زنجیره DNA در دستگاه ترموسایکلر^۶ و در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری واکنش

ارائه نشده است. گروه دیگری (Chang et al., 2012) تصمیم گرفتند تا بررسی‌های بیشتری بر روی ژن هورمون رشد اردک انجام دهند، بنابراین بر روی نواحی اگزون متمرکز گردیدند تا چندشکلی‌های موجود در آن را تعیین نمایند. اثر چندشکلی هورمون رشد بر روی صفات تولیدمثلی در اردک (Chang et al., 2012) مطالعه و مشخص گردید که جهش در ناحیه C3169T با میزان باروری و حداکثر میزان قابلیت باروری در ارتباط است که اردک‌هایی با ژنوتیپ CC دارای میزان باروری و مدت زمان باروری بیشتری در مقایسه با CT هستند و همچنین در جایگاه C3700T اردک‌هایی CC دارای مدت زمان باروری بیشتری در مقایسه با TT می‌باشند.

اطلاعات کمی در خصوص ژن هورمون رشد غاز در مقایسه با اردک و مرغ وجود دارد (Zhan and Yang, 2005) و به‌ویژه این که مطالعات سیستماتیک بسیار اندکی در ارتباط با چندشکلی ژن هورمون رشد و عملکرد تولیدی غاز وجود دارد. با توجه به این که هیچ روش ایمونولوژیکی برای ارزیابی سطوح هورمون رشد در پلاسماهای غازها وجود ندارد، که مانع مطالعه تنظیم غدد درون‌ریز در این گونه می‌شود. چن و همکاران (Chen et al., 2022) روش ELISA ساندویچ را برای تعیین غلظت هورمون رشد در پلاسماهای غازها ایجاد کردند که می‌تواند به طور موثر تفاوت در غلظت هورمون رشد در نمونه‌های پلاسماهای غازها در مراحل مختلف فیزیولوژیکی را تشخیص دهد، بنابراین برای مطالعه آینده رشد و متابولیسم آن‌ها مفید خواهد بود.

همولوژی هورمون رشد غاز با مرغ و اردک در کل توالی آن‌ها به ترتیب ۷۷/۵۴ و ۹۲/۳۸ درصد و برای توالی CDS آن‌ها به ترتیب ۹۷/۶ و ۹۹/۹ درصد حاصل گردیده است (Zhao et al., 2011a). این محققین تعداد SNP را در ناحیه کد شونده، شش عدد به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید و در ناحیه اینترون‌ها، دو عدد به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید گزارش نمودند. این در حالی است که نقشه تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که در ژنوم مرغ در حدود ۲/۸ میلیون SNP وجود دارد که در هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید به طور متوسط پنج جهش پراکنده شده است (Nachman, 2001).

مدارک موجود در چند نژاد غاز سفید پیشنهاد کرده است که اگزون دوم ژن هورمون رشد غاز دارای طول زیادی است، در صورتی که چهار اگزون دیگر کوتاه می‌باشند، و تمام SNP‌های کشف شده بر روی اگزون ۲ قرار دارند که این اگزون را برای مطالعات ژنتیکی منطقی می‌داند (Dong et al., 2010)، که بعدها چندشکلی ژن هورمون رشد غاز نژاد هایووان^۱ با استفاده از PCR-SSCP به دست آمد (Zhang et al., 2014)، که می‌تواند معیاری برای مطالعه مقایسه‌ای ژن هورمون رشد سایر نژادهای غاز قرار گیرد. لذا با توجه به این که ژن هورمون رشد (نشانگر GH) یکی از ژن‌های

- 2- Gradient
- 3- Denaturation
- 4- Annealing
- 5- Extension
- 6- Thermo cycler

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

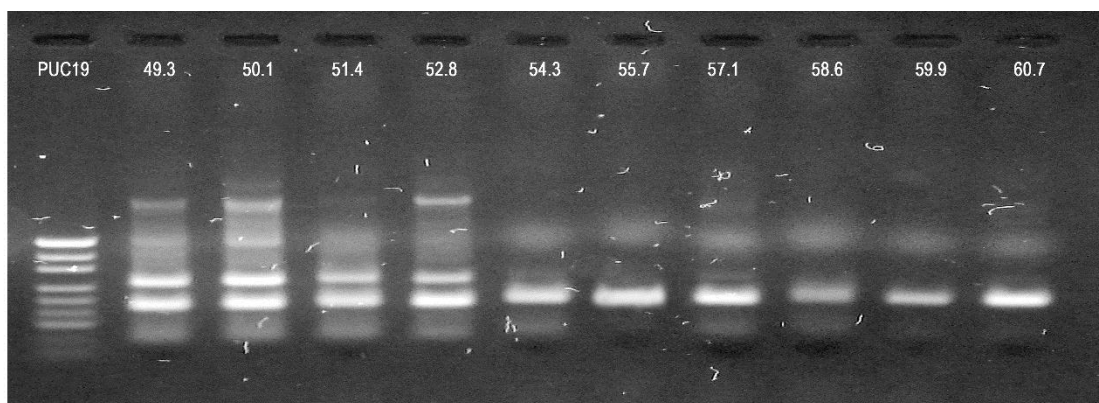
که در آن، Y_{ij} : عملکرد مورد نظر، μ : میانگین جمعیت، GH_j : اثر ثابت ژنوتیپ حاصله و e_{ij} : اثر تصادفی خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

به منظور تعیین بهترین دمای اتصال آغازگرها به ناحیه هدف از Gradient PCR استفاده گردید و محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲٪ با ۱۰۰ ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز گردید. نتایج حاصل از شیب حرارتی برای تعیین دمای اتصال آغازگرها (شکل ۱) نشان داد که دمای مناسب اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که با داشتن بیشترین میزان تکثیر ناحیه مورد نظر به طول ۱۶۲ جفت باز، هیچ‌گونه باند ناخواسته در این دما مشاهده نگردید.

زنجیره‌ای پلی‌مرز (بافر 1X PCR، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱ واحد Taq DNA Polymerase، ۷۵ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت. جهت تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۲ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد، از تکنیک SSCP استفاده گردید که پنج میکرولیتر از محصولات تکثیر شده با ۱۰ میکرولیتر بافر SSCP به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به سرعت بر روی یخ منتقل گردیدند. محصولات SSCP بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد به مدت ۱۶ ساعت و با ۷۵ ولت الکتروفورز شده و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند.

ارتباط ژنوتیپ‌های ژن هورمون رشد با وزن جوجه‌غاز با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۳ و در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل گردید:



شکل ۱- تکثیر قطعه ۱۶۲ جفت بازی از ژن هورمون رشد غاز با استفاده از شیب حرارتی

Figure 1- Amplification of 162 bp fragment of goose growth hormone gene using thermal gradient

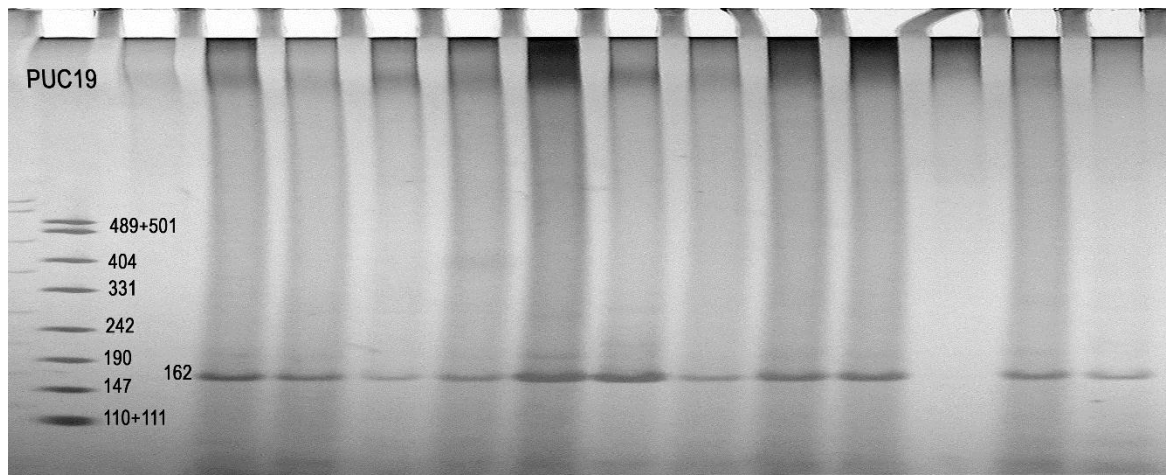
SSCP در نظر گرفته شد. فراوانی الگوهای ۱، ۲ و ۳ در این تحقیق به ترتیب ۴۸/۱۵، ۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد حاصل گردید. ژائو و همکاران (Zhao et al., 2011b) برای اولین بار ژن هورمون رشد غاز را به طور کامل کلون کردند که شامل تمام جهش‌های موجود در نواحی کدکننده و توالی اینترون آن بود که ۱۱ SNP با روش PCR-SSCP و توالی‌یابی شناسایی گردید. این نتایج نشان داد که فراوانی جهش در ژن هورمون رشد غاز نسبت به همولوگ آن در مرغ بیشتر بوده و عمدتاً بر پایه جهش‌های مترادف استوار گردیده است و نتیجه‌گیری کردند که ژن هورمون رشد به صورت خیلی محافظه‌کارانه‌ای از لحاظ فیلوژنتیکی محافظت می‌گردد، که این حالت حفاظت شده ژن هورمون رشد نشان می‌دهد که این ژن، از لحاظ عملکردی برای طیور بسیار مهم بوده و یک نقش کلیدی در رشد و تکامل طیور بازی می‌کند (Wong et al., 2004). ژائو و همکاران (Zhao et al., 2011b) چهار آلل را در اگزون ۲ ژن هورمون رشد غاز گزارش

با توجه به دقت و حساسیت بالای ژل پلی‌آکرلامید، جهت اطمینان از صحت تکثیر در هنگام کار با نمونه‌های اخذ شده غاز، تعدادی از محصولات تکثیر شده بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد به مدت ۱۶ ساعت و ۷۵ ولت الکتروفورز گردید که در شکل ۲ قابل رؤیت می‌باشد، همان‌گونه که مشاهده می‌گردد، تکثیر اگزون ۲ از ژن هورمون رشد غاز به درستی صورت گرفته است، چرا که از روی توالی موجود در سایت NCBI و آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق انتظار می‌رفت، قطعه ۱۶۲ جفت بازی تکثیر گردد.

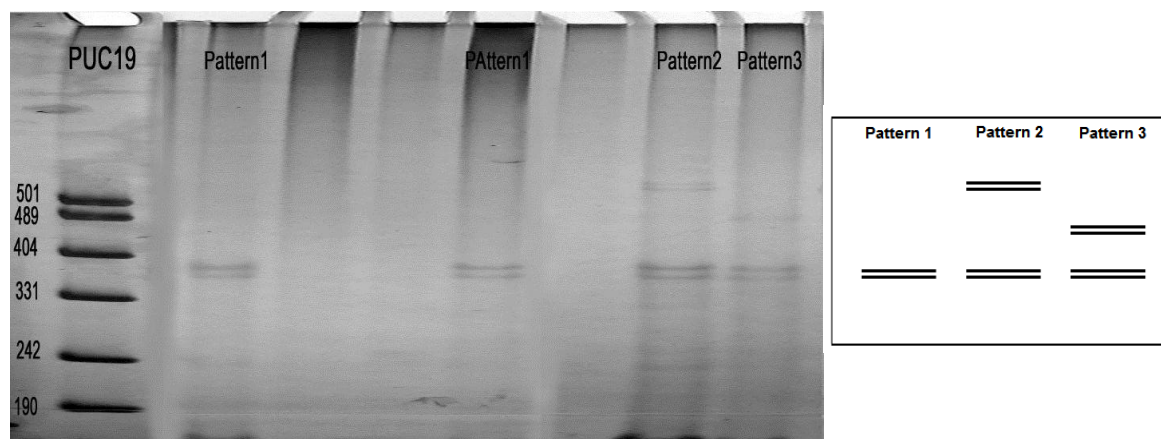
پس از تکثیر کلیه نمونه‌های مورد آزمایش، روش SSCP بر روی آن‌ها انجام گردید. شکل ۳ الکتروفورز محصولات حاصل از SSCP را بر روی ژل پلی‌آکرلامید ۱۰ درصد نشان می‌دهد که به مدت ۱۶ ساعت با ۷۵ ولت بارگذاری و با نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد، در این تحقیق سه الگوی باندی متفاوت به دست آمد که به عنوان ژنوتیپ‌های حاصل از تکنیک

مختلف صورت گرفته است، لذا کاهش تنوع ژنتیکی در این گله تحقیقاتی و در جایگاه‌های ژنی قابل تصور بوده و کاهش تعداد آلل‌ها و الگوهای ژنوتیپی دور از ذهن نمی‌باشد.

نمودند که دارای ۱۰ الگوی ژنوتیپی بودند و برای آگزون ۴ همین ژن دو آلل با چهار ژنوتیپ معرفی نمودند. با توجه به این که در طول سال های فعالیت ایستگاه تحقیقات غاز ملکان انتخاب غازها برای صفات



شکل ۲- محصولات تکثیر شده قطعه ۱۶۲ جفت بازی از ژن هورمون رشد غاز
Figure 2- Amplified products of 162 bp fragment of goose growth hormone gene



شکل ۳- الگوهای حاصل از SSCP برای ناحیه مورد نظر از ژن هورمون رشد غاز
Figure 3- Patterns resulting from SSCP for the target region of the goose growth hormone gene

سوم در گله مورد آزمایش می‌تواند تا ۴۰ درصد وزن زنده را در گله افزایش دهد. تحقیقات آئو و همکاران (Ao et al., 2006) ارتباط SNPهای موجود در غاز نژاد Rhine در ناحیه اینترون ۲ را با وزن بدن و صفات لاشه معنی‌دار نشان داد. فنگ و همکاران (Feng et al., 1997) گزارش کردند که نشانگر RFLP در ژن هورمون رشد مرغ با سن در اولین تخم‌گذاری و میزان تخم‌گذاری روزانه مرغ‌ها در ارتباط است. بررسی ارتباط بین چندشکلی موجود در ژن هورمون رشد غازها ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ارائه نموده بود (Zhao et al., 2011b). نتایج ارائه شده برای ماه دوم نشان می‌دهد که الگوی ژنوتیپی سوم دارای بیشترین مقدار وزن زنده می‌باشد

تجزیه واریانس با استفاده از الگوهای باندهای بدست آمده نشان داد که تأثیر ژنوتیپ بر وزن زنده در ماه‌های اول و دوم معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). در ماه اول پرورش الگوی ژنوتیپی ۱ کمترین وزن زنده را به خود اختصاص داده است که تفاوت معنی‌داری با دو ژنوتیپ دیگر نشان می‌دهد و الگوی باندهای ۳ دارای بیشترین وزن زنده می‌باشد که برای پرورش غاز مناسب می‌باشد (جدول ۱). با توجه به این که فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت در حداقل می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد، انتخاب غازهای بر اساس این نشانگر و افزایش میزان فراوانی این الگو می‌تواند معیاری برای وزن غازهای پرورش باشد. چرا که با توجه به نتایج بدست آمده در ماه اول، افزایش فراوانی الگوی

معنی‌دار بین الگوهای حاصل، الگوی بان‌دی ۳ دارای بیشترین وزن زنده می‌باشد که اختلاف وزن قابل قبولی نسبت به دو ژنوتیپ دیگر از خود نشان داده است. آنالیز واریانس با استفاده از داده‌های افزایش وزن هفتگی در نژادهای مختلف نشان داده است که نتایج بر اساس نژاد غازهای مورد بررسی متفاوت بوده است (Zhao *et al.*, 2011b). لذا، نتایج حاصل از مطالعات مختلف علی‌رغم داشتن جهت همسو و هماهنگ، می‌تواند اعداد متفاوت داشته و بر سطح معنی‌داری و یا غیر معنی‌داری مطالعه تأثیر داشته باشد.

($P \leq 0.05$) و همانند ماه اول پرورش با داشتن کمترین فراوانی می‌تواند در جهت اصلاح نژاد غاز برای وزن زنده مورد استفاده قرار گیرد، لذا انتخاب جوجه‌های تفریح شده در راستای این ژنوتیپ و افزایش فراوانی آن در جمعیت موجب افزایش وزن غازهای پرورشی خواهد بود.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، تأثیر ژنوتیپ‌های آگزون ۲ ژن هورمون رشد بر وزن زنده غازهای پرورش در ماه‌های سه، چهار و پنج معنی‌دار نشده است، ولی علی‌رغم آن، وجود اختلاف

جدول ۱- تأثیر ژنوتیپ‌های آگزون ۲ ژن هورمون رشد بر وزن زنده جوجه غاز (گرم)

Table 1- The effect of exon 2 genotypes of the growth hormone gene on live weight of goose chicks (g)

ژنوتیپ	تعداد	۳۰ روزگی	۶۰ روزگی	۹۰ روزگی	۱۲۰ روزگی	۱۵۰ روزگی
Genotype	Number	30 days	60 days	90 days	120 days	150 days
الگوی ۱ Pattern 1	117	745.09±54.95 ^b	1624.73±299.61 ^b	2477.97±288.96	3246.13±378.54	3321.17±398.89
الگوی ۲ Pattern 1	108	996.28±150.80 ^a	1688.94±206.26 ^b	2488.80±275.10	3260.32±360.38	3328.73±400.39
الگوی ۳ Pattern 1	18	1036.33±321.82 ^a	1810.78±265.37 ^a	2561.24±279.17	3355.23±365.72	3424.10±186.89
جمع کل Total	248	996.96±245.65	1742.75±249.55	2488.95±279.45	3360.52±366.09	3327.71±385.56
ارزش P P value		0.031	0.050	0.795	0.798	0.820

میانگین هر ستون با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

The average of each column with different letters has a significant difference at the 0.05 level.

توجه قرار گیرد. با این وجود، روش‌های دیگری نیز مانند سنجش ارتباط غلظت هورمون‌های تولیدمثلی با صفات وزن بدن به کار گرفته شده است که می‌تواند از طریق اندازه‌گیری قسمت‌های مختلف بدن (دور گردن، طول گردن، فاصله شرمگاهی و دور شکم) غازهای پر تولید ولانق^۱ را انتخاب نماید (Liu *et al.*, 2022).

طی بررسی‌های انجام‌یافته در سال‌های ۱۳۷۵ تا ۱۳۸۰ از طریق تکمیل پرسشنامه از نواحی و بخش‌ها، با توجه به آمار منتشره، پرورش غاز و استفاده از محصولات متنوع آن، پس از طیور و بوقلمون در جایگاه سوم ماکیان قرار داشته و توانسته است پای خود را به سبد غذایی مردم در نواحی خاص و به‌خصوص روستاهای کشور باز کند. با توجه به تقاضای روزافزون برای گوشت سفید غیر از گوشت مرغ در سال‌های اخیر و از طرفی دیگر، اصرار شدید برای مصرف فراورده‌های سالم غذایی و حتی محصولات ارگانیک که عاری از سموم، هورمون‌ها و بقایای آنتی‌بیوتیک‌هاست، انتظار می‌رود که در سال‌های آتی مصرف گوشت غاز با توجه به عدم نیاز این صنعت به آنتی‌بیوتیک به‌دلیل مقاومت بالای غاز به بیماری روند افزایشی طی نماید. لذا،

در مطالعه ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2014) ارتباط چندشکلی هورمون رشد با برخی صفات تولیدی گزارش گردید. در این مطالعه، چهار آل (آل D غالب بود) با ۱۰ ژنوتیپ برای آگزون دوم ژن هورمون رشد حاصل شده که نتیجه دو تغییر در موقعیت بازهای ۳۹ و ۷۴ بوده که هر دوی آن‌ها جایگزینی C به جای T بوده که در جایگاه ۳۹ جهش خاموش بدون تأثیر در تغییر اسیدآمینینه بوده و در جایگاه ۷۴ جایگزینی آلانین با والین در موقعیت اسیدآمینینه ۲۵ بیان گردید. همچنین در مطالعه اخیر، دو تغییر در ژن هورمون رشد غاز در جایگاه‌های C123T و C158T ارتباط معنی‌داری با صفات وزن بدن در غاز نشان دادند که ژنوتیپ‌های CT برای جایگاه ۱۲۳ و ژنوتیپ TT برای جایگاه ۱۵۸ برای صفات وزن بدن غاز مناسب می‌باشند (Abdel Moniem *et al.*, 2021). با توجه به تأثیر چندشکلی حاصل بر روی میزان رشد غازها در مطالعه حاضر، انتظار می‌رود که این چندشکلی بتواند بر توالی پروتئین هورمون رشد تأثیر داشته باشد، چرا که جهش‌های خاموش و بی‌معنی نمی‌توانند بر فعالیت بیولوژیکی موجودات تأثیر چندانی داشته باشند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن هورمون رشد و به‌خصوص آگزون ۲ این ژن می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی در انتخاب غازها برای صفت افزایش وزن مورد

۴۴/۴۴ و ۷/۴۱ درصد وجود دارد، که الگوی ژنوتیپی سوم با فراوانی ۷/۴۱ درصد تأثیر مثبتی بر روی وزن زنده غاز از خود نشان داده است. با توجه به این که ضریب اقتصادی تولید تخم در غاز از اهمیت زیادی برخوردار بوده و اهمیت بیشتری نسبت به افزایش وزن غازهای مولد به خود اختصاص داده است، به کارگیری شاخص انتخابی که بتواند وزن مناسبی به صفات تخم‌گذاری و افزایش وزن بدهد و انتخاب غازهای پرورشی و گوشتی در راستای این ژنوتیپ به‌منظور انتخاب و پرورش غازهای سنگین‌تر موجب تسریع در اصلاح نژاد غازهای بومی خواهد شد.

استفاده از پتانسیل‌های پرورشی بالای غاز نسبت به سایر ماکیان ایجاب می‌کند که در آینده پرورش غاز به‌صورت صنعتی مورد توجه قرار گیرد و برای حصول این امر استفاده از فناوری‌های نوین زیستی و اصلاح نژادی جایگاه ویژه‌ای را جهت هموار نمودن مسیر و کاهش زمان رسیدن به هدف ضروری است (Chang et al., 2012).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در ناحیه مورد نظر از آگزون ۲ ژن هورمون رشد غاز سه ژنوتیپ با فراوانی‌های ۴۸/۱۵،

References

1. Abdel Moniem, H., Yusuf, M. S., & Chen, G. (2021). Ecology and population structure of some indigenous geese breeds and the impact of four GH and Pit-1 SNPs on their body weights. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(28),37603-37615. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13402-x>
2. Ao, J. X., Li, H., Wang, Q. G., & Wang, Y. X. (2006). Polymorphism of intron 2 of growth hormone gene and its relationship with body weight and carcass traits in goose. *Chinese Journal of Animal Science*, 42,9-11.
3. Bailes, S. M., Devers, J. J., Kirby, J. D., & Rhoads, D. D. (2007). An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Science*, 86(1),102-106. <https://doi.org/10.1093/ps/86.1.102>
4. Chang, M. T., Cheng, Y. S., & Huang, M. C. (2012). The SNP genotypes of growth hormone gene associated with reproductive traits in Tsaiya ducks. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4),568-573. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01918.x>
5. Chang, M., Yang, K., Lin, C., Chen, C., Pan, C., Liou, J., & Rouvier, R. (2007). Investigation of differentially expressed transcripts in pituitary glands of post-laying brown Tsaiya ducks using cDNA microarray. *Journal of Chinese Society in Animal Science*, 36,94.
6. Chen, R., Guo, R. H., Lei, M. M., Zhu, H. X., Yan, L. Y., & Shi, Z. D. (2022). Research note: Development of a sandwich ELISA for determining plasma growth hormone concentrations in goose. *Poultry Science*, 101(3),101631. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101631>
7. Dong, B., Wang, J., Duan, X., Sun, G., Zhu, S., & Li, X. (2010). Polymorphism of the exons of growth hormone (GH) gene in goose. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 26(5),1020-1025.
8. Elyasi Zarringhabaie, G., Javanmard, A., & Pirahary, O. (2012). Random amplified polymorphic markers as indicator for genetic conservation program in iranian pheasant (*Phasianus colchicus*). *The Scientific World Journal*, Volume 2012, Article ID: 640381. <https://doi.org/10.1100/2012/640381>
9. Feng, X., Kuhnlein, U., Aggrey, S., Gavora, J., & Zadworny, D. (1997). Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. *Poultry Science*, 76(12),1770-1775. <https://doi.org/10.1093/ps/76.12.1770>
10. Ghelichi, R. (1998). Goose breeding Native Poultry and Other Poultry Department, Vice-Chancellor of Livestock Affairs, Ministry of Jihad and Agriculture. pp. 3-4. (In Persian)
11. Harvey, S., & Daughaday, W. (1995). Growth hormone release: profiles. *Growth Hormone*,193-223.
12. Hasani, A. R., Houshmand Shamsai, A., Afraz, F., Asadpour, M. R., & Sarhangi, Y. (2001). Investigating the distribution, breeding status and production and phenotypic characteristics of geese in the Azarbaijan region. The final report of East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center. (In Persian)
13. Jeay, S., Sonenshein, G. E., Postel-Vinay, M. C., Kelly, P. A., & Baixeras, E. (2002). Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: New insights into signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188,1-7. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00014-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00014-X)
14. Kansaku, N., Soma, A., Furukawa, S., Hiyama, G., Okabayashii, H., Gue'mene, D., Kuhnlein, U., & Zadworny, D. (2008). Sequence of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) growth hormone-encoding gene and genetic variation in the promoter region. *Animal Science Journal*, 79,163-170. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00513.x>
15. Kato, Y., Murakami, Y., Sohmiya, M., & Nishiki, M. (2002). Regulation of human growth hormone secretion and its disorders. *Internal Medicine*, 41(1),7-13. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.7>
16. Liu, J., Zhang, D., Zhang, Z., Chai, W., Zhang, J., Li, M., & Zhu, M. (2022). Comparison of body size and reproductive hormones in high-and low-yielding Wulong geese. *Poultry Science*, 101(3),101618.

- <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101618>
17. Ma, Q., Liu, S., Zhuang, Z., Lin, L., Sun, Z., Liu, C., & Tang, Q. (2012). Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Gene*, 493(1),92-104. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.11.015>
 18. Millar, D. S., Horan, M., Chuzhanova, N. A., & Cooper, D. N. (2010). Characterization of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GHI) gene. *Human Genomics*, 4(5),289. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-5-289>
 19. Moller, N., & Norrelund, H. (2003). The role of growth hormone in the regulation of protein metabolism with particular reference to conditions of fasting. *Hormone Research*, 59 (Suppl 1),62-68. <https://doi.org/10.1159/000067827>
 20. Mou, L., Liu, N., Zadworny, D., Chalifour, L., & Kuhnlein, U. (1995). Presence of an additional PstI fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. *Gene*, 160(2),313-314. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)96895-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)96895-8)
 21. Nachman, M. W. (2001). Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. *Trends in Genetics*, 17,481-485. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02409-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02409-X)
 22. Qiao, N., Chen, Q., Cheng, J. H., & Xu, Q. (2011). Comparative genomic analysis of growth hormone gene in geese. *Animal Science Journal*, 82(1),62-66. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00812.x>
 23. Sarhangi, Y., Nazeradl, K., Lotfolahian, H., Kamali, M. A., Hasani, A. R., & Asadpour, M. R. (2001). Investigating the effect of different levels of protein and energy on the efficiency of meat production in native geese of Azerbaijan. The final report of East Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center. (In Persian)
 24. Wong, G. K., Liu, B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., Zhang, Z., Meng, Q., Zhou, J., Li, D., & Zhang, J. (2004). International Chicken Polymorphism Map Consortium: A genetic variation map for chicken with 2. 8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature* 432, 717-722. <https://doi.org/10.1038/nature03156>
 25. Yang, F. P., Chen, Y. Q., Li, S. P., Li, Q. S., & Wang, J. Y. (2007). Study on the single nucleotide polymorphism of Myostatin gene's coding region in three domestic goose. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 28,29-32.
 26. Zhan, K., & Yang, N. (2005). Effects of polymorphism in the coding region of GH gene on serum GH, T3 levels and body weight of ducks. Paper presented at the *Proceedings of the 3rd World Waterfowl Conference*, Guangzhou, China.
 27. Zhang, Y., Zhu, Z., Xu, Q., & Chen, G. (2014). Association of polymorphisms of exon 2 of the growth hormone gene with production performance in huoyan goose. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1),670-683. <https://doi.org/10.3390/ijms15010670>
 28. Zhao, W. M., Qiao, N., Wang, X. B., Chen, Q., Cheng, J. H., Xu, Q., & Chen, G. H. (2011a). Comparative genomic analysis of growth hormone gene in geese. *Animal Science Journal*, 82,62-66. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00812.x>
 29. Zhao, W. M., Zaoe, R. X., Qiao, N., Xu, Q., Huang, Z. Y., Li, X., Zhang, Y., & Chen, G. H. (2011b). Association of GH polymorphisms with growth traits in goose. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(6),692-697.



Research Article

Vol. 15, No.4, 2023, p. 557-569

Meta-Analysis of RNA-Seq and Microarray Expression Data to Identify Genes Effective in Sheep Muscle Growth and Development

Fahime Mohammadi¹, Mojtaba Tahmoorespur^{2*}, Ali Javadmanesh³

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

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

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

*Corresponding Author's Email: tahmoores@um.ac.ir

Received: 04-12-2022
Revised: 29-01-2023
Accepted: 05-02-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Mohammadi, F., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2023). Meta-analysis of RNA-Seq and microarray expression data to identify genes effective in sheep muscle growth and development. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 557-569. (in Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79909.1111>

Introduction: Among different sheep breeds in the world, the Texel breed is known as a meaty and muscular breed. Skeletal muscle growth is a step-by-step and exponential process from differentiation, development and maturation, which is regulated by gene networks and cell signaling pathways, and several genes and factors are involved in the process of muscle fiber formation and their growth and hypertrophy (Badday Betti *et al.* 2022). The study of gene expression is done with several methods, and this gene expression information is used in breeding programs as a tool to improve phenotypic choices. Databases are a large source of expression data that can be used by bioinformatics methods to integrate heterogeneous data from different studies and platforms. In this study, by integrating the microarray and RNA-Seq data available in the database belonging to the muscle tissue of Texel breed sheep, the transcriptomic profile of the muscle was compared at two ages of embryonic and adult.

Materials and Methods: Microarray data related to longissimus dorsi muscle tissue with three replicates d-70 embryos from GEO database with accession number GSE23563 and RNA-Seq data related to muscle tissue from six samples with two replicates from adult individuals from ArrayExpress database were selected. Limma, Biobase and GEOquery software packages were used to calculate the expression values of the microarray data related to the embryonic age in the R environment, and Tuxedo, HTSeq and DESeq2 packages were used in the Linux and R environment to calculate the expression values of the RNA-Seq data (Kamali *et al.* 2022; Sahraei *et al.* 2019). Then two types of expression values were integrated and to eliminate non-biological effects, the batch effects were also removed. Next, differential genes were identified with the limma software package. In order to identify the relationship between the identified differential genes, the gene network was drawn between them by software of Cytoscape version 3.7.1 and String 1.5.1 program. Next, due to the vastness of the gene network, each network was clustered with MCODE 1.6.1 and CytoCluster 2.1.0 programs (ClusterOne algorithm) and significant clusters (P-value < 0.05) were identified (Saedi *et al.* 2022). In order to better understand the ontology and function of the identified differential genes, the Gene Ontology of the genes was investigated using software of Cytoscape version 3.7.1 and ClueGO 2.5.9 and CluePedia 1.5.9 programs. After receiving the Gene Ontology results, significant Gene Ontology terms (P-Value < 0.05) related to functional groups were identified. Finally, the selected genes (Adj P-Value < 0.05) were identified and introduced in these two age groups.

Results and Discussion: After quality control, correcting and normalizing the microarray data, the GPL10778 platform annotation file with 1042520 Probe ID was used to calculate their expression values. After relevant analyzes of 9289 Probe ID identified related to the data of this study, 7918 Gene Symbol was identified



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2023.79909.1111>

finally. After quality control, trimming and normalizing the RNA-Seq data in total, the number of Ensembl_Genes based on which the reading values were calculated by HTSeq was 27056. After removing IDs that had zero readings in all 6 samples, 10855 IDs remained. Then, these 10855 Ensembl ID were merged with the annotation file to obtain Gene Symbol, and finally 9417 common genes were identified between the six samples of adult age. The results of differential expression analysis showed that there were significant differences in the expression of 62 genes (37 increased and 25 decreased) in the muscle tissue between adult and embryonic age. By creating a gene network between differential genes, 15 selected genes were identified, including MYH1, ACTN3, CASQ1, TMOD4, FBP2, SLC2A4, MX1, COX4I1, SOD2, MFN2, UQCRB, UCP3, PRKAB2, PHKG2, PPP1R3C. The function of these genes has been proven in cell proliferation, protein synthesis, myofibril formation, and lipid metabolism. Differential gene enrichment analysis revealed some biological processes such as Vasculogenesis, positive regulation of ossification, positive regulation of muscle tissue development, regulation of muscle contraction, contractile fiber part, calcium signaling, calcineurin-NFAT signaling cascade and regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT, the molecular function of regulating cation channel activity and the cellular components of the contractile fiber.

Conclusion: This study in addition to confirming the accuracy of the integration method of two types of heterogeneous data, provided a general view of the transcriptomic differences of Texel sheep muscle tissue at two important age points to be a useful source for biological investigations of genes related to muscle growth and development in sheep.

Keywords: Data Integration, Differential Gene Expression, Gene Network, Gene Ontology

فرا تحلیل داده‌های بیانی RNA-Seq و Microarray برای شناسایی ژن‌های مؤثر در رشد و نمو عضله گوسفند

فهیمه محمدی^۱، مجتبی طهمورث پور^{۲*}، علی جوادمنش^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

امروزه می‌توان با روش‌های بیوانفورماتیکی داده‌های حاصل از مطالعات و پلتفرم‌های مختلف را ادغام و از آن‌ها بهره برد. در این مطالعه، با ادغام داده‌های ریزآرایه و RNA-Seq بافت عضله گوسفند نژاد تکسل موجود در پایگاه داده به مقایسه پروفایل ترنسکرپتومی عضله در دو مقطع سنی جنینی و بلوغ پرداخته شد. برای محاسبه مقادیر بیانی عضله ریزآرایه مربوط به دوران جنینی از بسته‌های نرم‌افزاری Limma، Biobase و GEOquery در محیط R و برای محاسبه مقادیر بیانی عضله RNA-Seq از پروتکل Tuxedo و بسته نرم‌افزاری HTSeq در محیط لینوکس و بسته نرم‌افزاری DESeq2 در محیط R استفاده شد. سپس دو نوع مقادیر بیانی ادغام شدند. نتایج نشان داد، در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش و ۲۵ ژن کاهش بیان) اختلاف معناداری داشتند. با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی، ۱۵ ژن منتخب MYH1، ACTN3، CASQ1، TMOD4، FBP2، SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB، UCP3، PRKAB2، PHKG2، PPP1R3C، شناسایی شدند. عملکرد این ژن‌ها در تکثیر سلولی، تشکیل میوفیبریل‌ها و متابولیسم‌های چربی‌زایی ثابت شده‌است. آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی نقش برخی از این ژن‌ها مثل ACTN3 و CASQ1 را در فرآیندهای زیستی مثل توسعه سلول عضلانی مخطط، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و JAK-STAT آشکار کرد. این مطالعه علاوه بر تأیید روش ادغامی داده‌های ناهمگن، دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکرپتومی بافت عضله گوسفند تکسل در دو مقطع مهم سنی را فراهم آورد تا ژن‌های منتخب معرفی شده منبع مفیدی برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد و نمو عضله باشد.

واژه‌های کلیدی: ادغام داده‌های ناهمگن، بیان افتراقی ژن‌ها، شبکه ژنی، هستی‌شناسی ژن‌ها

مقدمه

ثانویه است. میوزن اولیه در مرحله رویانی و میوزن ثانویه در مرحله جنینی رخ می‌دهد و موجب تشکیل فیبرهای عضلانی ثانویه می‌شود. بنابراین، دورانی که میوزن ثانویه در حال انجام است، برای رشد عضلات اسکلتی حیاتی است (Yan et al., 2013). بیش از سه موج میوزن ثانویه قبل از تولد در گوسفند ظاهر می‌شود و اکثر میوفیبریل‌ها بعد از ۶۰ روزگی آبه‌سنتی تشکیل می‌شوند (Rashidian et al., 2020). رشد بافت‌های عضلانی بعد از تولد نیز فقط توسط هایپرتروفی رخ می‌دهد و شامل تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای، تمایز و تجزیه و بازسازی پروتئین‌ها است (Sadkowski et al., 2006). امروزه از اطلاعات بیان ژن در برنامه‌های اصلاح‌نژادی به‌عنوان ابزاری برای بهبود انتخاب‌های فنوتیپی استفاده می‌شود. تا کنون چندین گزارش از بررسی ترنسکرپتوم بافت عضله در گوسفند ثبت شده است

تشکیل میوفیبریل‌های عضله، طی فرآیندی به‌نام میوزن صورت می‌گیرد و در گونه‌هایی مانند گوسفند، حداکثر تشکیل میوفیبریل عضله در دوران جنینی است. میوزن قبل از تولد شامل میوزن اولیه و

۱- دانش آموخته‌ی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

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

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

(Email: tahmoores@um.ac.ir)

*- نویسنده مسئول:

لانژیسیموس دورسی با سه تکرار در دوران ۷۰ روزگی جنینی از پایگاه GEO با شماره دسترسی GSE23563 به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE23563> انتخاب شد. بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال‌سازی و محاسبه مقادیر بیانی ژن‌ها همگی در محیط R4.2.1 و توسط بسته نرم‌افزاری Biobase Limma، GEOquery انجام شد. داده‌های RNA-Seq مربوط به بافت عضله از شش نمونه با دو تکرار مربوط به دوران بلوغ از پایگاه ArrayExpress به آدرس <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-RNA-3838/samples/> انتخاب شدند. آنالیز داده‌های Seq در محیط لینوکس اوبنتو انجام شد. بررسی کیفیت داده‌های RNASeq با نرم‌افزار fastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) انجام شد. سپس برای پیرایش و فیلتر خوانش‌های نامطلوب از نرم‌افزار Trimmomatic-0.36 (<http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic/Trimmomatic-0.36.zip>) استفاده شد. دستور پیرایش بر اساس حذف خوانش‌های با نمره کمتر از 33 phred، حذف یک باز را از ابتدای خوانش، حذف خوانش‌هایی با طول کمتر از 36 باز، شناسایی آلودگی آداپتوری با دو باز غیر منطبق بود. برای نقشه‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم و ترنسکرپتوم مرجع گوسفند (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-104/assembly/han_sheep/han_sheep_ensembl.fasta.gz) از نرم‌افزار HISAT2 2.2.0 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) استفاده شد. با توجه به اینکه نرم‌افزار HISAT2 ژنوم مرجع ایندکس شده را به‌عنوان ورودی می‌پذیرد، بدین منظور از نرم‌افزار Bowtie2 (<http://bowtiebio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) استفاده شد. فرمت فایل خروجی hisat2، sam است و چون برای ادامه مراحل فرمت به‌صورت bam موردنیاز است، از نرم‌افزار samtools-1.9 (<https://sourceforge.net/projects/samtools/files/samtools/>) استفاده شد. در ادامه برای محاسبه مقادیر خوانش‌های نقشه‌یابی شده در هر ناحیه از نرم‌افزار HTSeq-0.6.1 (<https://pypi.org/project/HTSeq/>) استفاده شد. برای نرمال‌سازی داده‌ها و محاسبه مقادیر بیانی داده‌های RNASeq نیز از بسته DESeq2 استفاده شد. جهت ادغام دو نوع مقادیر بیانی حاصل از داده‌های ریزآرایه و RNASeq، ابتدا دو مجموعه داده فراخوانی و در نهایت، هر دو مجموعه با هم ادغام شد. در ادامه، جهت حذف اثرات غیر بیولوژیکی، اثرات دسته‌ای هم حذف و ژن‌های افتراقی محاسبه شدند. جهت شناسایی ارتباط بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده، شبکه ژنی بین آن‌ها توسط نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و

(Mohammadi et al., 2019; Betti et al., 2022). در سال ۲۰۱۳ ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2013) روش RNA-Seq را برای تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ترنسکرپتوم عضله یک ماده ۱۱ ماهه در دو نژاد دورپر^۱ و دنبه کوچک هان^۲ به‌کار بردند. در نهایت، ۱۳۰۰ ژن به‌طور معنی‌داری تفاوت بیان نشان دادند. همچنین پروفایل ترنسکرپتوم بافت عضله از سه ماده یک‌ساله در دو نژاد مریخی گوشتی چین‌خوا^۳ و دنبه کوچک هان هم توسط سون و همکارانش (Sun et al., 2016) مورد مطالعه قرار گرفت که در نهایت، ۹۶۰ ژن تفاوت بیان معنی‌داری نشان دادند. نتایج نشان داد که برخی از ژن‌های افتراقی شناسایی شده از جمله MRFs، GXP1 و STAC3، نقش مهمی در روند رشد و تکامل عضلات بازی می‌کنند. مقایسه ترنسکرپتوم بافت عضله اسکلتی در دوران قبل از تولد در دو نژاد گوسفند دورست و دنبه کوچک هان توسط لیو و همکاران (Liu et al., 2015) انجام شد. در این مطالعه، با روش ریزآرایه از بافت عضله در سنین ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روزگی جنینی نمونه‌برداری شد و بعد از آنالیزهای مربوطه به‌ترتیب ۸۸، ۱۲۸ و ۳۴۰ ژن بین دو نژاد شناسایی شد. در ادامه با تولید و انباشت مجموعه زیادی از داده‌ها، متآنالیز برای ترکیب چندین مطالعه برای افزایش قدرت آماری محبوبیت زیادی پیدا کرد (Bakhshalizadeh et al., 2021; Zerehdaran et al., 2020). تا جایی که در سال ۲۰۱۷ چندین مطالعه در زمینه ادغام داده‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNA-Seq (Ma et al., 2017) و (Jung et al., 2017)) منتشر شد که نتایج این مطالعات حاکی از صحت بالای روش ادغامی و بهبود دقت و قدرت نتایج بود. ادغام روش‌های مختلف با در نظر گرفتن اصول صحیح آنالیز، کمک شایان توجهی نیز به افزایش تعداد نمونه‌های مطالعه می‌کند که خود ممکن است، باعث افزایش صحت نتایج می‌شود. از آنجایی که بررسی پروفایل ترنسکرپتومی بافت عضله طی مراحل جنینی تا بعد از تولد و بلوغ توسط فن‌آوری‌هایی مثل ریزآرایه و RNA-seq، بررسی جامع-تری از ژن‌ها، عوامل تنظیم‌کننده‌ای که بر رشد عضلات مؤثرند را ارائه خواهد داد، هدف مطالعه حاضر تهیه تصویر جامعی از مراحل کلیدی رشد و نمو گوسفند نژاد تکسل به‌عنوان یک گوسفند گوشتی با فنوتیپ عضلانی است. همچنین، دانش بهتر از معماری مولکولی و ژنتیکی بافت عضله، ممکن است منجر به ایجاد فرصت‌های جدیدی در زمینه اصلاح نژاد برای پرورش گوسفند گوشتی شود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از دو مجموعه عضله ریزآرایه و RNA-Seq در نژاد تکسل استفاده شد. داده‌های ریزآرایه مربوط به بافت عضله

- 1- Dorper
- 2- Small-tailed han sheep
- 3- Qianhua

جدول‌های ۲ و ۳ به ترتیب ژن‌های با افزایش و کاهش بیان در این مقطع سنی را نشان می‌دهد.

بعد از رسم شبکه تعاملی بین ژن‌های افتراقی شناسایی شده با نرم‌افزار Cytoscape و برنامه STRING، خوشه‌های ژنی معنی‌دار با افزونه CytoCluster و عبارات هستی‌شناسی و مسیرهای معنی‌دار آن‌ها با افزونه‌های ClueGO و CluePedia شناسایی شدند. از میان ۶۲ ژن افتراقی شناسایی شده، بین دو مقطع ۷۰ روزگی جنینی و بلوغ، در نهایت، شبکه تعامل ژنی میان ۴۷ ژن رسم شد (شکل ۳). در ادامه، سه خوشه ژنی معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) نیز شناسایی شد که هر خوشه به همراه مقدار $P\text{-value}$ آن روی هر شبکه مشخص شده است.

اولین خوشه معنی‌دار با $P\text{-value} = 0.004$ بر روی شبکه ژنی نشان داده شده است. این خوشه با پنج گره شامل ژن‌های CASQ1، ACTN3، TMOD4 و MYH1 و FBP2 است که همگی دارای بیان بالا (UP) بوده‌اند. ژن‌های این خوشه به نحوی در انقباض و هایپرتروفی عضلات نقش دارند و افزایش بیان این ژن‌ها در عضله در زمان بلوغ نسب به دوران جنینی امری طبیعی است. ژن MYH1 که بیشتر در فیبرهای عضله نوع تند (سریع) بیان می‌شود و در عضله مخطط وجود دارد، یک پروتئین انقباضی عمده است که از طریق هیدرولیز ATP انرژی شیمیایی را به انرژی مکانیکی تبدیل می‌کند. (Weiss et al., 1999). کالسوکتسترین که توسط ژن CASQ1 کدگذاری می‌شود، یک پروتئین متصل به کلسیم است که به‌عنوان یک بافر کلسیم در شبکه سارکوپلاسمی عمل می‌کند. (Terentyev et al., 2003). آلفا اکتینین پروتئینی است که توسط ژن ACTN3 رمزگذاری می‌شود و در صفحات Z و اجسام متراکم قرار دارد و به لنگر انداختن رشته‌های اکتین میوفیبریلار کمک می‌کند (Beggs et al., 1992). میوزین-۱ پروتئینی است که توسط ژن MYOZ1 کدگذاری می‌شود و به‌عنوان پروتئین‌های اتصال‌دهنده داخل سلولی در ارتباط با پروتئین‌های صفحات Z خدمت می‌کنند. همچنین این پروتئین ممکن است در میوفیبریلوژن نقش داشته باشد (Takada et al., 2001). ژن TMOD4 پروتئین تروپومودولین ۴ (عضله) را رمزگذاری می‌کند و انتهای نوک رشته‌های اکتین را می‌پوشاند و یک چارچوب ساختاری برای سفت و سخت نگه داشتن رشته‌های اکتین فراهم می‌کند. (Almenar-Queralt et al., 1999). ژن FBP2 هم که پروتئین فروکتوز بیس فسفاتاز ۲ را کدگذاری می‌کند، یک آنزیم تنظیم‌کننده گلوکوئوژن است که هیدرولیز فروکتوز ۱،۶-بیس فسفات را به فروکتوز ۶-فسفات و فسفات معدنی کاتالیز می‌کند (Rakus et al., 2005).

دومین خوشه معنی‌دار با $P\text{-value} = 0.018$ بر روی شبکه ژنی مشخص شده است. این خوشه با هفت گره شامل ژن‌های SLC2A4، MX1، COX4I1، SOD2، MFN2، UQCRB و UCP3 است که

برنامه STRING 1.5.1 رسم شد. سپس به دلیل وسیع بودن شبکه ژنی، خوشه‌بندی هر شبکه با افزونه‌های MCODE 1.6.1 و CytoCluster 2.1.0 (الگوریتم ClusterOne) صورت گرفت و خوشه‌های معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) شناسایی شد. جهت بررسی و درک بهتر ماهیت و عملکرد ژن‌های افتراقی شناسایی شده، هستی‌شناسی^۱ ژن‌ها به وسیله نرم‌افزار Cytoscape نسخه 3.7.1 و افزونه‌های ClueGO 2.5.9 و CluePedia 1.5.9 بررسی شد. بدین منظور، ژن‌های افتراقی شناسایی شده به افزونه ClueGO معرفی شد و بعد از دریافت نتایج هستی‌شناسی، عبارات هستی‌شناسی معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) مرتبط با گروه‌های کارکردی شناسایی شد. در نهایت نیز ژن‌های منتخب ($Adj\ P\text{-value} < 0.05$) در این دو مقطع سنی شناسایی و معرفی شد.

نتایج و بحث

بعد از بررسی کیفیت، تصحیح، نرمال‌سازی و محاسبه مقادیر بیانی داده‌های ریزآرایه با استفاده از فایل حاشیه‌نویسی پلت‌فرم GPL10778، در نهایت ۷۹۱۸ ژن شناسایی شد. همچنین بررسی کیفیت داده‌های RNA-Seq مشخص کرد که کیفیت همه خوانش‌های حاصل از توالی‌یابی تا حدود بسیاری مناسب بود و متوسط کیفیت بازهای خوانده‌شده بالای ۲۵ (احتمال وجود یک باز اشتباه در هر سه خوانش ۱۰۰ بازی) بود. در جدول ۱، اطلاعات آماری خوانش‌ها قبل و بعد از آنالیز برای نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش گزارش شده است.

تعداد ژن‌هایی که بر مبنای آن‌ها مقادیر خوانش‌ها توسط HTSeq محاسبه شد، ۲۷۰۵۶ بود. بعد از حذف شناسه‌های ژنی که دارای مقدار خوانش صفر در هر شش نمونه بودند، ۱۰۸۵۵ آیدی باقی ماند. سپس این Ensembl ID ۱۰۸۵۵ با فایل حاشیه‌نویسی جهت به‌دست آوردن علامت اختصاری ژن ادغام شدند که در نهایت، ۹۴۱۷ ژن مشترک بین شش نمونه مقطع بلوغ شناسایی شد. در ادامه، بعد از اینکه برای محاسبه بیان افتراقی ژن‌ها، هر دو نوع مقادیر بیانی داده‌های ریزآرایه و RNASeq حاصل از مراحل قبلی با یکدیگر ادغام شدند، اثرات دسته نیز که به دلیل متفاوت بودن تکنیک تولید دو نوع داده وجود داشت، حذف و نمودار آن‌ها رسم شد. شکل ۱، نمودار جعبه ای داده‌های ادغام شده و شکل ۲، نمودار PCA داده‌های ادغام شده را نشان می‌دهد.

در مجموع، بین مقطع جنینی و بلوغ، ۶۲ ژن افتراقی ($FDR < 0.05$) شناسایی شد که از این میان، ۳۷ ژن افزایش بیان ($\logFC > 1$) و ۲۵ ژن کاهش بیان ($\logFC < -1$) داشتند.

شود رمزگذاری می‌کند. GLUT4 یک حمل‌کننده گلوکز وابسته به انسولین است که در بافت چربی و عضلات مخطط (ماهیچه اسکلتی و ماهیچه قلب) وجود دارد. این پروتئین، انتشار حامل گلوکز را از خلال غشای سلول پستانداران تسهیل می‌کند و اجازه انتشار آسان گلوکز در گردش را در شیب غلظت آن در سلول‌های ماهیچه و چربی می‌دهد (Huang and Czech, 2007).

همگی دارای بیان بالا (UP) بوده‌اند. ژن SLC2A4 از این خوشه به‌عنوان ژن‌های افتراقی در مقایسه ترنسکرپتوم بافت عضله بین دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده‌است (Sun et al., 2016). این ژن، پروتئین ناقل گلوکز نوع ۴ (GLUT-4) را که جزو خانواده حامل‌های تسهیل‌شده گلوکز هم شناخته می‌

جدول ۱- اطلاعات آماری خوانش‌ها (نقشه‌یابی شده بر روی ژنوم مرجع و محاسبه شده توسط HTSeq)

Table 1- Statistical information of the reads (mapped on the reference genome and calculated by HTSeq)

نمونه‌ها Samples	مجموع توالی داده‌های خام Total seq. of raw data	درصد GC GC%	مجموع توالی داده‌های پیرایش شده Total seq. of trimmed data	نرخ هم‌ردیفی کلی Overall alignment rate%	تعداد ژن Ensembl Gene	خوانش کل Total counts
A ¹ -F ² -1	19697023	46 & 46	15023092	94.04	5882	113446
A-F-2	19792913	46 & 46	10350142	94.22	4981	78175
A-M ³ -3	9016506	46 & 46	7220274	91.87	3937	63936
A-M-4	5771315	45 & 45	4633682	89.71	3077	39784
A-M-5	9285314	46 & 46	7445816	91.85	3968	65933
A-M-6	5852296	45 & 45	4703164	89.99	3061	39651

شش نمونه از 1 تا 6 نامگذاری شده‌اند.

¹ بالغ

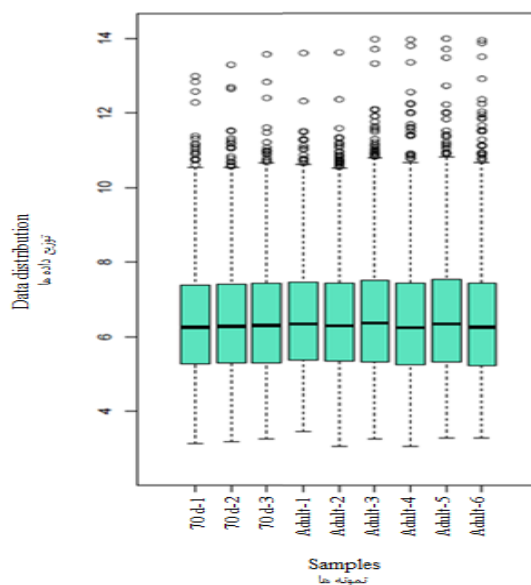
² ماده

³ نر

¹ Adult

² Female

³ Male



شکل ۱- نمودار جعبه‌ای پراکنش مقدار بیان ژن‌های حاصل از روش ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته

Figure 1- Boxplot of the distribution of gene expression values obtained from microarray and RNASeq methods after integration and removing batch effect

نواحی سبز رنگ شامل چارک اول، چارک میانی و چارک سوم است.

The green areas include the first quartile, the middle quartile, and the third quartile.

جدول ۲- ژن‌های با افزایش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Table 2- Genes with increased expression between adult and 70 days of embryonic age

نماد ژن Gene symbol	لگاریتم تغییر بیان logFC	بیان متوسط AveExpr	آزمون T- T-test	مقادیر P- P-value	مقادیر P-تنظیم شده Adj.P-val	بونفرونی Bonferroni
FBP2	3.034244	7.453365	5.539103	8.48E-06	0.001991	3.670732
PPP1R3C	2.823403	10.138	3.91733	0.000589	0.024217	-0.32517
HSD11B1	2.782934	6.12764	6.866368	2.92E-07	0.000161	6.835957
MYH1	2.260161	11.59883	8.366309	8.3E-09	1.36E-05	10.13162
ACTN3	2.178041	8.273333	4.354317	0.000189	0.012926	0.744079
SLC2A4	2.054425	7.460889	5.582893	7.57E-06	0.001914	3.777934
KLF9	1.963932	5.503618	7.091172	1.68E-07	0.00015	7.350841
COX4I1	1.927319	9.562411	5.445294	1.08E-05	0.002093	3.440628
FGL2	1.924955	6.438032	5.259021	1.76E-05	0.002754	2.982131
TMOD4	1.863128	8.802091	4.765696	6.41E-05	0.006388	1.761543
MX1	1.846713	6.704768	3.995615	0.000481	0.021306	-0.13506
MBP	1.795783	7.179845	4.716971	7.29E-05	0.007046	1.640821
UQCRB	1.719672	9.54251	5.127208	2.48E-05	0.003055	2.656649
PLN	1.705074	7.953816	3.671922	0.001108	0.036073	-0.91539
CAV1	1.674279	6.466443	4.671898	8.2E-05	0.007491	1.529168
ALDH1A1	1.581084	6.428051	5.793099	4.4E-06	0.001204	4.290455
NOSTRIN	1.453875	5.335228	6.130006	1.85E-06	0.000554	5.10352
AASS	1.40669	5.367752	5.088528	2.75E-05	0.003227	2.561013
UCP3	1.391164	4.897552	3.749894	0.000908	0.032785	-0.72891
CTSL1	1.378055	7.631864	4.188295	0.000291	0.016767	0.335773
NFAT5	1.320186	7.125953	4.058485	0.000409	0.019385	0.018143
AFF1	1.30939	6.417712	5.037472	3.14E-05	0.003562	2.434704
SOD2	1.278101	6.632185	4.075197	0.000391	0.019196	0.058941
C1orf21	1.276609	6.198659	3.73043	0.000954	0.033723	-0.77556
AMOT	1.274326	7.106552	3.860116	0.000683	0.027392	-0.4636
CASQ1	1.269251	8.953483	3.686058	0.001069	0.036073	-0.88166
PECAM1	1.26162	8.528891	3.988622	0.00049	0.021306	-0.15208
NAMPT	1.252677	6.575231	3.677914	0.001092	0.036073	-0.9011
CA2	1.24611	5.798616	4.286247	0.000226	0.014539	0.576431
VEGFA	1.216136	6.898503	4.331761	0.0002	0.013164	0.688492
PRKCZ	1.18494	5.038701	4.110057	0.000357	0.018944	0.144137
MTUS1	1.127114	6.009025	3.852893	0.000696	0.027571	-0.48104
PTPN14	1.085529	7.391925	3.59518	0.001348	0.040657	-1.09786
YBU	1.081182	5.567166	3.733414	0.000947	0.033723	-0.76841
AKAP7	1.076681	5.927487	5.367946	1.32E-05	0.002351	3.25048
MFN2	1.026356	7.883619	3.803323	0.000791	0.030185	-0.60054
PRKAB2	1.004612	6.775296	3.674774	0.0011	0.036073	-0.90859

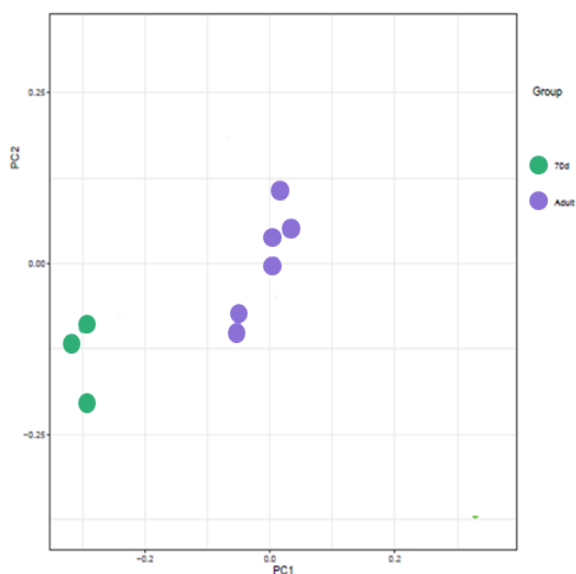
سوپراکسید فسفوریلاسیون اکسیداتیو متصل شده و آن‌ها را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن دیاتومیک تبدیل می‌کند. این عملکرد به SOD2 اجازه می‌دهد تا محافظت در برابر مرگ سلولی را به همراه داشته باشد (Zelko et al., 2002). میتوفوزین ۲- پروتئینی است که توسط ژن MFN2 کدگذاری می‌شود. میتوفوزین‌ها GTPase‌هایی هستند که در غشای خارجی میتوکندری جاسازی شده‌اند. در پستانداران MFN1 و MFN2 برای هم‌جوشی میتوکندری ضروری است (Filadi et al., 2018). پروتئین متصل به Ubiquinol cytochrome c ردونکاز که به‌عنوان UQCRB هم شناخته می‌شود، جزئی از زنجیره تنفسی میتوکندری است و به‌عنوان مجموعه‌ای از ubiquinone و QP-C نقش مهمی در انتقال الکترون دارد (Jung et al., 2011). پروتئین جفت نشده شماره ۳ میتوکندریایی پروتئینی

پروتئین‌های Mx، GTPase‌های نشانگر القای اینترفرون هستند که در طیف وسیعی از سلول‌ها مانند ماکروفاژ و سلول‌های کبدی بیان شده و در تنظیم سامانه ایمنی در سلول نقش دارند (Horisberger, 1992). ایزوفریم زیر واحد ۴ سیتوکروم c اکسیداز میتوکندریایی، آنزیمی است که توسط ژن COX4I1 رمزگذاری می‌شود. سیتوکروم c اکسیداز (کمپلکس IV) یک مجموعه آنزیمی چند زیرواحدی است که انتقال الکترون از سیتوکروم c به اکسیژن مولکولی را جفت می‌کند و به شیب الکتروشیمیایی پروتون کمک می‌کند (Huttemann et al., 2001). سوپراکسید دیسموتاز ۲ میتوکندریایی (SOD2) که به‌عنوان سوپراکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (MnSOD) شناخته می‌شود، آنزیمی است که توسط ژن SOD2 کدگذاری می‌شود. این پروتئین به محصولات جانبی

است که توسط ژن UCP3 کدگذاری می‌شود. خانواده پروتئین‌های جفت نشده نقش مهمی در هموستاز انرژی ایفا می‌کنند و بنابراین، در

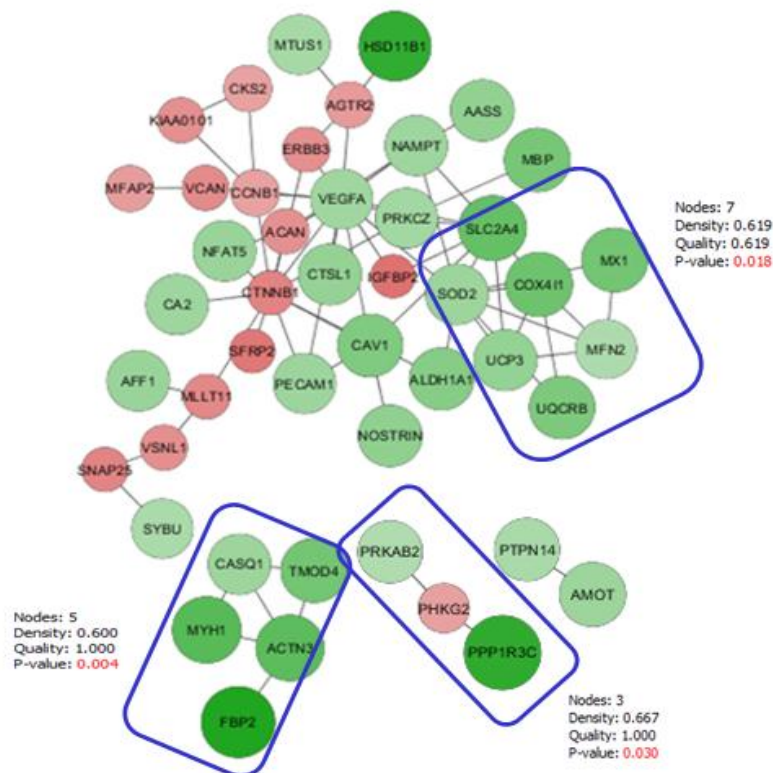
جدول ۳- ژن‌های با کاهش بیان بین مقطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی
Table 3- Genes with decreased expression between adult and 70 days of embryonic age

نماد ژن Gene symbol	لگاریتم تغییر بیان logFC	بیان متوسط AveExpr	آزمون T- T-test	مقادیر P- P-value	مقادیر P-تنظیم شده adj.P-val	بونفرونی Bonferroni
NNAT	-2.41962	8.500148	-4.04752	0.00042	0.019467	-0.00862
ACOT7	-1.7284	5.420076	-6.51776	6.95E-07	0.000286	6.02412
IGFBP2	-1.55898	7.795998	-7.05712	1.83E-07	0.00015	7.273291
SFRP2	-1.49095	7.345442	-4.78297	6.13E-05	0.006295	1.804346
ISYNA1	-1.41615	5.849885	-8.49402	6.21E-09	1.36E-05	10.39651
ABI3BP	-1.38777	8.139394	-4.24061	0.000254	0.015223	0.464209
CTNNB1	-1.34473	9.220989	-4.2457	0.000251	0.015223	0.476728
SNAP25	-1.34138	5.926042	-6.8015	3.43E-07	0.000161	6.686106
MLLT11	-1.28446	5.608408	-6.27621	1.28E-06	0.00042	5.452683
VCAN	-1.26264	6.098742	-4.56524	0.000109	0.008921	1.265119
HN1	-1.23088	7.958271	-4.54582	0.000114	0.009159	1.21707
ERBB3	-1.2049	7.262624	-3.71656	0.000989	0.034048	-0.80877
VSNL1	-1.20476	4.388637	-4.5276	0.00012	0.009379	1.17199
KIAA0101	-1.19771	7.019201	-5.18265	2.15E-05	0.003055	2.793629
ACAN	-1.19551	4.322863	-3.59735	0.001341	0.040657	-1.09271
CDK2AP1	-1.1836	8.28275	-3.97701	0.000505	0.021557	-0.18032
AGTR2	-1.08291	5.009504	-6.82985	3.19E-07	0.000161	6.751666
PIGU	-1.07011	8.185229	-5.12811	2.48E-05	0.003055	2.658887
MFAP2	-1.05935	8.882939	-4.06435	0.000402	0.019385	0.032461
EMILIN2	-1.03678	6.224918	-4.38136	0.000176	0.012298	0.810768
INTS10	-1.0179	5.922382	-3.53011	0.001591	0.044407	-1.25166
CKS2	-1.01125	7.343007	-4.49475	0.000131	0.009758	1.090771
TTL1	-1.01047	4.55422	-6.36673	1.02E-06	0.000371	5.667644
PHKG2	-1.00799	6.056636	-4.4255	0.000157	0.011313	0.919692
CCNB1	-1.00222	6.348495	-4.64391	8.83E-05	0.007505	1.459842



شکل ۲- نمودار PCA داده‌های ریزآرایه و RNASeq بعد از ادغام و حذف اثرات دسته

Figure 2- PCA plot of microarray and RNASeq data after integration and removing batch effect. داده‌های مربوط به هر مقطع سنی با رنگ جداگانه (رنگ سبز برای مقطع ۷۰ روزگی و رنگ بنفش برای مقطع بلوغ) مشخص شده‌اند. The data related to each age group are marked with a separate color (green color for the 70-day age and purple color for the adult).



شکل ۳- خوشه‌های معنی‌دار شبکه تعاملی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Figure 3- Significant clusters of the interaction network of identified DEGs between Adult and 70 days of embryonic age

در این شبکه، ژن‌های با گره‌های بزرگ و سبز تیره، بالاترین بیان و گره‌های کوچک‌تر و قرمز، کمترین بیان را دارند.

In this network, genes with large and dark green nodes have the highest expression and smaller and red nodes have the lowest expression.

۱ که به‌عنوان PTG هم شناخته می‌شود را رمزگذاری می‌کند. پروتئین فسفاتاز -1 (PP1) در تنظیم طیف گسترده‌ای از عملکردهای سلولی توسط فسفوریلاسیون برگشت‌پذیر پروتئین شرکت می‌کند. (Doherty et al., 1997). زیر واحد بتا-۲ پروتئین کیناز فعال-5 AMP آنزیمی است که توسط ژن PRKAB2 رمزگذاری می‌شود. پروتئین رمزگذاری شده توسط این ژن، زیر واحد تنظیم‌کننده پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) است. AMPK یک آنزیم مهم انرژی‌ساز است که می‌تواند افزایش نسبت AMP/ATP و ADP/ATP در سلول‌های استرس‌دیده را کشف نموده و تعادل انرژی را تنظیم نماید و در واقع، وضعیت انرژی سلولی را کنترل نماید. این زیر واحد ممکن است تنظیم‌کننده‌ای مثبت بر فعالیت AMPK باشد و چون در ماهیچه‌های اسکلتی بسیار بیان می‌شود، بنابراین ممکن است نقش‌های خاص بافتی داشته باشد (Cheung et al., 2000). کاهش دادن AMPK فعال، موجب افزایش mTORC1 فعال در ماهیچه اسکلتی و افزایش حجم ماهیچه می‌شود. این نشان می‌دهد، AMPK ساخت پروتئین در ماهیچه اسکلتی را تنظیم می‌نماید.

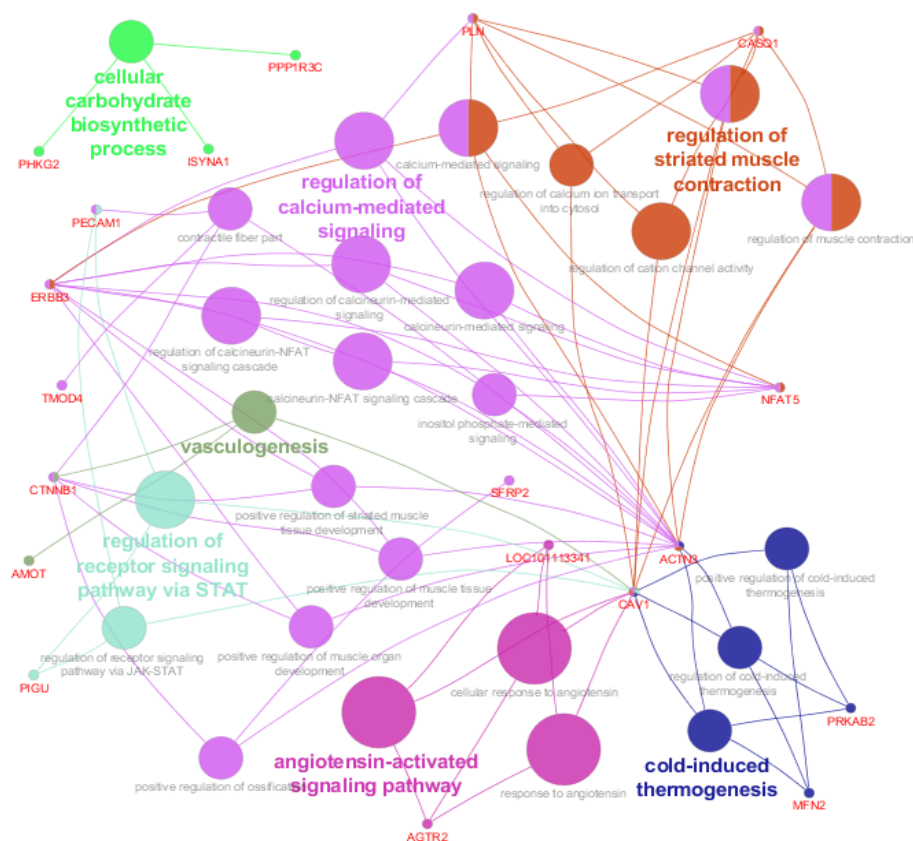
سومین خوشه معنی‌دار با $P\text{-value} = 0.030$ بر روی شبکه ژنی مشخص شده‌است. این خوشه با سه گره شامل ژن‌های PRKAB2، PHKG2 و PPP1R3C است که ژن PRKAB2 و PPP1R3C دارای بیان بالا و ژن PHKG2 دارای بیان کم بودند. ژن PPP1R3C از این خوشه به‌عنوان ژن‌های افتراقی در مقایسه ترنسکریپتوم بافت عضله بین دو نژاد مرینوی گوشتی چین‌خوا و دنبه کوچک هان توسط سون و همکارانش شناسایی و گزارش شده‌است (Sun et al., 2016). این ژن‌ها در تأمین و تنظیم انرژی سلول‌ها و احتمالاً فسفریله و غیرفعال کردن آنزیم‌های مسئول بیوسنتز اسیدهای چرب و کلسترول دخیل هستند. زنجیره کاتالیتیکی فسفوریلاز b کیناز گاما آنزیمی است که توسط ژن PHKG2 رمزگذاری می‌شود. بیشترین فراوانی بیان این ژن در کبد و عضلات گزارش شده‌است. این ژن نقش مهمی در تأمین انرژی سلول‌ها دارد و گلوکوزی که به شکل گلیکوژن در سلول‌های عضلانی و کبدی ذخیره می‌شود را در صورت نیاز به گلوکز به‌سرعت تجزیه می‌کند (Huang et al., 1994). ژن PPP1R3C آنزیم زیرواحد تنظیمی ۳ C پروتئین فسفاتاز

مقطع سنی در شکل ۴ و جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

پایگاه‌های داده مخزن بزرگی از داده‌های خام هستند که می‌توان با روش‌های جدید متاآنالیز، آن‌ها را ادغام و نتایج را تفسیر کرد. از آنجایی که در بیشتر مطالعات *in silico* تعداد نمونه به‌کار رفته کم است، اما در روش‌های ادغامی داده‌ها مانند مطالعه حاضر، مطالعات مختلف تجمیع و تعداد نمونه‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه، نتایج گسترده‌تری به‌دست می‌آید. این مطالعه با ادغام داده‌های دو روش متفاوت، داده‌های بیان برای مقاطع سنی مهم را کنار هم فراهم آورد تا دیدی کلی از تفاوت‌های ترنسکرپتوم‌ها در بافت عضله گوسفند نژاد تکسل در دو مقطع مهم سنی را نشان دهد. در مجموع، در بافت عضله بین مقطع سنی بلوغ و جنینی بیان ۶۲ ژن (۳۷ ژن افزایش بیان و ۲۵ ژن کاهش بیان) در عضله به‌شکلی معنادار اختلاف داشت.

در ادامه، برای مرتبط کردن DEG‌های این مقطع سنی به دسته‌بندی‌های احتمالی خود، آنالیز غنی‌سازی هستی‌شناسی ژنی در سه گروه فرآیند بیولوژیکی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی صورت گرفت. آنالیز غنی‌سازی برای DEG‌های میان مقطع سنی بلوغ و جنینی نشان داد، ۲۵ فرآیند زیستی به‌شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده‌اند ($P\text{-adj Bonf} > 0.05$) که عمدتاً فرآیندهای زیستی مربوط به فرآیند استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام و بافت‌های عضلانی، مسیر و پاسخ‌های آنزیم‌تسین، تنظیم انقباض عضله مخطط، سیگنالینگ واسطه کلسینورین، مسیر علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و تنظیم آن، تنظیم مسیر علامت‌دهی گیرنده از طریق JAK-STAT، علامت‌دهی با واسطه کلسیم، فرآیند ساخت کربوهیدرات سلولی بودند. همچنین یک عملکرد مولکولی به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده است ($P\text{-adj Bonf} > 0.05$) که مربوط به تنظیم فعالیت کانال کاتیونی است. یک اجزای سلولی نیز به شکلی معنی‌دار غنی‌سازی شده است ($P\text{-adj Bonf} > 0.05$) که مربوط به فیبر انقباضی است. نتایج هستی‌شناسی این ژن‌ها در این



شکل ۴- ارتباط بین هستی‌شناسی ژن‌های افتراقی شناسایی شده بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Figure 4- Relationship between the ontology of identified DEGs between Adult and 70 days embryonic age

نودهای کوچک ژن‌ها و نودهای بزرگ عبارات هستی‌شناسی هستند.

Small nodes are genes and large nodes are ontology terms.

جدول ۴- عبارات هستی‌شناسی شناسایی شده ژن‌های افتراقی بین مقاطع سنی بلوغ و ۷۰ روزگی جنینی

Table 4- The identified ontology terms of DEGs between adult and 70 days of embryonic age

شماره هستی‌شناسی ژن GO-ID	عبارات هستی‌شناسی ژن GO-term	طبقه Class	مقادیر P- P-value	بونفرونی Bonferroni	ژن‌های مرتبط Associated genes
GO:0001570	Vasculogenesis	BP	7.8E-4	5.5E-3	[AMOT, CAV1, CTNNA1]
GO:0034637	Cellular carbohydrate biosynthetic process	BP	2.1E-3	6.5E-3	[ISYNA1, PHKG2, PPP1R3C]
GO:0046425	Regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, PIGU]
GO:1904892	Regulation of receptor signaling pathway via STAT	BP	4.3E-4	5.6E-3	[CAV1, PECAM1, PIGU]
GO:0106106	Cold-induced thermogenesis	BP	1.5E-3	7.9E-3	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0120161	Regulation of cold-induced thermogenesis	BP	2.2E-5	4.5E-4	[ACTN3, CAV1, MFN2, PRKAB2]
GO:0038166	Angiotensin-activated signaling pathway	BP	2.8E-4	3.9E-3	[AGTR2, CAV1, LOC101113341]
GO:0045778	Positive regulation of ossification	BP	5.4E-5	1.0E-3	[ACTN3, CTNNA1, SFRP2]
GO:1901863	Positive regulation of muscle tissue development	BP	1.6E-3	6.6E-3	[ACTN3, CTNNA1, ERBB3]
GO:0044449	Contractile fiber part	CC	2.8E-3	2.8E-3	[ACTN3, CTNNA1, PECAM1, TMOD4]
GO:0006937	Regulation of muscle contraction	BP	1.4E-3	8.6E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0048636	Positive regulation of muscle organ development	BP	5.3E-4	5.8E-3	[ACTN3, CTNNA1, ERBB3]
GO:0019722	Calcium-mediated signaling	BP	5.3E-4	5.3E-3	[ACTN3, CASQ1, ERBB3, NFAT5, PLN]
GO:0048016	Inositol phosphate-mediated signaling	BP	2.8E-4	3.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0006942	Regulation of striated muscle contraction	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0045844	Positive regulation of striated muscle tissue development	BP	1.0E-4	1.7E-3	[ACTN3, CTNNA1, ERBB3]
GO:0033173	Calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	4.9E-4	5.9E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:0106056	Regulation of calcineurin-mediated signaling	BP	7.2E-5	1.2E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]
GO:2001257	Regulation of cation channel activity	BP, MF	2.56E-4	3.8E-3	[CASQ1, CAV1, PLN]
GO:0070884	Regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	BP	1.2E-4	2.0E-3	[ACTN3, ERBB3, NFAT5]

JAK-STAT، عملکرد مولکولی تنظیم فعالیت کانال کاتیونی و در نهایت، اجزای سلولی فیبر انقباضی را آشکار کرد. این یافته‌ها می‌تواند منبعی مفید برای بررسی‌های زیستی ژن‌های مربوط به رشد عضله در گوسفند باشد و سرنخ‌هایی را برای درک مکانیسم‌های ژنتیکی مولکولی در دیگر نژادهای گوسفند در اختیارمان قرار دهد. در نهایت، با توجه به اینکه نتایج به‌دست آمده از روش ادغامی در این مطالعه در راستای مطالعات انفرادی هر یک از مجموعه عضله ریزآرایه و RNA-Seq و همچنین بررسی منابع صورت گرفته است، می‌توان گفت روش ادغام داده‌ها می‌تواند بسیاری از مطالعات ناقص را تکمیل و نتایج مفیدی ارائه دهد.

با رسم شبکه ژنی بین ژن‌های افتراقی این دو مقطع در مجموع ۱۵ ژن منتخب MYH1, ACTN3, CASQ1, TMOD4, FBP2, UQCRB, MFN2, SOD2, COX4I1, MX1, SLC2A4, PPP1R3C, PHKG2, PRKAB2, UCP3 شناسایی شد. عملکرد این ژن‌ها به نحوی در تکثیر سلولی، سنتز پروتئین‌ها، تشکیل و سازماندهی میوفیبریل‌ها (در مقطع سنی جنینی) و متابولیسم‌های چربی‌زایی (در مقطع سنی بلوغ) ثابت شده است. آنالیز غنی‌سازی ژن‌های افتراقی شناسایی شده برخی از فرآیندهای زیستی مثل عروق-زایی، تنظیم مثبت استخوان‌سازی، تنظیم مثبت رشد اندام عضلانی، تنظیم انقباض عضلات مختلط، بخش فیبر انقباضی، علامت‌دهی به واسطه کلسیم، مسیرهای علامت‌دهی Calcineurin-NFAT و

References

- Almenar-Queralt, A., Lee, A., Conley, C. A., de Poupiana, L. R., & Fowler, V. M. (1999). Identification of a novel tropomodulin isoform, skeletal tropomodulin, that caps actin filament pointed ends in fast skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28466-28475. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28466>.
- Badday Betti, S., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2022). Identification of lncRNAs expression and their regulatory networks associated with development and growth of skeletal muscle in sheep using RNA-Seq. *Agriculture and Natural Resources*, 56(2), 373-386. <https://doi.org/10.34044/j.anres.2022.56.2.15>
- Bakhshalizadeh, S., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2021). Meta-analysis of genome-wide association studies for somatic cells score trait in dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 9(3), 39-58. <https://doi.org/10.22069/ejrr.2021.19036.1787>. (in persian)
- Beggs, A. H., Byers, T. J., Knoll, J. H., Boyce, F. M., Bruns, G. A. & Kunkel, L. M. (1992). Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(13), 9281-8.
- Betti, S., Tahmoorespur, M. & Javadmanesh, A. (2022). Alternative Splicing Novel lncRNAs and Their Target

- Genes in Ovine Skeletal Muscles. *Journal of Cell and Molecular Research*, 13(2), 129-136. <https://doi.org/10.22067/jcmr.2022.74635.1027>
6. Boss, O., Giacobino, J. P. & Muzzin, P. (1998). Genomic structure of uncoupling protein-3 (UCP3) and its assignment to chromosome 11q13. *Genomics*, 47 (3), 425–6. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.5135>.
 7. Cheung, P. C., Salt, I. P., Davies, S. P., Hardie, D. G. & Carling, D. (2000). Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochemical Journal*, 346(3), 659-669. <https://doi.org/10.1042/bj3460659>.
 8. Doherty, M. J., Young, P. R. & Cohen, P. T. (1997). Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1. *FEBS letters*, 399(3), 339-343. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(96\)01357-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(96)01357-9).
 9. Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death & Disease*, 9(3), 330. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0023-6>.
 10. Horisberger, M. A. (1992). Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *Journal of Virology*, 66(8), 4705-4709. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.8.4705-4709.1992>.
 11. Huang, C. Y., Yuan, C. J., Livanova, N. B. & Graves, D. J. (1994). Expression, purification, characterization, and deletion mutations of phosphorylase kinase gamma subunit: identification of an inhibitory domain in the gamma subunit. *Reversible Protein Phosphorylation in Cell Regulation*, 7–18. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2600-1_1.
 12. Huang, S. & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–52. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>.
 13. Hüttemann, M., Kadenbach, B. & Grossman, L. I. (2001). Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, 267(1), 111–23. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00385-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00385-7).
 14. Jung, H. J., Kim, K. H., Kim, N. D., Han, G. & Kwon, H. J. (2011). Identification of a novel small molecule targeting UQCRB of mitochondrial complex III and its anti-angiogenic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(3), 1052-1056. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.12.002>.
 15. Jung, J., Mok, C., Lee, W. & Jang, W. (2017). Meta-analysis of microarray and RNA-Seq gene expression datasets for carcinogenic risk: An assessment of Bisphenol A. *Molecular & Cellular Toxicology*, 13(2), 239-249. <https://doi.org/10.1007/s13273-017-0026-5>.
 16. Kamali S., Javadmanesh, A., Stelinski, L. L., Kyndt, T., Seifi, A., Cheniany, M., Zaki-Aghl, M., Hosseini, M., Heydarpour, M., Asili, J. & Karimi, J. (2022). Beneficial worm allies warn plants of parasite attack below-ground and reduce above-ground herbivore preference and performance. *Molecular Ecology*, 31(2), 691-712. <https://doi.org/10.1111/mec.16254>. (in persian)
 17. Liu, N., He, J. N., Yu, W. M., Liu, K. D., Cheng, M., Liu, J. F., He, Y. H., Zhao, J. S. & Qu, X. X.. (2015). Transcriptome analysis of skeletal muscle at prenatal stages in Polled Dorset versus Small-tailed Han sheep. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1085-1095. <https://doi.org/10.4238/2015.February.6.12>.
 18. Ma, T., Liang, F., Oesterreich, S. & Tseng, G. C. (2017). A joint bayesian model for integrating microarray and RNA sequencing transcriptomic data. *Journal of Computational Biology*, 24(7), 647-662. <https://doi.org/10.1089/cmb.2017.0056>.
 19. Mohammadi, F., Tahmoorespur, M. & Javadmanesh, A. (2019). Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin- and fat-tailed breeds, *Animal Science Journal*, 32(123), 301-312. <https://doi.org/10.22092/asj.2018.122913.1749>. (In Persian).
 20. Rakus, D., Maciaszyk, E., Wawrzycka, D., Ułaszewski, S., Eschrich, K. & Dzugaj, A. (2005). The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS letters*, 579(25), 5577-5581. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.021>.
 21. Rashidian, Z., Dehdilani, N., Dehghani, H. & Javadmanesh, A. (2020). Isolation and culturing myogenic satellite cells from ovine skeletal muscle. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 12(2), 36-43. <https://doi.org/10.22067/veterinary.v12i2.82979>. (In Persian).
 22. Sadkowski, T., Jank, M., Oprzadek, J. & Motyl, T. (2006). Agedependent changes in bovine skeletal muscle transcriptomic profile. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 57, 95-110.
 23. Saedi, N., Aminafshara, M., Chamania, M., Honarvar, M. & Javadmanesh, A. (2022). Expression pattern and network visualization of genes involved in milk persistency in bovine mammary tissue. *Agriculture and Natural Resources*, 56(1), 23-34. <https://doi.org/10.34044/j.anres.2021.56.1.03>
 24. Sahraei, S., Nassiri, M. R., Javadmanesh, A., Tohidi, R. & Ebrahimi, E. (2019). Investigation of gene expression and gene networks related to apoptosis in sensitive and resistant Aryan broiler breeders with RNA-Seq. *Animal Production Research*, 8(1), 53-66. (in persian)
 25. Sun, L., Bai, M., Xiang, L., Zhang, G., Ma, W. & Jiang, H. (2016). Comparative transcriptome profiling of longissimus muscle tissues from Qianhua Mutton Merino and Small Tail Han sheep. *Scientific Reports*, 6, 33586.
 26. Takada, F., Vander Woude, D. L., Tong, H. Q., Thompson, T. G., Watkins, S. C., Kunkel, L. M. & Beggs, A. H.

- (2001). Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1595-1600. <https://doi.org/10.1073/pnas.041609698>.
27. Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Györke, I., Volpe, P., Williams, S. C. & Györke, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11759-11764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932318100>.
28. Weiss, A., Schiaffino, S. & Leinwand, L. A. (1999). Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *Journal of Molecular Biology*, 290(1), 61-75. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2865>.
29. Yan, X., Zhu, M. J., Dodson, M. V. & Du, M. (2013). Developmental programming of fetal skeletal muscle and adipose tissue development. *Genomics*, 1: 29-38. <https://doi.org/10.7150/jgen.3930>.
30. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x).
31. Zerehdaran, S., Ghobakhloo, F., Jabbari Nooghabi, M. & Shariati, M. (2020). Meta-Analysis of studies on genetic parameters of economic traits in Iranian Holstein dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 8(2), 1-22. <https://doi.org/10.22069/ejrr.2020.16994.1703>. (In Persian).
32. Zhang, Ch., Wang, G., Wang, J., Ji, Zh., Liu, Zh., Pi, Xi. & Chen, C. (2013). Characterization and Comparative Analyses of Muscle Transcriptomes in Dorper and Small-Tailed Han Sheep Using RNA-Seq Technique. *PLOS ONE Journal*, 8 (8), 72686.



Study of Signatures of Positive Selection and Gene Ontology in some Domestic and Wild Sheep Breeds in Iran

Majid Bigham¹, Mohammadreza Nassiri^{2*}, Mahyar Heydarpour³, Ali Javadmanesh⁴

1- Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

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

3- Department of Medicine, Massachusetts General Brigham, Harvard, Medical School, Boston, USA.

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

*Corresponding Author's Email: nassiry@um.ac.ir

How to cite this article:

Received: 12-12-2022

Revised: 08-02-2023

Accepted: 15-02-2023

Available Online: 07-06-2022

Bigham, M., Nassiri, M. R., Heydarpour, M., & Javadmanesh, A. (2023). Study of signatures of positive selection and gene ontology in some domestic and wild sheep breeds in Iran. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 570-584. (in Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79931.1112>

Introduction: Over the years, animals have been exposed to various factors such as natural selection, genetic drift, and multiple mutations, so such factors have caused changes between and within species. The genetic mutations that occur in the populations of domestic animals, will be added to the merits of animals who contain these genetic mutations and they will have more breeds. These mutations are also repeated in their breeds. If a new SNP in a population increases the competence of its carriers compared to other members of society, this choice will make the more deserving individual more involved in shaping the next generation. The most important statistical tests based on demographic differentiation are the F_{ST} statistics, which identify distinct positions under positive selection, which are of particular importance for economic characteristics. One of the best ways to understand physiological processes is to analyze gene regulation networks. Identification of genes involved in economic traits as molecular markers in breeding is of special importance. Gene regulation networks enable the researcher to study all of the genes together. The aim of this study was to identify selection signature regions and candidate genes related to economic traits.

Materials and Methods: The necessary data for this research were acquired from two sources, namely NEXTGEN and HAPMAP. The dataset encompassed breeds such as Afshari (41 individuals), Ghezel (35 individuals), Moghani (35 individuals), and eight wild sheep. The initial objective was to assess data quality and perform filtration on raw data. For the remaining single nucleotide polymorphisms (SNPs), those not conforming to Hardy-Weinberg equilibrium were considered indicative of genotyping errors. A stringent probability level of 10^{-6} , determined through Bonferroni correction, was applied. Various stages of quality control were meticulously executed using PLINK v1.9. Additionally, the study involved identifying animals positioned outside their respective groups, contributing to a comprehensive understanding of the population structure within the two groups. Principal component analysis (PCA) were done in R software. The F_{ST} index was proposed to study the distinction between subpopulations and identification of selection signature. the population structure of wild and domestic sheep breeds was analyzed. PCA analysis was performed using genotype information of the samples to investigate how the animals were grouped Investigation of identified genes using SNPs in the upper 1% range of F_{ST} were identified by Plink v1.9 software. In addition, the DAVID database (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) was used to determine biological routes. At this stage, it is assumed that genes that belong to a functional class can be considered as a



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2023.79931.1112>

group of genes that have some specific and common characteristics. GeneCards (<http://www.genecards.org>) and UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) databases were also used to interpret the function of the obtained genes.

Results and Discussion: The results showed that adjacent SNPs are highly dispersed in several genomic regions. From 34556 SNPs after filtration above 1%, SNPs with higher F_{ST} stabilization index (340 SNP) with F_{ST} range from 0.304 to 0.472 were selected. Selected SNPs consisted of 95 genomic regions on 23 chromosomes between domestic and wild sheep. Most regions were located on chromosomes 13 and 7 had 14 and 9 gene regions, respectively. Examination of the relationship between QTLs and important genes in selected areas showed that 95 genes related to economic traits were identified. QTLs with important economic characteristics including quality and quantity of meat, milk, fat, bone, immune system and parasite resistance were reported. Most QTLs were located on chromosomes 2, 3, 5, 6, and 7, indicating that the most positive mutations occurred on these chromosomes. Most of the identified biological pathways related to ion channels through cell membranes are neuromuscular processes, Brain and cerebellum growth, metencephalon growth, membrane ion membrane transport, and pathways involved in regulating ion transport in cell membranes. Genes identified in different genomic regions can be considered as selective candidates. A number of genes studied as selection signatures reported were consistent with previous studies. Important genes were included: GABRB1, GRM3, HERC1, HERC3 and KCND2.

Conclusion: The study of genomic regions showed that these regions are directly and indirectly related to the quality and quantity of meat, milk, fat, bone, immune system and parasite resistance. Identifying important economic traits and locating parts of the genome that have changed as a result of selection could be used in sheep breeding programs. However, in this research we had limitations such as the incompleteness of information related to functional annotation of genes in sheep species and also the small sample size of this study. Therefore, in subsequent studies with more samples and more breeds of domestic and wild sheep in Iran, a better understanding of candidate genes for important economic traits in domestic and wild species would be achieved.

Keywords: Domestic sheep, Economic traits, Ontology, Selection signature, Wild sheep

بررسی ردپای انتخاب و هستی‌شناسی ژن در برخی نژادهای گوسفند اهلی و وحشی ایران

مجید بی‌غم^۱، محمد رضا نصیری^{۲*}، مهیار حیدرپور^۳، علی جوادمش^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۶

چکیده

در طی سالیان طولانی، حیوانات در معرض عوامل مختلفی مانند انتخاب طبیعی، رانش ژنتیکی و جهش‌های متعدد قرار گرفته‌اند، بنابراین چنین عواملی سبب تغییرات در بین و داخل گونه‌ها شده است. از سویی دیگر امروزه نیاز به افزایش تولید سبب کاهش تنوع ژنتیکی گونه‌ها بوده که نگرانی‌های شدیدی را برای سیستم تولیدی حیوانات در سراسر جهان به وجود آورده است. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب در گوسفندان اهلی در مقایسه با گوسفندان وحشی ایران و بررسی هستی‌شناسی ژن‌های کاندید مرتبط با صفات اقتصادی می‌باشد. در این تحقیق، داده‌های دو گروه گوسفند اهلی (۱۰۶ راس) و وحشی (۸ راس) بومی ایران بعد از ویرایش و کنترل کیفیت با نرم‌افزارهای R و Plink مورد آنالیز قرار گرفتند و نتایج حاصل با استفاده از سرورهای آنلاین DAVID، UniProtKB و GeneCards تفسیر شدند. نتایج نهایی نشان دادند، ۹۵ منطقه ژنومی روی ۲۳ کروموزوم در گوسفند وحشی و اهلی با هم اختلاف داشتند و بیشترین اختلاف روی کروموزوم‌های ۱۳ و ۷ بوده که به ترتیب با ژن‌های ۱۴ و ۹ مرتبط می‌باشند. بررسی مناطق ژنومی دارای اختلاف در دو نژاد نشان دادند که این مناطق با صفات کیفیت و کمیت گوشت، شیر، چربی، استخوان (با فراوانی بالاتر در گونه اهلی) و سیستم ایمنی و مقاومت به انگل (با فراوانی بالاتر در گونه اهلی) مرتبط می‌باشند. برخی از ژن‌های مهم شناسایی شده، شامل GABRB1، GRM3، HERC1، HERC3 و KCND2 بودند. در بررسی هستی‌شناسی ژن‌ها، مسیرهای زیستی شناسایی شده مربوط به کانال‌های عبور یون‌ها از غشای سلولی، فرآیندهای تحریک عصبی عضلات، رشد مغز و مخچه، انتقال غشایی یون‌های غیر آلی بود. مشخص نمودن صفات مهم اقتصادی و مکان‌یابی بخش‌هایی از ژنوم که در اثر انتخاب تغییر پیدا کرده‌اند، می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند در کشور مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: صفات اقتصادی، گوسفند اهلی، گوسفند وحشی، نشانه انتخاب، هستی‌شناسی

مقدمه

جهش‌های ژنتیکی که در جمعیت‌های حیوانات اهلی رخ می

دهند، باعث ایجاد شایستگی‌هایی در حیوانات حامل آن‌ها شده و در نتیجه، این حیوانات نتاج بیشتری خواهند داشت. این جهش‌ها در نتاج آن‌ها نیز تکرار می‌شود. این نوع از جهش‌ها به احتمال زیاد در بین جمعیت در طی نسل‌های متمادی پراکنده شده و امروزه در ژنوم حیوانات دیده می‌شود. بنابراین، پیدا کردن مواردی که در آن‌ها آلل خاص و مفیدی از یک جایگاه ژنی به‌طور سریع و وسیع در جمعیت (ها) پراکنده شده و باعث کاهش تنوع در جایگاه ژنی مورد نظر شده‌است، موضوع مورد علاقه متخصصان اصلاح دام می‌باشد (Oldenbroek, 2007).

در صورتی که انتخاب طبیعی یا مصنوعی برای صفتی خاص به نفع ناحیه‌ای از ژنوم صورت گیرد، این امکان وجود دارد که در طول زمان فراوانی سایر چندشکلی‌ها کاهش یافته یا ناپدید شده باشند. در نتیجه، یک هاپلوتایپ خاص که ممکن است حاوی

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

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

۳- محقق دانشگاه علوم پزشکی هاروارد، دپارتمان پزشکی، شهر بوستون، ایالت ماساچوست، آمریکا.

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

* نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79931.1112>

های انجام شده توسط انسان نشانه‌های قابل شناسایی را در ژنوم گوسفندان امروزی به‌جا گذاشته که آشکارسازی این نشانه‌ها می‌تواند به اصلاح و بهبود ژنتیکی صفات مهم اقتصادی در این دام کمک کند (Moradi et al., 2012).

یکی از روش‌های درک بهتر فرآیندهای فیزیولوژیکی، بررسی شبکه‌های تنظیم ژنی و مسیرهای زیستی می‌باشد. شناسایی ژن‌های دخیل در صفات اقتصادی به‌عنوان مارکرهای مولکولی در اصلاح نژاد اهمیت ویژه‌ای دارد. شبکه‌های تنظیم ژنی و مسیرهای زیستی به محقق این امکان را می‌دهد تا مطالعه همه ژن‌ها در کنار یکدیگر انجام گردد (Zeraatpisheh et al., 2022). با استفاده از این شبکه می‌توان اثرات متقابل بین ژن‌ها و اثرات متقابل احتمالی که بین پروتئین‌ها وجود دارد را مورد بحث قرار داد (Mohammadi et al., 2020). علاوه‌براین، از شبکه‌های تنظیم ژنی و مسیرهای زیستی می‌توان جهت یافتن بیومارکرهایی برای شناسایی، تشخیص و تخمین اهداف بیولوژیکی نیز بهره برد (Roshandel Ghalezo et al., 2022). این شبکه‌ها ساختار اثرات متقابل مارکرها را نیز در نظر می‌گیرند که موجب می‌شود، بررسی مارکرها در شبکه نسبت به بررسی مارکرها به‌صورت منفرد، بسیار کارآمدتر باشد. نتایج این مرحله، مسیرهای ژنی و فرآیندهای بیولوژیکی را که ژن‌های شبکه می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد و در کنترل آن‌ها مؤثر باشد، نشان می‌دهد (Bakhshalizadeh et al., 2021).

اولین بار شاخص F_{ST} برای بررسی سطح تمایز بین زیرجمعیت‌ها و شناسایی نشانه‌های انتخاب پیشنهاد شد. یک راه تفسیر افزایش شاخص تثبیت، کاهش هتروزیگوسیتی در میان جمعیت‌ها نسبت به حالت طبیعی مورد انتظار می‌باشد. تحت شرایط خنثی، میزان شاخص تثبیت به‌وسیله رانش ژنتیکی و مهاجرت تعیین می‌شود، اما سازگاری منطقه‌ای می‌تواند میزان تمایز جمعیت‌ها را در لوکوس‌های خاص شتاب دهد و منجر به مقادیر بالاتری از شاخص تثبیت شود (Sabeti et al., 2002; Forough Ameri et al., 2015). F_{ST} یک روش ارزیابی تفرق جمعیتی بر پایه داده‌های چندشکلی ژنتیکی می‌باشد. ارزش F_{ST} از لحاظ تئوری می‌تواند بین ۰ (بدون تفاوت) تا ۱ (تفاوت کامل)، که هر جمعیت برای آلل متفاوتی تثبیت شده‌اند) متغیر باشد. در تئوری خنثی، F_{ST} توسط رانش ژنتیکی مشخص می‌شود و تمام جایگاه‌ها به‌صورت مشابهی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، درحالی‌که انتخاب منجر به انحراف در ارزش‌های F_{ST} ژن‌های انتخابی و جایگاه‌های اطراف آن می‌شود. مهم‌ترین آزمون‌های آماری مبتنی بر تمایز جمعیتی، آماره F_{ST} است که به شناسایی جایگاه‌های متمایز تحت انتخاب مثبت که برای صفات اقتصادی اهمیت ویژه‌ای دارند، می‌پردازد (Akey, 2009).

تاکنون پژوهش‌های اندکی در رابطه با خصوصیات ژنتیکی گوسفندان وحشی ایران و همچنین تفاوت‌های ژنتیکی آن‌ها با

چندین ژن باشد، می‌تواند تنها هاپلوتاایپ یا مهم‌ترین هاپلوتاایپ موجود در جمعیت باشد که به آن نشانه انتخاب^۱ یا رانش ناشی از انتخاب^۲ می‌گویند (Forough Ameri et al., 2015). به عبارت دیگر، چنانچه یک جهش جدید باعث افزایش شایستگی افراد حامل آن نسبت به سایر افراد جامعه شود، انتخاب باعث می‌شود، افرادی که دارای شایستگی بیشتری هستند در تشکیل نسل بعد شانس مشارکت بیشتری داشته باشند. بدین ترتیب، فراوانی واریانت جهش یافته، بسته به سهم آن در افزایش شایستگی به‌سرعت شروع به افزایش خواهد کرد (Sabeti et al., 2007). هنگامی که انتخاب مثبت به‌سمت افزایش فراوانی آلل مطلوب پیش می‌رود، جایگاه‌های خنثی نزدیک به این جایگاه به‌علت پیوسته بودن با آلل مطلوب، تحت تأثیر قرار می‌گیرد که در نتیجه، الگوی تنوع ژنتیکی و عدم تعادل فاز گامتی در جایگاه‌های اطراف این جهش انتخابی تغییر خواهد کرد.

افزایش فراوانی جهش‌های به‌وجود آمده به علت پدیده انتخاب که فقط در برخی از جوامع مفید هستند، سبب به‌وجود آمدن نشانه‌هایی در سطح ژنوم موجودات می‌شود. شناسایی این نشانه‌ها به وسیله بررسی فراوانی آللی، توسعه ساختار هاپلوتیپی، کاهش تنوع ژنتیکی در آن منطقه و افزایش الگوی عدم تعادل پیوستگی ژنی امکان‌پذیر است (Qanbari et al., 2014). نشانه‌های انتخاب یکی از مؤثرترین تکنیک‌ها جهت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر صفات کمی در حوزه‌های مختلف ژنتیک از جمله ژنتیک حیوانی شده است، زیرا این مناطق اغلب با جایگاه‌های کنترل‌کننده صفات مهم اقتصادی، در ارتباط هستند.

به تغییر الگوی تنوع ژنتیکی و LD در جایگاه‌های مرتبط با یک جهش سودمند در طی انتخاب مثبت، رانش ناشی از انتخاب می‌گویند. شناسایی این مناطق ژنومی با توجه به اینکه عمدتاً با ژن‌های عمده اثر و صفات مهم اقتصادی همراه هستند، دارای اهمیت زیادی می‌باشد و می‌توانند منابع اطلاعاتی مناسبی برای اجرای تحقیقات بعدی فراهم آورند. یکی از مزایای اصلی این روش‌ها امکان اجرای آن‌ها با استفاده از اطلاعات مولکولی در غیاب رکوردهای فنوتیپی می‌باشد (Akey, 2009).

شناسایی نشانه‌های انتخاب از دو جهت مهم می‌باشند. اول اینکه این نشانه‌ها اطلاعات ارزشمندی در خصوص تکامل و مکانیسم‌های مؤثر بر تکامل را فراهم می‌کنند. دوم اینکه جایگاه‌های ژنی مرتبط شناخته شده و تنوع ژنتیکی صفات کمی آشکار می‌شود. از طرفی دیگر، اهلی‌سازی و انتخاب به‌شدت در ویژگی‌های ظاهری و رفتاری حیوانات اهلی امروزی تغییر ایجاد کرده‌است. در این مسیر، انتخاب

1- Selection signatures

2- Selective sweep

گروه عمل می‌کند.

$$F_{ST} = HT - HS / HT \quad \text{معادله (۱)}$$

در معادله فوق، HT و HS: به ترتیب میزان کل هتروزیگوسیتی و میانگین هتروزیگوسیتی در زیر جمعیت‌ها می‌باشد. برای شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم به جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP از میانگین ارزش‌های عددی SNP‌های مجاور با طول 5 SNP تحت عنوان ارزش Win5 استفاده می‌شود، یک درصد از مناطقی از ژنگان که در این تحقیق تنها در آن همه نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند، به عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند.

در این تحقیق به دلیل استفاده از دو دسته داده، مراحل کنترل کیفیت برای هر دسته جداگانه انجام شد و سپس داده‌ها با هم ادغام شدند و مجدد کنترل کیفیت شدند، تا نشانگرهایی که هم‌خوانی ندارند، حذف شوند. دلیل دیگر ادغام، این است که هر جمعیت ممکن است تعدادی نشانگر اختصاصی داشته باشد و عدم هم‌خوانی نشانگرها در دو جمعیت باعث از دست رفتن افراد شود. در مرحله ادغام، گروه اهلی بر اساس گروه وحشی که دارای تراشه قدیمی‌تر بود، به روز رسانی شدند (جدول ۱).

برای داشتن دیدگاهی کلی در زمینه ساختار جمعیتی دو گروه مورد بررسی و شناسایی حیواناتی که خارج از گروه خود قرار گرفته‌اند، تجزیه مؤلفه‌های اصلی در محیط 3.6.2 R انجام شد. همچنین، بررسی شبکه‌های ژنی توسط نرم‌افزار Cytoscape، نسخه 3.8.2 انجام شد.

مطالعه QTLs و ژن‌های مورد نظر

در این مطالعه، برای شناسایی مناطق متأثر از انتخاب مثبت در کل ژنوم برای گونه‌های گوسفند اهلی و وحشی آماره F_{ST} در محیط نرم‌افزار R x64 4.0.4 (Taheri et al., 2020). توزیع ژنومیک F_{ST} به روش win5 برای تمام SNP‌ها بر روی ژنوم انجام شد (Moradi et al., 2012). بررسی ژن‌های شناسایی شده با استفاده از SNP‌هایی که در بازه یک درصد بالایی F_{ST} قرار داشتند، توسط نرم‌افزار Plink v1.9 شناسایی شدند.

جهت انتساب SNP‌ها به ژن‌ها، SNP‌هایی که در بازه یک درصد بالایی F_{ST} قرار داشتند، با استفاده از بسته نرم‌افزاری Durinck et al., 2009 (biomaRt) در محیط R و با استفاده از نسخه ژنوم گوسفند Oar_v4.0 به ژن‌هایی که SNP مورد نظر در داخل آن ژن یا در فاصله 300 Kb بالادست یا پایین دست آن ژن قرار داشت، نسبت داده شدند (Qanbari et al., 2012). ژن‌هایی که حداقل حاوی یک SNP باشند، ژن معنی‌دار به حساب می‌آیند. بخش‌هایی از ژنوم که دارای F_{ST} بالایی هستند، نشان‌دهنده تمایز بین دو گونه اهلی و وحشی می‌باشند که بر اثر انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی در طی

گوسفند اهلی صورت گرفته است، در تحقیقات قبلی تا مرحله شناسایی SNP‌های دارای تفاوت کار شده است، ولی در این مطالعه، سعی شد این نقاط دارای اختلاف را تا مرحله ژن‌ها و صفات مرتبط با SNP و هستی‌شناسی ژن ادامه دهیم. هدف از انجام این تحقیق، شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب و ژن‌های کاندید مرتبط با صفات اقتصادی گوسفند اهلی و وحشی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

داده‌های SNPchip50k مورد نیاز این تحقیق از دو پایگاه داده HAPMAP (<https://www.sheepmap.org/>) و Nextgen (<https://projects.ensembl.org/nextgen>) با فرمت های MAP و PED دانلود شد. نژادها شامل نژادهای افشاری (۴۱ راس)، قزل (۳۵ راس)، مغانی (۳۵ راس) و نیز ۸ راس گوسفند وحشی بودند. در ایران، دو گونه گوسفند وحشی وجود دارد. گوسفندهای وحشی اورپال و ارمنی، که در مطالعات قبلی به عنوان زیرگونه در نظر گرفته شده بودند در رده‌بندی جدید در دو گونه متفاوت گوسفند وحشی اورپال و ارمنی قرار گرفتند (Kaveh Pishghadam et al., 2017). گوسفندان وحشی مورد استفاده در این تحقیق از گونه ارمنی منطقه شمال غرب ایران نمونه‌گیری شده‌اند.

جهت کنترل کیفیت و ویرایش داده‌های خام، نمونه‌هایی که فراوانی نرخ تعیین ژنوتیپ آن‌ها کمتر از ۹۰ درصد بود، به دلیل خطای بالا در تعیین ژنوتیپ، شناسایی و حذف شدند. در مرحله بعد، نشانگرهایی که حداقل فراوانی آلی در آن‌ها کمتر از پنج درصد بود، حذف شدند. سپس نشانگرهایی که نرخ ژنوتیپ شده آن‌ها در نمونه‌ها کمتر از ۹۹ درصد بود، شناسایی و حذف شدند. در نهایت، برای SNP‌های باقی‌مانده، آن‌هایی که در تعادل هاردی-واینبرگ نبود، به عنوان معیاری از خطای تعیین ژنوتیپ کنار گذاشته شدند. سطح احتمال برای تعادل هاردی-واینبرگ برابر با 10^{-6} نظر گرفته شد که با استفاده از تصحیح بنفرونی به دست آمد (Moradi et al., 2012; Wang et al., 2015).

مراحل مختلف کنترل کیفیت با استفاده از نرم‌افزار (PLINK v1.9) انجام شد. برای شناسایی مناطقی از ژنوم گوسفندان اهلی و وحشی که هدف انتخاب‌های مختلف قرار گرفتند، توزیع ژنومیک F_{ST} برای تمام SNP‌ها بر روی ژنوم به صورت گراف منتهن رسم شد (Moradi et al., 2012).

صرف نظر کردن از خطای نمونه‌گیری یکی از مشکلات اصلی F_{ST} به روش رایج بوده و چنین مشکل توسط ویر و کوکرهام تصحیح گردیده است (Weir and Cockerham, 1984). این افراد روش تخمین گر ناآریب F_{ST} با نام θ را ارائه کردند که به طور مستقل از تعداد گروه‌های نمونه‌گیری شده و تعداد افراد داخل هر

نسل‌های قبل به‌وجود آمده است.

جدول ۱- مراحل کنترل کیفیت داده‌های تعیین ژنوتیپ شده گوسفندان اهلی و وحشی ایران

Table 1- Steps of quality control of genotyped data of Iranian domestic and wild sheep

مورد Item	حيوانات اهلی Domestic animals	حيوانات وحشی Wild animals	حيوانات ادغام شده Merged animals
تعداد حيوانات Number of animals	106	8	114
تعداد نشانگرها قبل از کنترل کیفیت Number of markers before quality control	44320	53074	38924
تعداد SNPها با فراوانی آلل نادر > 0.05 The number of SNPs with rare allele frequency < 0.05	84	10413	0
تعداد SNPهای با $6 \times 10^{-6} < P < 6.8$ Number of SNPs with $6 \times 10^{-6} < P < 6.8$	392	0	62
تعداد SNPها با نرخ ژنوتیپ گم شده > 0.01 Number of SNPs with missing genotype rate > 0.01	4356	3737	12583
تعداد SNPها بعد از کنترل کیفیت Number of SNPs after quality control	39488	38924	26279
نرخ ژنوتیپ Genotyping rate	0.945316	0.05734	0.902869

در کل ژنگان، نگاره منتهن ترسیم شد. در این نگاره، بخش‌های با ارزش F_{ST} ، نشان‌دهنده تمایز نژادهای اهلی و وحشی در اثر انتخاب مثبت در آن مناطق ژنگانی بودند که به دنبال انتخاب‌های طبیعی و مصنوعی در طی نسل‌های مختلف برای جایگاه‌های مورد نظر به‌وجود آمده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در چندین منطقه ژنگانی SNPهای مجاور تفرق جمعیتی بالایی داشتند. در شکل ۲، توزیع ارزش‌های Win5 تنها در سطح ژنگان نژاد اهلی و وحشی آورده شده است که در آن موقعیت ژنگانی SNPها روی محور X و ارزش تنها آن‌ها روی محور Y نمایش داده شده است.

همچنین برای بررسی تفرق جمعیتی نژادهای اهلی و وحشی ایرانی از برآوردگر ناریب F_{ST} به‌روش ویر و کوکرهام با نام ضریب تنا نیز استفاده شد که نتایج حاصل دارای همبستگی بالایی ($r^2 = 0.9997$) با نتایج روش F_{ST} رایب بودند (شکل ۳). از همبستگی بالای این دو آماره در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های مورد مقایسه از نظر اندازه جمعیت تفاوتی با هم ندارند و F_{ST} محاسبه شده از دقت قابل قبولی برخوردار بود.

از تعداد ۲۶۲۷۹ SNP باقی‌مانده یک در صد بالایی SNPها (۲۶۰) که شاخص تثبیت F_{ST} آن‌ها بالاتر بودند، انتخاب شدند. میزان F_{ST} در SNPهای منتخب بین ۰/۳۰۴ تا ۰/۴۷۲ بود.

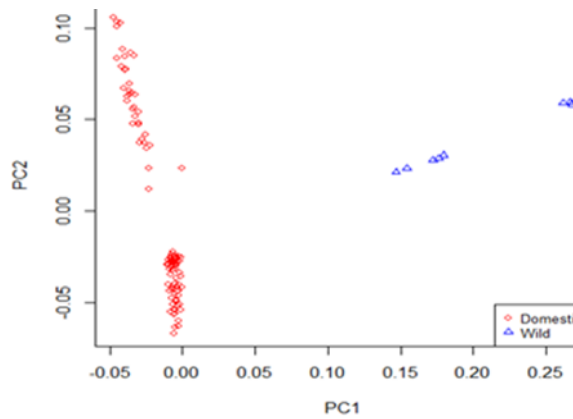
در این مرحله، ابتدا به کمک مختصات نشانگرها، نقشه‌یابی QTL انجام گردید. سپس به کمک نشانگرها، نقشه‌یابی ژنی انجام شد که هر دو مرحله فوق توسط نرم‌افزار plink صورت گرفت. علاوه‌براین، از پایگاه DAVID برای تعیین مسیرهای زیستی استفاده گردید. در این مرحله، فرض بر این است که ژن‌هایی که در یک طبقه عملکردی قرار می‌گیرند، می‌توانند به‌عنوان یک گروه از ژن‌هایی که برخی از ویژگی‌های خاص و مشترک دارند، در نظر گرفته شوند. همچنین برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های به‌دست‌آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی UniProtKB و GeneCards (<http://www.genecards.org>) استفاده شد.

نتایج و بحث

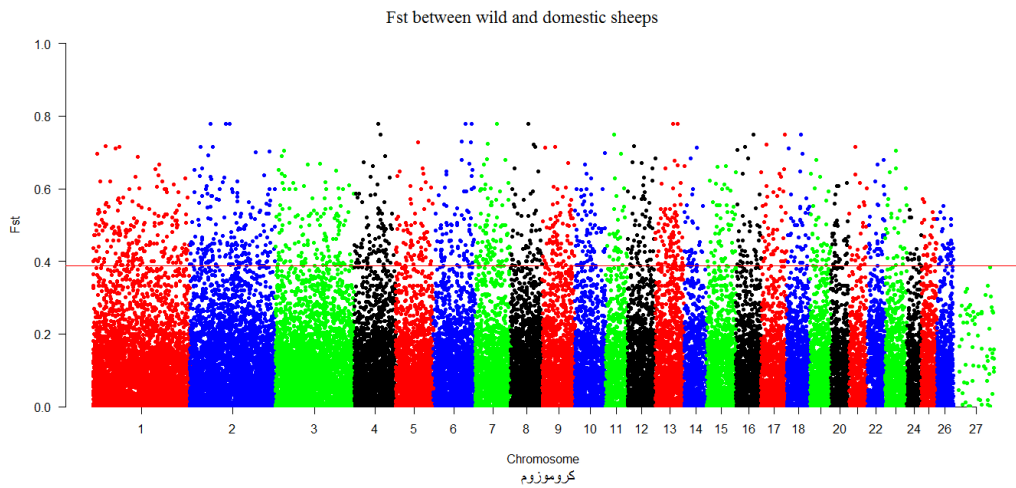
پس از مراحل ویرایش داده‌ها، در نهایت ۳۴۵۵۶ نشانگر SNP مربوط به ۱۱۴ حیوان (۱۰۶ نمونه اهلی، هشت نمونه وحشی) برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی انتخاب شدند. مراحل مختلف ویرایش داده‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

در این تحقیق، ساختار جمعیتی نژادهای گوسفند وحشی و اهلی بررسی و مقایسه شد. برای بررسی نحوه قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های نژادی، تجزیه و تحلیل PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی نمونه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که حیوانات با استفاده از این دو مؤلفه در دو گروه جداگانه قرار گرفتند و در هیچ نقطه‌ای هم پوشانی نداشتند (شکل ۱).

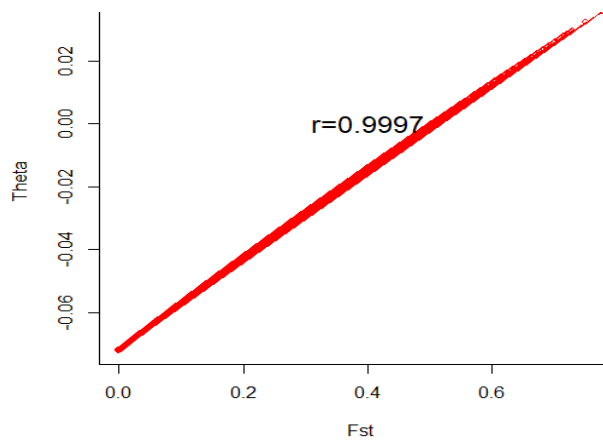
در این پژوهش، برای شناسایی بهتر مناطق ژنگانی تحت انتخاب



شکل ۱- خوشه‌بندی حیوانات بر پایه تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از داده‌های SNP کل ژنوم
Figure 1- Animal clustering based on principal component analysis (PCA) using whole genome SNP data
 گوسفندان وحشی با رنگ آبی و گوسفندان اهلی با رنگ قرمز مشخص شدند.
 Wild and domestic sheep individuals were shown in blue and red, respectively.



شکل ۲- توزیع ارزش‌های Win5theta تا در کروموزوم‌های گوسفندان اهلی و وحشی
Figure 2- Distribution of Win5theta values at the chromosomes of domestic and wild breeds



شکل ۳- مقایسه ضرایب F_{ST} به روش رایت و ضرایب نارایب تا به روش ویر و کوکرهام در تمام SNP‌های ژنوتیپ شده در حیوانات اهلی و وحشی
Figure 3- Comparison of F_{ST} coefficients by Wright's method and unbiased theta coefficients by Weir and Cockerham's method in all genotyped SNPs in domestic and wild animals

جدول ۲- دسته‌بندی QTLها ی شناسایی شده در این مطالعه و تعداد تکرار آنها
Table 2- Classification of QTLs identified in this study and their number of repetitions

QTL جایگاه صفت کمی	نام کامل Full name	تعداد تکرار The number of repetitions	QTL	نام کامل Full name	تعداد تکرار The number of repetitions
استخوان Bone	تراکم استخوانی Bone density QTL	4	عملکرد پروتئین شیر Milk protein yield {180d} QTL	24	
	ناحیه استخوانی Bone area QTL	2	درصد پروتئین شیر Milk protein percentage QTL	11	
	مجموع استخوان Total bone QTL (95786)	1	درصد چربی شیر Milk fat percentage QTL	9	
	تراکم ماهیچه Muscle density QTL (95863)	1	عملکرد شیر Milk Yield {180d} QTL	58	
چربی Fat	تراکم چربی Fat density QTL (95832)	1	میزان چربی شیر Milk fat yield	90	
	وزن چربی در لاشه Fat weight in carcass QTL (95821)	1	بار میکروبی شیر Milk bacterial count QTL (138645)	5	
	صفات مربوط به صدای هنگام مبارزه Vocalization during arena test QTL (146906)	1	درصد لاکتوز شیر Milk lactose percentage QTL (181706)	1	
	صفات مربوط صدا Vocalization behavior QTL (146868)	1	تعداد سلولهای سوماتیک شیر somatic cell count	3	
کیل Breech	صفات مرتبط با شکل زایش Breech Traits QTL (146980)	1	وزن بدن در ۲۰ هفته Body weight (20 weeks) QTL (193069)	1	
	نسبت ماهیچه به استخوان Muscle-to-bone ratio QTL (95867)	1	زمان انعقاد مایه پنبه Rennet coagulation time QTL (213379)	1	
لاشه Carcass	تراکم چربی Fat density QTL	3	زمان سفت شدن کشک Curd firming time QTL (213380)	2	
	مجموع استخوان Total bone QTL	2	مجموع استخوان Total bone QTL	7	
	ناحیه استخوانی Bone area QTL	2	تراکم ماهیچه Muscle density QTL	6	
	وزن چربی در لاشه Fat weight in carcass QTL (95819)	1	درصد استخوان‌های لاشه Carcass bone percentage QTL	2	
چربی Fat	مجموع ناحیه چربی Total fat area QTL (95837)	2	نسبت ماهیچه به استخوان muscle-to-bone ratio QTL (95867)	1	
	تراکم ماهیچه Muscle density QTL (95862)	1	وزن چربی در لاشه fat weight in carcass QTL (95820)	1	

ادامه جدول ۲ Continue the table ۲

مدفوع	تعداد تخم در مدفوع	26	ناحیه استخوانی	1
Fecal	Fecal egg count QTL (213234)		Bone area QTL (95797)	
ایمونوگلوبولین	سطح ایمونوگلوبولین ۱	3	مجموع ناحیه چربی	3
Immunoglobulin	Immunoglobulin A level QTL (95629)		Total fat area QTL	
حرکت	تحرک در هنگام مبارزه	2	تراکم چربی	1
Locomotion	Locomotion during arena test QTL (146941)		Fat density QTL (95850)	
گوشه	شاخص تندی گوشه	1	میزان تجمع چربی در دم	1
Meat	Shear force QTL (212019)		Tail fat deposition QTL (126989)	
	رنگ گوشت	1	مجموع ناحیه چربی	9
	Meat color ** QTL (212020)		Total fat area QTL	
	محتوای اسید لینولیک مزدوج گوشت	1	مجموع بره‌های متولد شده	16
	Meat conjugated linoleic acid content QTL (160570)		Total lambs born QTL	
	محتوای اسید چرب امگا-۳ گوشت	3	مجموع استخوان	7
	Meat omega-3 fatty acid content QTL (213275)		Total bone QTL	
	محتوای اسید چرب اشباع گوشت	1	Total fat area QTL	9
	Meat saturated fatty acid content QTL (160552)		مجموع ناحیه چربی	
	محتوای اسید پالمیتیک گوشت	2	ناحیه استخوانی	7
	Meat palmitoleic acid content QTL (160560)		Bone area QTL	
	محتوای اسید چرب غیر اشباع یگانه گوشت	2	درصد چربی شیر	1
	Meat monounsaturated fatty acid content QTL (160562)		Milk fat yield {180d} QTL (169319)	
	نسبت اسید چرب امگا ۳ به امگا ۶ در گوشت	2	صفات مربوط به صدا در هنگام مبارزه	4
	Meat omega-6 to omega-3 fatty acid ratio QTL (160579)		Vocalization during arena test QTL	
	محتوای اسید میریستیک در گوشت	2	Breech Traits QTL	2
	Meat myristic acid content QTL (160545)		صفات مرتبط با شکل زایش	2
			صفات مربوط به صدای هنگام مبارزه	2
			Vocalization during corridor test QTL (140523)	
			صفات مربوط به صدا	1
			Vocalization behavior QTL (146868)	

می‌باشند. دنگ و همکاران ژن CHD2 را مرتبط با کیفیت باروری اسپرم تشخیص دادند (Deng et al., 2018). لیو و همکاران در بررسی جمعیتی از گوسفند ژن EBF4 را مرتبط با رنگ بدن گزارش کردند (Liu et al., 2015). ژن‌های EIF4G3 و FAM13A در مسیر سنتز پروتئین شیر حیاتی تشخیص داده شده‌اند (Suárez-Vega et al., 2016).

نتایج بررسی ژن‌های گوسفند و بز نشان داده است که ژن‌های GABRB1 و KCND2 با مسیرهای زیستی مرتبط بوده و در پاسخ به درد فعالیت دارند (Deng et al., 2018; Taheri et al., 2020). همچنین وینر و همکاران در بررسی جمعیتی از گوسفندان اتیوپی، ژن GABRB1 را یکی از ژن‌های کاندید برای سازگاری به شرایط محیطی گزارش کرد (Wiener et al., 2021). با توجه به شرایط نامساعد جوی محل زندگی نژادهای این تحقیق همانند اتیوپی به نظر می‌رسد برای این ژن هم انتخاب طبیعی صورت گرفته است.

گروهی از محققان در مطالعات مجزا بر روی گاوهای چینی، ژن GLRB را مرتبط با سیستم عصبی و پاسخ به محرک‌ها تشخیص دادند (Dong et al., 2014; Yang et al., 2017). در مطالعه لی و همکاران، نشانه‌های انتخاب خوک تبتی دریافتند که ژن GNA14 توسط هیپوکسی ایجاد می‌شود و نقش مهمی در جفت دارد و عملکرد اندوتلیال عروقی جنین تحت هیپوکسی مزمن به دلیل عملکرد این ژن است. لی و همکاران در تحقیقی بر روی کل ژنوم گوسفند اهلی و وحشی دریافتند که ژن GRM3 و MACROD2 در سرطان پستان و همچنین تعداد شاخ مؤثر است (Li et al., 2020).

وَنگ و همکاران در مطالعه پاسخ‌های ژنومی به انتخاب رفتارهای روباه نقره‌ای رام و وحشی (Vulpes vulpes) دریافتند، فراوانی جهش ژن GRM3 در روباه رام تغییر قابل محسوسی پیدا کرده است (Wang et al., 2015). با توجه به اینکه این ژن در تحقیق انجام شده ما هم بین گوسفند اهلی و وحشی با هم اختلاف دارند، می‌توان نتیجه گرفت که ژن GRM3 یک ژن کاندید احتمالی در فرآیند اهلی سازی است.

گونوان و همکاران (Gunawan et al., 2021) در تجزیه و تحلیل ترانس کریپتوم ژن‌های کبدی گوسفند نشان دادند که ژن GSTCD یکی از ژن‌های مهم دخیل در بیوسنتز چربی، چربی‌زایی، رسوب چربی و متابولیسم لیپید است. همچنین سرانیتو و همکاران در بررسی نشانه‌های انتخاب گوسفند و بز مدیترانه‌ای ژن GSTCD را در بز تحت انتخاب معرفی کرد (Serranito et al., 2021).

آلوارز و همکاران در تحقیقی بر روی گوسفند دجالونکی^۱ غرب آفریقا در مورد تأثیر ژنومی سازگاری دام با محیط زیست ژن HERC1 را در این رابطه معنی‌دار توصیف کردند (Álvarez et al., 2020). این ژن نیز می‌تواند یک ژن کاندید احتمالی در فرآیند

SNP‌های انتخابی بعد از انتساب به ژن‌های مربوطه، شامل ۹۵ منطقه ژنومی بودند که روی ۲۳ کروموزوم در دو گونه اهلی و وحشی گوسفند قرار داشتند. بیشترین مناطق روی کروموزوم‌های ۱۳ و ۷ به ترتیب با ۱۴ و ۹ ژن قرار داشتند. به‌طور کلی، به دلیل مدت طولانی اهلی شدن و مشتق شدن دو نژاد اهلی و وحشی گوسفند ایران که بیش از ۱۱۰۰۰ سال می‌باشد (Alvarez et al., 2020) جهش‌های مثبت صورت گرفته در ژنوم فرصت به وقوع پیوستن در کل ژنوم تقریباً به‌صورت یکنواخت را داشته‌اند. این عامل اصلی اختلاف فنوتیپی و ژنوتیپی بین دو نژاد شده است. تعداد ۲۱۹ SNP با اختلاف فراوانی بالا بین دو جمعیت هم‌شناسایی شد که با QTL مشخصی مرتبط نبودند که ممکن است مهم باشند و در تحقیقات آینده QTL‌هایی برای آن‌ها شناسایی شود.

در بررسی QTL‌های شناسایی شده به کمک مختصات نشانگرها با F_{ST} بالا، ۹۵ ژن مرتبط با صفات اقتصادی شناسایی شد. QTL‌های شناسایی شده در مناطق ژنومی مورد نظر در گوسفند بر روی ۱۹ کروموزوم با صفات مهم اقتصادی از جمله کیفیت و کمیت گوشت، شیر، چربی، استخوان، سیستم ایمنی و مقاومت به انگل مرتبط بودند که در جدول ۲ بر اساس صفات مربوطه و تعداد تکرار دسته‌بندی شده‌اند. بیشترین QTL‌ها بر روی کروموزوم‌های ۲، ۳، ۵، ۶ و ۷ قرار داشتند که نشان می‌دهد، بیشترین جهش‌های مثبت بر روی این کروموزوم‌ها صورت گرفته است. همچنین بیشترین تکرار QTL‌ها مربوط به صفات چربی شیر با ۹۰ بار، میزان تولید شیر ۵۸ بار، تعداد تخم انگل در مدفوع ۲۶ بار، پروتئین شیر ۲۴ بار و صفت مجموع بره‌های متولد شده برای هر میش با ۱۶ بار تکرار بود که نشان‌دهنده اهمیت اقتصادی این صفات و اختلاف بالای این صفات بین دو نژاد اهلی و وحشی می‌باشد. دلیل دیگر تکرار زیاد این صفات، مطالعه و شناسایی بیشتر QTL‌ها در رابطه با این صفات با توجه به اهمیت اقتصادی آن‌ها می‌باشد.

ژن‌های شناسایی شده در نواحی مختلف ژنومی می‌توانند به‌عنوان کاندیداهای تحت انتخاب مطرح شوند. شماری از ژن‌های مورد بررسی به‌عنوان نشانه‌های انتخاب، با بررسی‌های پیشین هم‌خوانی داشت. محمدی و همکاران ژن AKAP6 را در گوسفند نژاد زندگی مرتبط با صفت وزن نه ماهگی شناسایی کرده بودند. همچنین ارتباط این ژن در توسعه بافت ماهیچه‌های اسکلتی و نقل و انتقالات یون کلسیم تشخیص داده شده است (Mohammadi et al., 2020).

گوموندس‌دوتیر در بررسی صفات مرتبط با عضله در گوسفند ایسلندی دو ژن AKAP6 و GRID2 را مرتبط دانست (Guomundsdottir, 2015). پروتئین کدگذاری شده توسط GRID2 عضوی از گیرنده‌های گلوتامات یونوتروپیک بوده که مرتبط با گیرنده‌های انتقال‌دهنده عصبی تحریکی غالب در مغز پستانداران

شرق آفریقا و غرب آسیا ژن ZBP1 را از ژن‌های کاندید در تقویت عملکرد ایمنی شناسایی کردند (Mwacharo et al., 2017). کریورچکو و همکاران در مطالعه ژنوم گوسفند مریئوس گوشتی روسی برای ژن‌های کاندید صفات اقتصادی ژن BTB21 را در صفات مرتبط با رشد و توسعه سلول معنی‌دار گزارش کردند (Krivoruchko et al., 2020).

برای درک بهتر عملکرد مولکولی ژن‌های تحت انتخاب مثبت، هستی‌شناسی ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ۳۲ مسیر بیولوژیکی که میزان P-value آن‌ها کمتر از ۰/۰۵ بود، به‌عنوان مسیرهای معنی‌دار معرفی شدند. در جدول ۳ برخی از مسیرهای مهم و معنی‌دار آمده است.

بیشتر مسیرهای زیستی شناسایی شده مربوط به کانال‌های عبور یون‌ها از غشای سلولی، فرآیندهای عصبی عضلات، رشد مغز و مخچه، رشد متانسفالون، انتقال غشایی یون‌های غیر آلی و مسیرهای مرتبط با تنظیم حمل و نقل یون‌ها در غشای سلولی می‌باشد (Deng et al., 2018).

نتیجه‌گیری کلی

بررسی مناطق ژنومی نشان داد که این مناطق به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با صفات کیفیت و کمیت گوشت، شیر، چربی، استخوان، سیستم ایمنی و مقاومت به انگل مرتبط می‌باشند. مشخص نمودن صفات مهم اقتصادی و مکان‌یابی بخش‌هایی از ژنوم که در اثر انتخاب تغییر پیدا کرده‌اند، می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند در کشور مورد استفاده قرار گیرد. البته با توجه به کامل نبودن اطلاعات مربوط به حاشیه‌نویسی عملکردی ژن‌ها در گونه گوسفند و همچنین کوچک بودن جمعیت‌های مورد بررسی، مطالعات بعدی با تعداد نمونه‌های بیشتر و نژادهای بیشتر از گوسفند اهلی و وحشی ایران، درک بهتری از ژن‌های کاندید برای صفات مهم اقتصادی در گونه‌های اهلی و وحشی ایجاد خواهد نمود. همچنین با تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌توانیم زمان و چرای مستقیم شدن نژادها و ژن‌های مسبب آن را مشخص کنیم. با انجام مطالعات بیشتر در رابطه با شناسایی گوسفندان وحشی ایران امید آن است که بتوانیم از این ذخیره ژنتیکی منحصر به فرد در دنیا محافظت کرده و با شناسایی خصوصیات ژنتیکی مطلوب این حیوانات، به‌جای واردات نژادهای خارجی بتوانیم بخشی از کاستی‌های گوسفند اهلی را با انتقال از گوسفند وحشی و یا پرورش خالص آن جبران کنیم.

اهلی‌سازی باشد. چن و همکاران در تجزیه و تحلیل توالی کل ژنوم تعدادی گوسفند بامنشأ موفلون اروپایی و آسیایی و بررسی ژن‌های مربوط به اهلی‌سازی در گوسفند، ژن HERC3 را یکی از ژن‌های مؤثر در پاسخ به ایمنی معرفی کردند (Chen et al., 2021). همچنین الکلالده و همکاران در مطالعه‌ای برای تشخیص نواحی ژنومی مقاومت در برابر انگل‌های دستگاه گوارش در گوسفند استرالیایی، ژن HERC3 را مؤثر در سیستم ایمنی شناسایی کردند (Al Kalaldehy et al., 2019).

جیاو و همکاران ژن IP6K1 در گوسفند را درگیر در مسیر تولید گرما در حیوانات در معرض سرما گزارش کردند (Jiao et al., 2021). دوارته و همکاران، ژن JPH1 در خوک را مرتبط با مسیرهای مربوط به تنظیم متابولیسم بافت چربی و رشد عضلات اسکلتی گزارش کردند (Duarte et al., 2017). تاو و همکاران در مطالعه‌ای برای شناسایی ژن‌های مرتبط با وزن تولد، ژن KCND2 را ژن کاندید معرفی کرد، آن‌ها همچنین برای شناسایی ژن‌های مرتبط به اندازه تولد، ژن MACROD2 را مرتبط با صفت تعداد پستانک گزارش کرد (Tao et al., 2021). همچنین هزارد و همکاران، ژن KCND2 را مرتبط با QTL‌های رفتار مادری گزارش کردند (Hazard et al., 2018). دتو و همکاران، ژن LDB2 را مرتبط با صفات رشد و لاشه در جوجه‌های گوشتی شناسایی کردند (Dou et al., 2022). ونگ و همکاران ژن NBEA را مرتبط با صفات پشم و نیز استرس گرمایی معرفی کردند (Wang et al., 2015).

تزارسیانیدو و همکاران در بررسی ژنومی گوسفند مدیترانه‌ای، ژن NFS1 را مرتبط با صفت رشد غدد پستانی گزارش کردند (Tsartsianidou et al., 2021). همچنین گوان و همکاران، ژن NFS1 را مؤثر در مسیرهای متابولیکی ذکر کردند (et al., 2016). گوان پیکرینگ در بررسی منشأ ژنتیکی گوسفند آراپاوا نیوزلند، ژن NIPA1 را یک نشانه انتخاب معرفی کرد (Pickering, 2013). سوئیت جونز و همکاران در بررسی نشانه‌های انتخاب دو گونه گوسفند سیبری ژن SOCS6 را مسیر تنظیم گیرنده‌های انسولین شناسایی کردند (Sweet-Jones et al., 2021). محققان مختلفی در توالی‌یابی کل ژنوم گوسفند وحشی برای آدپتاسیون به شرایط آب و هوایی ژن USH2A را مرتبط با قدرت بینایی و شنوایی گزارش کردند (Upadhyay et al., 2021; Chen et al., 2021). همچنین عیداو و همکاران در بررسی ژنومی گوسفندان خاورمیانه و آفریقا ژن USH2A را از ژن‌های کاندید مرتبط با مقاومت به بیماری‌ها و آدپتاسیون به شرایط آب و هوا معرفی کرد (Eydivandi et al., 2020).

مواچارو و همکاران در تحقیقی برای شناسایی ردپای ژنومی گوسفند دنبه‌دار مصری برای سازگاری با استرس در زمین‌های خشک

جدول ۳- مسیرهای زیستی شناسایی شده معنی دار مرتبط با مناطق تحت انتخاب در نژادهای اهلی و وحشی

Table 3- Identified significant biological pathways related to the areas under selection in domestic and wild sheep breeds

ژن‌ها Genes	P value	مقادیر Count	بافت هدف Term	دسته Category
ATRN, GRID2, HERC1, RFX4	0.0017	4	توسعه مخچه GO:0021549~cerebellum development	GOTERM_BP_FAT
ATRN, GRID2, HERC1, RFX4	0.0022	4	توسعه متانسفالون GO:0022037~metencephalon development	GOTERM_BP_FAT
GRID2, GABRB1, KCNH5, GLRB, ITGAV, ANO6	0.0043	6	فعالیت کانال دروازه‌دار GO:0022836~gated channel activity	GOTERM_MF_FAT
GRID2, HERC1, RFX4	0.0052	3	مورفوژنز قشر مخچه GO:0021696~cerebellar cortex morphogenesis	GOTERM_BP_FAT
ATRN, GRID2, HERC1, RFX4	0.0056	4	توسعه مغز پسین GO:0030902~hindbrain development	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0059	5	غشا انتقال کاتیون غیر آلی GO:0098662~inorganic cation transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0061	5	غشا انتقال یون‌های غیر آلی GO:0098660~inorganic ion transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
GRID2, HERC1, RFX4	0.0079	3	مورفوژنز مخچه GO:0021587~cerebellum morphogenesis	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0081	5	انتقال کاتیون غشایی GO:0098655~cation transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
GRID2, HERC1, RFX4	0.0089	3	مورفوژنز مغز پسین GO:0021575~hindbrain morphogenesis	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI	0.0099	4	تنظیم مثبت یون‌های عبورکننده GO:0043270~positive regulation of ion transport	GOTERM_BP_FAT
GRID2, GABRB1, KCNH5, GLRB, ITGAV, ANO6	0.0110	6	فعالیت کانال یونی GO:0005216~ion channel activity	GOTERM_MF_FAT
GRID2, HERC1, RFX4	0.0122	3	رشد قشر مخچه GO:0021695~cerebellar cortex development	GOTERM_BP_FAT
GRID2, GABRB1, KCNH5, GLRB, ITGAV, ANO6	0.0125	6	فعالیت اختصاصی کانال زیرلایه GO:0022838~substrate-specific channel activity	GOTERM_MF_FAT
GRID2, GABRB1, KCNH5, GLRB, ITGAV, ANO6	0.0140	6	فعالیت کانال GO:0015267~channel activity	GOTERM_MF_FAT
GRID2, GABRB1, KCNH5, GLRB, ITGAV, ANO6	0.0140	6	غیرفعال کردن کانال زیرلایه GO:0022803~passive transmembrane transporter activity	GOTERM_MF_FAT
OCA2, AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0143	6	حمل و نقل غشایی GO:0055085~transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0143	5	حمل و نقل غشایی یون GO:0034220~ion transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
NIPA1, AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI, ATP6V1C2	0.0192	6	حمل و نقل غشایی کاتیون GO:0034220~ion transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, ATP6V1C2	0.0217	4	حمل و نقل غشایی کاتیون غیر آلی تک ظرفیتی GO:0015672~monovalent inorganic cation transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, SRI	0.0247	3	تنظیم مثبت یون‌های عبورکننده غشایی GO:0034767~positive regulation of ion transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI	0.0259	4	تنظیم یون‌های عبورکننده غشایی GO:0034765~regulation of ion transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT
AKAP6, ANO6, SRI	0.0271	3	تنظیم مثبت عبورکننده غشایی GO:0034764~positive regulation of transmembrane transport	GOTERM_BP_FAT

Continue the table 3			ادامه جدول ۳	
AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI	0.0296	4	تنظیم عبورکننده غشایی GO:0034762~regulation of transmembrane transport(GOTERM_BP_FAT
GRM3, GRID2, GLRB	0.0329	3	غشا پس سیناپسی GO:0045211~postsynaptic membrane	GOTERM_CC_FAT
GRID2, GABRB1, GLRB	0.0337	3	فعالیت کانال عبوردهنده یون‌های خارج سلولی GO:0005230~extracellular ligand-gated ion channel activity	GOTERM_MF_FAT
GRM3, GRID2, GABRB1, GLRB, SH3GL2	0.0347	5	سیناپس GO:0045202~synapse ()	GOTERM_CC_1
GRID2, GLRB, AKAP6, GPD1L	0.0393	4	تنظیم‌کننده بالقوه غشایی GO:0042391~regulation of membrane potential(GOTERM_BP_FAT
NIP1A1, AKAP6, ANO6, GPD1L, SRI	0.0413	5	انتقال‌دهنده یون‌های فلزی GO:0030001~metal ion transport	GOTERM_BP_FAT
CEP250, CCDC92, TTBK2	0.0429	3	سانتریول GO:0005814~centriole	GOTERM_CC_FAT
GRID2, GLRB, AKAP6, ANO6	0.0445	4	کانال‌های یونی ترکیبی GO:0034702~ion channel complex	GOTERM_CC_FAT
GRID2, HERC1, GLRB	0.0456	3	فرآیندهای عصبی - عضلانی GO:0050905~neuromuscular process	GOTERM_BP_FAT

سیاسگزارى

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد و گرنت شماره ۳/۴۸۷۲۸ انجام پذیرفت.

References

- Akey, J. M. (2009). Constructing genomic maps of positive selection in humans: Where do we go from here? *Genome Research*, 19(5),711-722. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.086652.108>.
- Al Kalaldehy, M., Gibson, J., Lee, S. H., Gondro, C., & Van Der Werf, J. H. (2019). Detection of genomic regions underlying resistance to gastrointestinal parasites in Australian sheep. *Genetics Selection Evolution*, 51(1),1-18. <http://dx.doi.org/10.1186/s12711-019-0479-1>.
- Álvarez, I., Fernández, I., Traoré, A., Pérez-Pardal, L., Menéndez-Arias, N. A., & Goyache, F. (2020). Ancient homozygosity segments in West African Djallonké sheep inform on the genomic impact of livestock adaptation to the environment. *Animals*, 10(7),1178. <http://dx.doi.org/10.3390/ani10071178>.
- Bakhshalizadeh, S., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2021). Meta-analysis of genome-wide association studies for somatic cells score trait in dairy cows. *Journal of Ruminant Research*, 9(3),39-58. <http://dx.doi.org/10.22069/ejrr.2021.19036.1787> (In Persian).
- Chen, Z.H., Xu, Y.X., Xie, X.L., Wang, D.F., Aguilar-Gómez, D., Liu, G.J., Li, X., Esmailzadeh, A., Rezaei, V., Kantanen, J., Ammosov, I. Nosrati, M., Periasamy, K., Coltman, D.W., Lenstra, L.A., Nielsen, R., & Li M.H. (2021). Whole-genome sequence analysis unveils different origins of European and Asiatic mouflon and domestication-related genes in sheep. *Communications Biology*, 4(1),1-15. <http://dx.doi.org/s42003-021-02817-4>.
- Deng, X., Wang, D., Wang, S., Wang, H., & Zhou, H. (2018). Identification of key genes and pathways involved in response to pain in goat and sheep by transcriptome sequencing. *Biological Research*, 51. <http://dx.doi.org/10.1186/s40659-018-0174-7>.
- Dong, K., Yao, N., Pu, Y., He, X., Zhao, Q., Luan, Y., Guan, W., Rao, S., & Ma, Y. (2014). Genomic scan reveals loci under altitude adaptation in Tibetan and Dahe pigs. *PLoS One*, 9(10),e110520. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110520>.
- Dou, D., Shen, L., Zhou, J., Cao, Z., Luan, P., Li, Y., Xiao, F., Guo, H., Li, H., & Zhang, H. (2022). Genome-wide association studies for growth traits in broilers. *BMC Genomic Data*, 23(1),1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/s12863-021-01017-7>.
- Duarte, D.A.S., Fortes, M.R.S., de Souza Duarte, M., Guimarães, S.E., Verardo, L.L., Veroneze, R., Ribeiro, A.M.F., Lopes, P.S., de Resende, M.D.V., & e Silva, F.F. (2017). Genome-wide association studies, meta-analyses and derived gene network for meat quality and carcass traits in pigs. *Animal Production Science*, 58(6),1100-1108. <http://dx.doi.org/10.1071/AN16018>.

10. Durinck, S., Spellman, P. T., Birney, E., & Huber, W. (2009). Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nature protocols*, 4(8),1184-1191. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.97>.
11. Eydivandi, S., Sahana, G., Momen, M., Moradi, M. H., & Schönherz, A. A. (2020). Genetic diversity in Iranian indigenous sheep vis-à-vis selected exogenous sheep breeds and wild mouflon. *Animal Genetics*, 51(5),772-787. <http://dx.doi.org/10.1111/age.12985>.
12. Forough Ameri, N., Asadi Fouzi, M., & Vasmeilzade Keshkoi, A., (2015). Whole genome scanning of eight indigenous breeds of Iranian cattle to identify selection markers. *Livestock Production Magazine*, 18(2),201-213. (In Persian).
13. Guan, D., Luo, N., Tan, X., Zhao, Z., Huang, Y., Na, R., Zhang, J., & Zhao, Y. (2016). Scanning of selection signature provides a glimpse into important economic traits in goats (*Capra hircus*). *Scientific Reports*, 6(1),1-7. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36372>.
14. Gunawan, A., Listyarini, K., Harahap, R.S., Jakaria, Roosita, K., Sumantri, C., Inounu, I., Akter, S.H., Islam, M.A., & Uddin, M.J. (2021). Hepatic transcriptome analysis identifies genes, polymorphisms and pathways involved in the fatty acids metabolism in sheep. *PloS One*, 16(12),e0260514. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0260514>.
15. Guomundsdottir, O. O. (2015). Genome-wide association study of muscle traits in Icelandic sheep (Doctoral dissertation). (Doctoral dissertation).
16. Hazard, D., Mace, T., Foulquie, D., Delval, E., Douls, S., Carriere, F., Pradel, J., Moreno, C., & Boissy, A. (2018). Genome wide association studies of maternal behaviours in sheep. In: 11. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP), pp. 1130-p. Massey Universtiy.
17. Jiao, D., Ji, K., Liu, H., Wang, W., Wu, X., Zhou, J., Zhang, Y., Zhou, H., Hickford, J.G., Degen, A.A., & Yang, G. (2021). Transcriptome analysis reveals genes involved in thermogenesis in two cold-exposed sheep breeds. *Genes*, 12(3),375. <http://dx.doi.org/10.3390/genes12030375>.
18. Krivoruchko, A. Y., Yatsyk, O. A., & Safaryan, E. Y. (2020). Candidate genes for productivity identified by genome-wide association study with indicators of class in the Russian meat merino sheep breed. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 24(8),836. <http://dx.doi.org/10.18699/VJ20.681>.
19. Li, Z., He, X., Zhang, X., Zhang, J., Guo, X., Sun, W., & Chu, M. (2020). Transcriptome profile of key CircRNAs and MiRNAs in oviduct that affect sheep reproduction. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-67727/v1>.
20. Liu, G., Liu, R., Tang, X., Cao, J., Zhao, S., & Yu, M. (2015). Expression profiling reveals genes involved in the regulation of wool follicle bulb regression and regeneration in sheep. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5),9152-9166. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms16059152>.
21. Mohammadi, F., Tahmoorespur, M., & Javadmanesh, A. (2019). Study of differentially expressed genes, related pathways and gene networks in sheep fetal muscle tissue in thin-and fat-tailed breeds. *Animal Sciences Journal*, 32(123),301-312. <http://dx.doi.org/10.22092/asj.2018.122913.1749>.
22. Mohammadi, H., Rafat, S. A., Moradi Shahrabak, H., Shodja, J., & Moradi, M. H. (2020). Genome-wide association study and gene ontology for growth and wool characteristics in Zandi sheep. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8(2),45-55. <http://dx.doi.org/10.22103/jlst.2020.15795.1317>. (In Persian).
23. Moradi, M. H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrabak, M., Dodds, K. G., & McEwan, J. C. (2012). Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep breeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. *BMC Genetics*, 13(1),1-15. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-13-10>.
24. Mwacharo, J. M., Kim, E. S., Elbeltagy, A. R., Aboul-Naga, A. M., Rischkowsky, B. A., & Rothschild, M. F. (2017). Genomic footprints of dryland stress adaptation in Egyptian fat-tail sheep and their divergence from East African and western Asia cohorts. *Scientific reports*, 7(1),1-10. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17775-3>.
25. Oldenbroek, K. (Ed.). (2007). *Utilisation and Conservation of Farm Animal Genetic Resources*. Wageningen Academic Publishers.
26. Pickering, N. K. (2013). Genetics of flystrike, dagginess and associated traits in New Zealand dual-purpose sheep. A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Animal Science at Massey University, Palmerston North, New Zealand (Doctoral dissertation, Massey University).
27. Kaveh Pishghadam, N., Malekian, M., & Adavodi, R. (2017). Genetic assessment of funding population of wild sheep (*Ovis orientalis*) in Chadegan captive breeding site. *Journal of Animal Environment*, 9(3),41-48. <http://dx.doi.org/20.1001.1.27171388.1396.9.3.6.6>.(In Persian).
28. Qanbari, S., Strom, T.M., Haberer, G., Weigend, S., Gheyas, A.A., Turner, F., Burt, D.W., Preisinger, R., Gianola, D., & Simianer, H. (2012). A high resolution genome-wide scan for significant selective sweeps: An application to pooled sequence data in laying chickens. *PloS one*, 7(11),e49525. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049525>.
29. Qanbari, S., Pausch, H., Jansen, S., Somel, M., Strom, T.M., Fries, R., Nielsen, R., & Simianer, H. (2014). Classic selective sweeps revealed by massive sequencing in cattle. *PLoS Genetics*, 10(2),e1004148. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004148>.

30. Sabeti, P.C., Reich, D.E., Higgins, J.M., Levine, H.Z., Richter, D.J., Schaffner, S.F., Gabriel, S.B., Platko, J.V., Patterson, N.J., McDonald, G.J., & Ackerman, H.C., Campbell, S. J., Altshuler, D., Cooper, R., Kwiatkowski, D., Ward, R., & Lander, E. S. (2002). Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 419(6909),832-837. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01140>.
31. Sabeti, P.C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., Hostetter, E., Cotsapas, C., Xie, X., Byrne, E.H., McCarroll, S.A., Gaudet, R., & Schaffner, S.F. (2007). Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. *Nature*, 449(7164),913-918. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06250>.
32. Serranito, B., Cavalazzi, M., Vidal, P., Taurisson-Mouret, D., Ciani, E., Bal, M., Rouvellac, E., Servin, B., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Hall, S.J. & Da Silva, A. (2021). Local adaptations of Mediterranean sheep and goats through an integrative approach. *Scientific Reports*, 11(1),1-17. <http://dx.doi.org/s41598-021-00682-z>.
33. Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., & Arranz, J. J. (2016). Transcriptome expression analysis of candidate milk genes affecting cheese-related traits in 2 sheep breeds. *Journal of Dairy Science*, 99(8),6381-6390. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11048>.
34. Sweet-Jones, J., Yurchenko, A. A., Igoshin, A. V., Yudin, N. S., Swain, M. T., & Larkin, D. M. (2021). Resequencing and signatures of selection scan in two Siberian native sheep breeds point to candidate genetic variants for adaptation and economically important traits. *Animal Genetics*, 52(1),126-131. <http://dx.doi.org/10.1111/age.13015>.
35. Tao, L., He, X.Y., Wang, F.Y., Pan, L.X., Wang, X.Y., Gan, S.Q., Di, R., & Chu, M.X. (2021). Identification of genes associated with litter size combining genomic approaches in Luzhong mutton sheep. *Animal Genetics*, 52(4),545-549. <http://dx.doi.org/10.1111/age.13078>.
36. Taheri, S., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2020). Investigating genetic diversity and traces of selection in Iranian domestic and wild sheep and goats. M.Sc.Thesis of Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Mashhad, Iran. (In Persian).
37. Tsartsianidou, V., Sánchez-Molano, E., Kapsona, V.V., Basdagianni, Z., Chatziplis, D., Arsenos, G., Triantafyllidis, A., & Banos, G. (2021). A comprehensive genome-wide scan detects genomic regions related to local adaptation and climate resilience in Mediterranean domestic sheep. *Genetics Selection Evolution*, 53(1),1-17. <http://dx.doi.org/10.1186/s12711-021-00682-7>.
38. Upadhyay, M., Kunz, E., Sandoval-Castellanos, E., Hauser, A., Krebs, S., Graf, A., Blum, H., Dotsev, A., Okhlopov, I., Shakhin, A., Bagirov, V., & Medugorac, I. (2021). Whole genome sequencing reveals a complex introgression history and the basis of adaptation to subarctic climate in wild sheep. *Molecular Ecology*, 30(24),6701-6717. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.16184>.
39. Wang, H., Zhang, L., Cao, J., Wu, M., Ma, X., Liu, Z., Liu, R., Zhao, F., Wei, C., & Du, L. (2015). Genome-wide specific selection in three domestic sheep breeds. *PloS One*, 10(6),e0128688. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128688>.
40. Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(7),1358-1370.
41. Wiener, P., Robert, C., Ahbara, A., Salavati, M., Abebe, A., Kebede, A., Wragg, D., Friedrich, J., Vasoya, D., Hume, D.A., Djikeng, A., & Clark, E. L. (2021). Whole-genome sequence data suggest environmental adaptation of Ethiopian sheep populations. *Genome Biology and Evolution*, 13(3), evab014. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evab014>.
42. Yang, J.I., Li, W.R., Lv, F.H., He, S.G., Tian, S.L., Peng, W.F., Sun, Y.W., Zhao, Y.X., Tu, X.L., Zhang, M., Xie, X.L., & Liu, M. J. (2016). Whole-genome sequencing of native sheep provides insights into rapid adaptations to extreme environments. *Molecular Biology and Evolution*, 33(10),2576-2592. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw129>.
43. Zeraatpisheh, Y., Zerehdaran, S., & Javadmanesh, A. (2022). Investigation of metabolic pathways of genes related to the QTL of parasite resistance trait in sheep genome using gene network and gene ontology. *Veterinary Researches & Biological Products*. <http://dx.doi.org/10.22092/vj.2022.357660.1941>. (In Persian).



Comparison of Different Genomic Relationship Matrices for Multibreed Weighted Single Step GWAS

Seyed Mostafa Mazloom¹, Mohammad Mahdi Shariati^{2*}

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

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

*Corresponding Author's Email: mm.shariati@um.ac.ir

Received: 16-10-2022
Revised: 17-04-2023
Accepted: 21-05-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Mazloom, S. M., & Shariati, M. M. (2023). Comparison of different genomic relationship matrices for multibreed weighted single step GWAS. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 585-597. (in Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79619.1108>

Introduction: Genomic best linear unbiased prediction (GBLUP) and Bayesian methods are used for genomic selection (GS) and genome wide association study (GWAS) in animal and plant breeding. The main objective of GWAS is detection of quantitative trait loci (QTL) that is affecting trait. The GBLUP assumes equal variance for all markers but the Bayesian methods assumes specific variance for each marker. When trait are affecting by major QTLs, Bayesian methods have the benefit of marker selection. In weighted GBLUP (WGBLUP), disparate variance of marker specific weights for weighting of all markers are used. If only a deduction of animals is genotyped, single-step WGBLUP (WssGBLUP) can be used. The weighting factors were calculated using marker effect derived Bayesian methods or iteratively based on single step marker effect. In multibreed genomic evaluation, there are several specific genetic structures into a genomic relationship matrix (G). The block wise genomic relationship matrix (BG) consist of several specific relationship blocks for each and pair breeds. BG can more accurately calculated relationships among animals than G matrix in multibreed genomic evaluations. The aim of this study is comparison G and BG and weighted BG (WBG) in weighted single step GWAS.

Materials and Methods: To conduct our study, we initially simulated two distinct populations, labeled as A and B, utilizing the QMSim software. The simulation involved the creation of two chromosomes, each spanning a length of two morgans. Within each chromosome, we simulated 2500 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Subsequently, four traits were simulated, each possessing heritabilities of 0.05 and 0.3, along with varying numbers of quantitative trait loci (QTLs) set at 50 and 500. Following the simulation, we calculated the genetic value (G), the breeding value given by markers (BG), and the weighted breeding value given by markers (WBG) using SNP genotypes for all animals in the study. This comprehensive approach allowed us to evaluate and analyze the genetic and breeding values associated with the simulated traits across the populations. Genomic relationship matrices were used for single step GWAS (SSGWAS) analysis for each trait. 10 iterations was considered for single step SNP effect analyses. Moreover, the SNP effects were obtained by BayesB approach. BayesB effects was used for calculated weighting factors in WBG. Accuracies of methods and number of identified SNPs with explained genetic variance higher than 1% were reported.

Results and Discussion: using G and BG and WBG in SSGWAS led to identify 14, 16 and 21 SNP with higher than one percentage variance explained, respectively. Moreover, convergent accuracies of WssGBLUP using G and BG and WBG were 0.36, 0.39 and 0.43, respectively. WssGBLUP using WBG could be converged faster than using G and BG. Furthermore, accuracy of WssGBLUP using WBG was significantly more than



using G and BG. Multibreed GWAS is led to increase power of model because phenotypic information is severely increase. In multibreed GWAS, relationships among breeds usually are rare or zero but there are several locations among breeds that shared among them and should use those for genomic relationship calculation. In WBG and BG could be accurately calculate pair breeds genomic relationships using sharing pair breeds genomic locations. Principal component analyses showed that WBG was let to strongly increase genomic relationship among animals that is led to improved power of WssGWAS.

Conclusion: According to recent studies, multibreed genomic evaluation with the WssGBLUP can improve the accuracy of multibreed genomic evaluation, and the results of our study showed that for multibreed genomic evaluation and WssGWAS with the WssGBLUP , instead of the genomic relationship matrix (G), BG or WBG genomic relationship matrices are the better to use.

Keywords: Multibreed GWAS, Block wise genomic relationship matrix, WssGWAS, WssGBLUP, Explained genetic variance

مقایسه ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی متفاوت در پویش ژنومی وزن‌دهی شده چند

جمعیتی

سید مصطفی مظلوم^۱ و محمدمهدی شریعتی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، انتخاب بهترین ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی برای پویش ژنومی چندجمعیتی است. ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها منحصر به فرد هستند، بنابراین برای تشکیل ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی چند جمعیتی از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده استفاده می‌شود. در این مطالعه، ابتدا دو جمعیت با ساختار ژنتیکی متفاوت شبیه‌سازی شدند. سپس ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی معمولی (G)، ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده (BG) و ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده با واریانس ژنوتیپی برآورد شده با بیز (WBG) برای حیوانات تشکیل شدند و برای مطالعات پویش ژنومی تک مرحله‌ای استفاده شدند. علاوه بر آن، با روش بیز B پویش ژنومی انجام شد و با پویش‌های ژنومی تک مرحله‌ای مقایسه شدند. نتایج پویش ژنومی با استفاده از ماتریس‌های روابط خویشاوندی G، BG و WBG نشان داد که به طور میانگین به ترتیب ۱۴، ۱۶، ۲۱ نشانگر ژنومی مرتبط با QTL‌های صفات شناسایی شدند که واریانس ژنتیکی توجیه شده بالای یک درصد دارند. همچنین با استفاده از روش آماری بیز B تنها دو نشانگر ژنومی با واریانس بالای یک درصد شناسایی شدند. علاوه بر این، میانگین صحت‌های پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی در لحظه هم‌گرایی با استفاده از ماتریس‌های G، BG و WBG به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۳۹، ۰/۴۳ برآورد شدند. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که استفاده از ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی BG و WBG می‌تواند باعث بهبود پویش ژنومی چندجمعیتی یا چندنژادی شود.

واژه‌های کلیدی: بیز B، پویش ژنومی چند جمعیتی، ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوکی، ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی

مقدمه

بلوک‌های هاپلوتایپی کامل طی نسل‌ها باعث شده است که با سهولت بیشتر نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با صفات اقتصادی در حیوانات اهلی شناسایی شوند (Liu et al., 2023; van den Berg et al., 2016). روش‌های آماری رگرسیون خطی و بیزی معمولاً برای GWAS در حیوانات و گیاهان و مطالعات بیماری‌های انسانی استفاده می‌شوند (Meuwissen et al., 2009; Reales and Wallace, 2023). هدف اصلی GWAS شناسایی جایگاه‌های صفت کمی (QTL) با تأثیر عمده است. اخیراً با معرفی روش آماری پویش ژنومی تک مرحله‌ای (ssGWAS) برای برآورد واریانس ژنتیکی نشانگرهای ژنومی از پیش‌بینی ارزش اصلاحی به روش آماری پیش‌بینی ناریب خطی تک مرحله‌ای (ssGBLUP) استفاده می‌شود (Wang et al., 2012; Wijesena et al., 2023). پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی و واریانس ژنتیکی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) را می‌توان به راحتی از هر دو روش GBLUP و بیزی به دست آورد (Goddard

پویش گسترده ژنومی (GWAS) با استفاده از اطلاعات فنوتیپی صفات و ژنوتیپ نشانگرهای ژنومی (SNPs)، واریانس‌های ژنومی مرتبط با جایگاه‌های صفات کمی (QTL) را شناسایی می‌کند. با افزایش دسترسی به توالی‌یابی ژنومی شناسایی واریانس‌ها و ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی در حیوانات اهلی نسبت به گذشته آسان‌تر شده است. علاوه بر این، وجود عدم تعادل لینکاژی (LD) تقریباً گسترده بین نشانگرهای ژنومی و جایگاه‌های صفات کمی و انتقال

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

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

*- نویسنده مسئول: (Email: mm.shariati@um.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.79619.1108>

منجر به بهبود پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی شود (Tiezzi and Maltecca, 2015; Zhang et al., 2014; Su et al., 2014).

چندین روش برای ساخت ضرایب وزن‌دهی نشانگرهای ژنومی معرفی شده است. به‌عنوان مثال، روش‌های استفاده از نتایج آزمون رگرسیونی پویس ژنومی ($-\log(p\text{-value})$) و استفاده از واریانس ژنتیکی نشانگرهای ژنومی برآورد شده با اثرات جایگزینی آلی نشانگرهای ژنومی ($2pq\alpha^2$) برای وزن‌دهی نشانگرهای ژنومی استفاده می‌شوند (Gualdrón Duarte et al., 2020; Su et al., 2014).

2020: اخیراً، مطالعات وزن‌دهی ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی نشان داده است که وزن‌دهی نشانگرهای ژنومی با استفاده از واریانس ژنتیکی برآورد شده با اثرات نشانگرهای ژنومی برآورد شده از پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی GBLUP و ssGBLUP می‌تواند باعث بهبود پویس ژنومی شود (Wang et al., 2014).

وَنگ و همکاران (Wang et al., 2014) با شبیه‌سازی داده‌های ژنومی نشان دادند که با روشی چند مرحله‌ای وزن‌دهی نشانگرهای ژنومی با اثرات برآورد با استفاده از ارزش‌های اصلاحی پیش‌بینی شده با روش WssGBLUP و برآورد اثرات نشانگری با استفاده از اطلاعات آخرین تکرار وزن‌دهی باعث می‌شود که محدوده QTL‌ها را با دقت بیشتری نسبت به روش‌های بیزی نظیر بیز B شناسایی کرد (Zhang et al., 2016) در روش پویس ژنومی وزن‌دهی شده تک مرحله‌ای (WssGWAS) به دلیل اینکه هم‌زمان از اطلاعات حیوانات ژنوتیپ شده و فاقد ژنوتیپ برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی استفاده می‌شود و صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی افزایش قابل ملاحظه‌ای دارد، می‌تواند با دقت و توان بالاتری نسبت به روش‌های بیزی جایگاه‌های صفت کمی را شناسایی نماید (Wang et al., 2014). مطالعات پویس ژنومی و انتخاب ژنومی اخیر نشان داده است که افزایش اندازه جمعیت می‌تواند به توان آماری برای شناسایی QTL‌های صفت و پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی کمک کند. بنابراین، مطالعات ژنومی چند نژادی یا چند جمعیتی بسیار حائز اهمیت شده است (Erbe et al., 2012; Raven et al., 2014).

وارونز و همکاران (Veroneze et al., 2016)، به روش‌های معمولی و بلوک‌بندی شده ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی تشکیل دادند و به‌روش GBLUP برای حیوانات دو نژاد خوک ارزش اصلاحی ژنومی پیش‌بینی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده (BG) باعث افزایش صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی قابل ملاحظه‌ای شده است، همچنین در این مطالعه ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده وزن‌دهی (WBG) شد و نسبت به غیر وزن‌دهی شده (BG) آن صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی بالاتری نشان داد. در مطالعه‌ای دیگر، آوارنگا و همکاران (Alvarenga et al., 2020) با شبیه‌سازی، جمعیت‌های آمیخته و خالص پدری و مادری در قالب

(Tiezzi and Hayes, 2009) یک توزیع نرمال را برای اثرات SNP فرض می‌کند و اثر آن‌ها را از روی فنوتیپ‌ها و ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی (G) محاسبه می‌کند. هنگامی که فقط تعداد اندکی از افراد یک جمعیت تعیین ژنوتیپ می‌شوند، GBLUP تک مرحله‌ای (ssGBLUP) روش مناسبی برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی حیوانات است (Aguilar et al., 2010). اطلاعات اضافی در مورد حیوانات فاقد ژنوتیپ، صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی افزایش می‌دهد (Legarra et al., 2015).

روش‌های بیزی نظیر بیز A و بیز B روش‌های غیرخطی هستند که برای برآورد اثر جایگزینی آلی هر یک از نشانگرهای ژنومی (SNPs)، توزیع پیشین واریانس اثرات ژنتیکی در نظر می‌گیرند و سپس با توزیع پسین واریانس اثرات ژنتیکی و از طریق زنجیره نمونه‌گیری مونتوکارلو (MCMC) اثرات نشانگرهای ژنومی برآورد می‌شود (Meuwissen et al., 2009). اما روش‌های آماری GBLUP و ssGBLUP برای تمامی نشانگرهای ژنومی توزیع و وزن یکسانی را در نظر می‌گیرند (Vanraden, 2008). توزیع اثرات ژن‌ها در صفات اقتصادی یکسان نیست، بلکه در بسیاری از صفات اقتصادی تعداد اندکی جایگاه صفت کمی (QTL) عمده اثر هستند و دیگر جایگاه‌های صفت کمی اثرات جزئی دارند (Cesarani et al., 2022). در روش‌های بیزی با وزن‌دهی مخصوص به‌عنوان پیش‌فرض به نشانگرهای ژنومی، سعی بر این است که نشانگرهایی که با جایگاه‌های صفت کمی (QTLs) عمده اثر پیوستگی دارند و اثرات بزرگی دارند، شناسایی شوند (Su et al., 2014; Zhang et al., 2010).

مطالعات شبیه‌سازی نشان داده است، زمانی که صفت دارای تعداد اندکی QTL با اثرات بزرگ است، روش‌های آماری بیزی نسبت به GBLUP کارایی بالاتری برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی و پویس ژنومی دارند (Lund et al., 2009; Gao et al., 2012). در مطالعات واقعی در گاوشیری نتایج نشان داده است، به دلیل فراوانی بالای QTL‌ها در صفات اقتصادی روش‌های بیزی صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی کمتری نسبت به روش‌های GBLUP و ssGBLUP دارند (Su et al., 2010; Cole et al., 2009).

یکی از روش‌های گنجاندن واریانس اختصاصی برای نشانگرهای ژنومی در روش آماری GBLUP، وزن‌دهی نشانگرهای ژنومی به هنگام تشکیل ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی (G) است (Zhang et al., 2010). در این روش آماری (WGBLUP)، پیش‌بینی ارزش اصلاحی تک مرحله‌ای با توزیع واریانس ژنتیکی نشانگرهای ژنومی مشابه روش‌های بیزی انجام می‌شود و هر نشانگر ژنومی بر اساس میزان پیوستگی و ارتباطی که با QTL‌های صفت دارد، وزن مخصوص به خود می‌گیرد و اصطلاحاً ماتریس روابط خویشاوندی وزن‌دهی اختصاصی (GW) می‌شود. در بسیاری مطالعات نشان داده شده است که وزن‌دهی ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی می‌تواند

نتیجه این فرآیند ساخت جمعیت منجر به شبیه‌سازی جمعیت تاریخی شد. برای ایجاد LD در فاصله ژنتیکی بلند و ایجاد ساختار ژنتیکی جمعیت ثانویه، ۱۰۰۰ حیوان نر و ۴۰۰۰ حیوان ماده نسل آخر جمعیت تاریخی به مدت ۵۰ نسل با یکدیگر آمیزش تصادفی داده شدند. نرخ جایگزینی والدین در جمعیت ثانویه ۰/۵ در نظر گرفته شد و طرح انتخاب و حذف والدین به ترتیب تصادفی و سن بالا در نظر گرفته شد. سپس برای ایجاد دو جمعیت مشتق شده، برای جمعیت اول (A) از بین حیوانات نسل آخر جمعیت ثانویه ۲۰ حیوان نر و ۱۰۰ حیوان ماده (نسل پایه) انتخاب شدند و برای جمعیت دوم (B) از بین حیوانات نسل ۲۰ جمعیت ثانویه ۳۰ حیوان نر و ۱۲۰ حیوان ماده (نسل پایه) انتخاب شدند. هر دو جمعیت به مدت ۵۰ نسل آمیزش تصادفی داده شدند. نرخ جایگزینی والد نر در جمعیت‌های اول و دوم به ترتیب ۸۰ و ۵۰ درصد انتخاب شدند و نرخ جایگزینی والد ماده در جمعیت اول و دوم به ترتیب ۳۰ و ۱۰ درصد انتخاب شدند. نرخ رشد تعداد والد نر جمعیت اول و دوم ۱۰ درصد و نرخ رشد تعداد والد ماده جمعیت‌های اول و دوم به ترتیب ۱۰ درصد و پنج درصد جمعیت پایه انتخاب شدند. انتخاب حیوانات برای جایگزینی والدین در جمعیت‌های اول و دوم به ترتیب ارزش اصلاحی بالا و ارزش فنوتیپی بالا در نظر گرفته شد و حیوانات مسن از جمعیت‌ها حذف شدند و نرخ نتاج متولد شده به‌ازاء هر حیوان ماده یک فرزند انتخاب شد (مطابق با گله‌های گاوهای نژاد شیری). میزان LD در فواصل کوتاه و بلند در نسل آخر جمعیت‌های اول و دوم به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۲۸ و ۰/۱۱ و ۰/۰۸ برآورد شدند. این مقادیر تقریباً مشابه مقادیر LD گزارش شده در حیوانات اهلی بودند (De Roos et al., 2008).

ژنوتیپ نشانگرهای ژنومی حیوانات نسل آخر جمعیت‌های اول و دوم ذخیره شدند. علاوه بر این، شجره و ارزش‌های فنوتیپی سه نسل آخر جمعیت اول و پنج نسل آخر جمعیت دوم ذخیره شدند. در مجموع، اطلاعات شجره و ارزش فنوتیپی ۴۷۹۸ حیوان ذخیره شدند که ۱۲۹۸ حیوان دارای ژنوتیپ بودند. برای مقایسه روش‌های آماری و اعتبارسنجی بهبود پویا ژنومی شبیه‌سازی با ۱۰ تکرار انجام شد. ژنوتیپ‌های نشانگرهای ژنومی مطابق کمترین فراوانی آللی (MAF) بیشتر از یک درصد و آزمون تعادل هاردی-وینبرگ با $P < 10^{-6}$ (Purcell et al.,) PLINK با استفاده از نرم‌افزار کنترل کیفیت شدند.

مدل آماری

مدل آماری مختلط برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی برای پویا ژنومی با حیوانات ژنوتیپ شده و غیر ژنوتیپ شده، مدل آماری WssGBLUP است (Legarra et al., 2014)، که با استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ترکیبی شجره و ژنومی ارزش‌های

یک ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی (G) وزن‌دهی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی وزن-دهی شده معمولی (GW) نمی‌تواند صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی چند جمعیتی را افزایش دهد. با توجه به مطالعات اخیر، استفاده از چند جمعیت به‌جای یک جمعیت به‌عنوان جمعیت مرجع با استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده (BG) یا وزن‌دهی شده آن (WBG) می‌تواند پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی را بهبود بخشد (Kemper et al., 2015; Veroneze et al., 2016). هدف این مطالعه، انتخاب بهترین ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی برای برآورد غیرخطی واریانس ژنتیکی برآورد شده با اثرات جایگزینی آللی نشانگرهای ژنومی به‌روش آماری WssGWAS برای پویا ژنومی چند جمعیتی (استفاده از اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی حیوانات ژنوتیپ شده و فاقد ژنوتیپ بیش از یک جمعیت) است. بدین ترتیب ابتدا دو جمعیت با ساختار ژنتیکی کاملاً مجزا شبیه‌سازی شدند. سپس با استفاده از سه ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی (G)، بلوک‌بندی شده (BG) و بلوک‌بندی شده وزن‌دهی شده (WBG) به روش WssGWAS با استفاده از چرخه وزن‌دهی ۱۰ مرحله‌ای، واریانس ژنتیکی برآورد شده با اثرات جایگزینی آللی نشانگرهای ژنومی برآورد شدند و پویا ژنومی چند جمعیتی انجام شد. سپس صحت‌های پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی تمامی مرحله‌ها برآورد و گزارش شدند (Zhang et al., 2016).

مواد و روش‌ها

شبیه‌سازی ژنوم و جمعیت

در این مطالعه، چهار صفت کمی با وراثت‌پذیری‌های ۰/۳ و ۰/۰۵ و تراکم‌های جایگاه صفت کمی (QTLs) ۵۰ و ۵۰۰ با واریانس فنوتیپی یک روی ژنومی متشکل از دو کروموزوم، هر یک به‌طول ۱۰۰ سانتی مورگان شبیه‌سازی شدند. روی هر یک از کروموزوم‌ها ۵۰۰۰ نشانگر ژنومی (SNPs) توزیع شدند. موقعیت جایگاه‌های صفت کمی و نشانگرهای ژنومی تصادفی انتخاب شدند. اثرات جایگزینی آللی برای QTLها از یک توزیع گاما با پارامتر شکلی ۰/۴ و نرخ ۱/۶۶ نمونه‌گیری شدند و برای هر QTL تعداد دو، سه یا چهار آلل به تصادف شبیه‌سازی شد، اما نشانگر ژنومی دو آللی (چند شکلی تک نوکلئوتیدی) شبیه‌سازی شدند. نرخ جهش برگشت‌پذیر برای جایگاه‌های صفت کمی QTLs و نشانگرهای ژنومی SNPs 10^{-6} در نظر گرفته شد.

برای ایجاد عدم تعادل لینکاژی (LD) در فاصله ژنتیکی کوتاه به روش تعادل جهش - رانش ژنتیکی، ابتدا یک جمعیت پایه به اندازه ۱۰۰۰ حیوان به مدت ۵۰۰ نسل آمیزش تصادفی داده شدند و سپس اندازه جمعیت به ۵۰۰۰ حیوان به مدت ۵۰۰ نسل گسترش داده شد. در

که در آن، A^{-1} ، GW^{-1} و A_{22}^{-1} به ترتیب معکوس ماتریس-های روابط خویشاوندی شجره کل حیوانات، روابط خویشاوندی ژنومی، حیوانات دارای ژنوتیپ (در ادامه نحوه تشکیل آن توضیح داده خواهد شد) و روابط خویشاوندی شجره حیوانات دارای ژنوتیپ هستند. در این مطالعه، هدف انتخاب بهترین ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی برای تشکیل ماتریس روابط خویشاوندی ترکیبی است که بتواند صحت پیش‌بینی ارزش‌های اصلاحی و دقت پویش ژنومی چند جمعیتی را بهبود بخشد.

با توجه به اینکه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها با یکدیگر متفاوت هستند و ساختار ژنومی آن‌ها نظیر LD و فراوانی آللی نشانگرهای ژنومی کاملاً متفاوت هستند. در نتیجه، باید روابط خویشاوندی ژنومی حیوانات درون هر جمعیت جدا از روابط خویشاوندی بین حیوانات دو جمعیت برآورد شود (Wientjes et al., 2017). اصطلاحاً در هنگام تشکیل ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی، روابط خویشاوندی حیوانات هر جمعیت و روابط خویشاوندی بین حیوانات دو جمعیت در بلوک‌های خویشاوندی کاملاً مجزا برآورد می‌شوند (Zhou et al., 2014). بنابراین، در این مطالعه به دو روش معمولی و بلوک‌بندی شده، ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی تشکیل شدند و معکوس آن‌ها برای تشکیل ماتریس H^{-1} استفاده شدند. روش معمولی (G) به صورت معادله ۳ (Vanraden, 2008) و روش بلوک‌بندی شده (BG) به صورت معادله ۴ (Wientjes et al., 2017) تشکیل شدند.

$$G = \frac{MD_t M'}{2 \sum 2p_{AB}(1 - p_{AB})}, G^{-1} = (0.95G + 0.05 A_{22})^{-1} \quad \text{معادله (۳)}$$

$$BG = \left[\begin{array}{c} \frac{M_A D_t M'_A}{2 \sum p_A(1 - p_A)} \\ \frac{M_B D_t M'_B}{2 \sum \sqrt{p_B(1 - p_B)} p_A(1 - p_A)} \end{array} \quad \frac{M_A D_t M'_B}{2 \sum \sqrt{p_A(1 - p_A)} p_B(1 - p_B)} \\ \frac{M_B D_t M'_B}{2 \sum p_B(1 - p_B)} \right] \quad \text{معادله (۴)}$$

$$BG^{-1} = (0.95BG + 0.05 A_{22})^{-1}$$

زمانی که دیگر با وزن‌دهی صحت تغییر قابل ملاحظه‌ای نکنند، ادامه دارد (Zhang et al., 2016). سپس اثرات نشانگرهای ژنومی برآورد شده در تکرار آخر برای پویش ژنومی استفاده می‌شوند. در این مطالعه، با استفاده از ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی به روش‌های معادله‌های ۵ (با استفاده از ماتریس G) Wang et al., (2012) و ۶ (با استفاده از ماتریس BG) (Wientjes et al., 2017) آللی برآورد شدند. سپس برای تکرار بعد به روش معادله ۷ برای نشانگرهای ژنومی ضرایب وزن‌دهی برآورد شدند. علاوه‌براین، از

اصلاحی حیوانات و اثرات جایگزینی آللی نشانگرهای ژنومی را برآورد می‌کند، به شکل زیر است:

$$y = Xb + Zg + e \quad \text{معادله (۱)}$$

در معادله ۱، y: بردار ارزش‌های فنوتیپی، ماتریس‌های X و Z: به ترتیب ارزش‌های فنوتیپی به اثرات ثابت نژاد و حیوان‌ها مرتبط می‌کنند. b و g: به ترتیب بردارهای اثرات ثابت و ارزش‌های اصلاحی حیوانات با توزیع $g \sim N(0, H\sigma_g^2)$ هستند. e: بردار اثرات باقیمانده با توزیع $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ است. H و I: به ترتیب ماتریس روابط خویشاوندی ترکیبی (نحوه تشکیل آن در ادامه توضیح داده خواهد شد) و ماتریس قطری واحد هستند. همچنین، σ_g^2 و σ_e^2 : به ترتیب واریانس‌های ژنتیک افزایشی و باقی‌مانده هستند. مؤلفه‌های واریانس، ارزش‌های اصلاحی حیوانات و اثرات جایگزینی آللی نشانگرهای ژنومی با استفاده از نرم‌افزارهای BLUPF90 و postGSF90 انجام شدند (Lourenco et al., 2020).

تشکیل ماتریس‌های روابط خویشاوندی ترکیبی شجره و ژنومی

ماتریس H یک ماتریس روابط خویشاوندی ترکیبی است، که در آن رابطه خویشاوندی بین افراد دارای ژنوتیپ و بدون ژنوتیپ برآورد می‌شود. در واقع، یک ماتریس واحد برای تشکیل روابط خویشاوندی کل افراد یک جمعیت با شجره و ژنوتیپ نشانگرهای ژنومی است. ماتریس H^{-1} در معادله ۲ آمده است (Legarra et al., 2014).

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G_W^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix} \quad \text{معادله (۲)}$$

در معادله ۳، M و p_{AB} به ترتیب ماتریس ژنوتیپی مرکزی شده و فراوانی آللی دو جمعیت A و B هستند. در معادله ۴: M_A و M_B و p_A و p_B به ترتیب ماتریس ژنوتیپی مرکزی شده و فراوانی آللی اختصاصی هر یک از جمعیت‌های A و B هستند. در هر دو معادله، D_t : ماتریس قطری ضرایب وزن‌دهی در تکرار t ام است. در روش آماری WssGWAS ابتدا در تکرار اول $D=I$ است و در مراحل بعدی با اثرات نشانگرهای ژنومی برآورد شده برای هر نشانگر ژنومی ضریب وزن‌دهی اختصاصی برآورد می‌شود و این تکرارها تا زمانی که صحت‌های پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی به همگرایی برسند، یعنی

چند جمعیتی با استفاده از روش آماری WssGWAS، با استفاده از مدل آماری بیز B با ضریب احتمال تأثیر $\pi = 0.95$ با استفاده از پکیج BGLR (Pérez and De Los Campos, 2014) و الگوریتم نمونه‌گیری گیبس پویش ژنومی چند جمعیتی انجام شد (Zhang et al., 2016).

$$\hat{\alpha}_t = \alpha D_t M' G^{-1} \hat{g}_t, \alpha = \frac{1}{2 \sum p_{AB}(1-p_{AB})} \quad \text{معادله (۵)}$$

$$\hat{\beta}_t = \beta D_t M' B G^{-1} \hat{g}_t, \beta = \frac{1}{2 \sum \sqrt{p_A(1-p_A)p_B(1-p_B)}} \quad \text{معادله (۶)}$$

$$\text{معادله (۷)}$$

$$D_{t+1} = \text{Diag} \left(\frac{nV_{i_t}}{\sum V_{i_t}} \right), Vi_{BG} = 2\sqrt{p_A(1-p_A)p_B(1-p_B)}\hat{\alpha}^2, Vi_G = 2p_{AB}(1-p_{AB})\hat{\alpha}^2$$

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی ارزش‌های فنوتیپی صفات شبیه‌سازی شده برای هر یک از جمعیت‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، نسبت به جمعیت پایه با افزایش نسل تعداد QTL‌های مؤثر بر روی صفات کاهش یافته است که نشان می‌دهد، دو جمعیت تحت انتخاب بوده‌اند. همچنین، این تعداد QTL‌ها، جایگاه‌هایی هستند که بین دو جمعیت مشترک می‌باشند. همچنین به دلیل اینکه نحوه و شدت انتخاب بین جمعیت‌ها متفاوت است، میزان وراثت‌پذیری صفت در دو جمعیت متفاوت مشاهده شدند. علاوه بر این‌ها، نتایج نشان داد که ارزش‌های فنوتیپی صفات شبیه‌سازی شده در دو جمعیت A و B کاملاً نسبت به یکدیگر ناهمگن بوده و مجزا می‌باشند. در شبیه‌سازی صفات سعی شد که وراثت‌پذیری‌ها منطبق با صفات اقتصادی در گله‌های گاو شیری باشند (Pedrosa et al., 2023).

ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی وزن‌دهی شده با ضرایب وزن‌دهی برآورده شده با اثرات نشانگری مدل آماری بیز B (WBG) (Su et al., 2014; Veroneze et al., 2016) نیز برای پویش ژنومی و مقایسه با ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی غیر وزن‌دهی استفاده شد. همچنین برای بررسی کارآمدی پویش ژنومی

در معادله ۵ تا ۷، بردار اثرات جایگزینی آلی نشانگرهای ژنومی برای هر تکرار t ، M : ماتریس مرکزی شده ژنوتیپ‌های نشانگرهای ژنومی، α و β : ضرایب تصحیح هستند. Vi_{BG} و Vi_G : به ترتیب واریانس‌های ژنوتیپی برآورد شده با اثرات نشانگرهای ژنومی به دست آمده از ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی G و BG هستند. برای محاسبه میزان واریانس ژنتیکی توجیه شده توسط هر یک از نشانگرهای ژنومی از معادله ۸ استفاده شد. برای مقایسه ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی، صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی و تعداد نشانگرهای ژنومی و مجموع واریانس توجیه شده توسط نشانگرهای ژنومی که حاوی بیش از یک درصد واریانس ژنتیکی کل هستند، برآورد شدند.

$$gVar\%_i = \frac{2p_{AB_i}(1-p_{AB_i})\hat{\alpha}^2_i}{\sigma_a^2} * 100 \quad \text{معادله (۸)}$$

در معادله ۸، $gVar\%$ و p_{AB} : به ترتیب درصد واریانس ژنتیکی توجیه شده و فراوانی آلی نشانگر ژنومی i ام هستند. σ_a^2 : واریانس ژنتیکی کل است (Wang et al., 2012).

جدول ۱- آمار توصیفی ارزش فنوتیپی صفات شبیه‌سازی شده

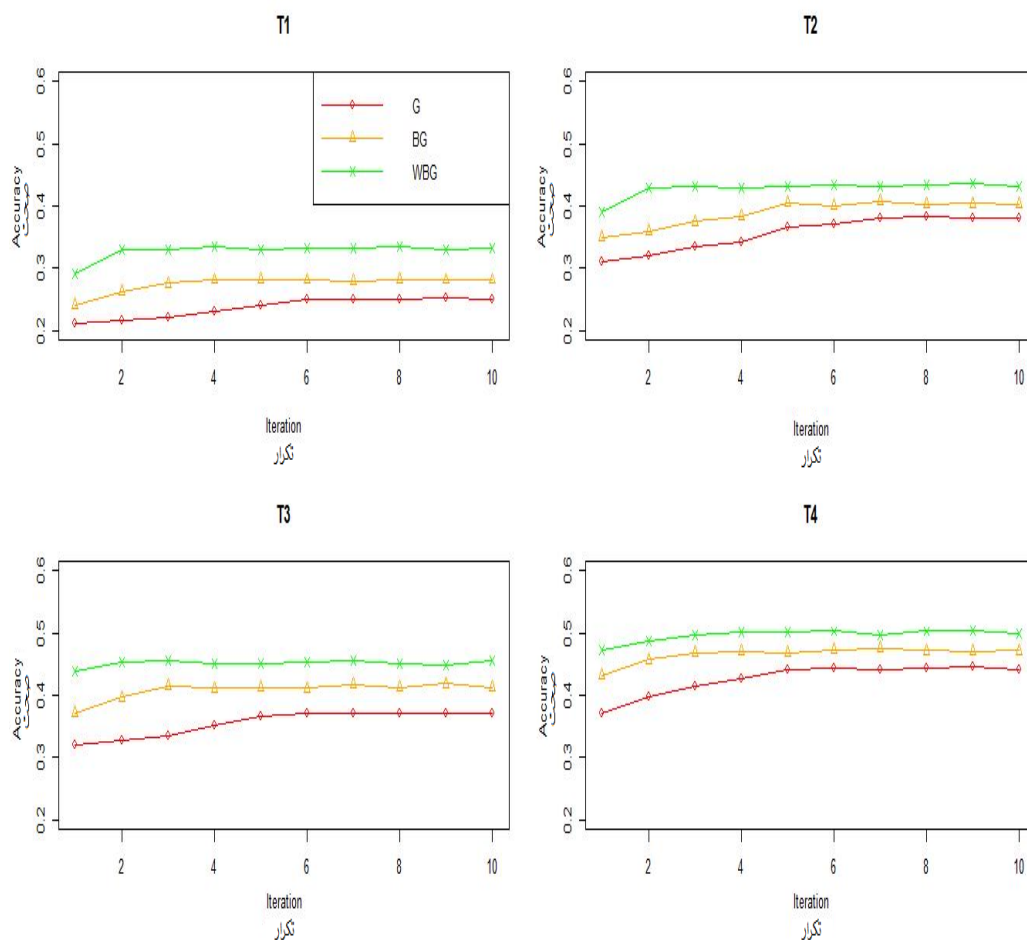
Table 1- Descriptive statistics of phenotypic values of simulated traits

صفات Traits	تعداد جایگاه صفت کمی QTL Number of QTLs	جمعیت Population	وراثت‌پذیری h2	حداکثر Maximum	حداقل Minimum	میانگین Mean	واریانس Variance
T1	47	A	0.015±0.001	3.6±0.05	-2.31±0.01	0.91±0.01	0.97±0.01
		B	0.032±0.002	3.7±0.04	-2.19±0.02	0.79±0.02	0.88±0.02
T2	482	A	0.013±0.001	4.5±0.03	-1.24±0.01	1.64±0.03	0.95±0.01
		B	0.029±0.002	4.6±0.01	-1.89±0.01	0.87±0.01	0.98±0.03
T3	43	A	0.18±0.01	5.4±0.02	-0.03±0.01	2.68±0.02	0.71±0.01
		B	0.23±0.01	5±0.03	-0.28±0.01	2.28±0.01	0.73±0.01
T4	478	A	0.15±0.02	7.2±0.07	2.39±0.01	4.95±0.01	0.75±0.02
		B	0.22±0.01	7±0.08	0.86±0.01	4.15±0.01	0.88±0.01

جدول ۲- صحت‌های پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی

Table 2- Accuracies of genomic prediction

صفات Traits	ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی G	ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده Blok wise G	ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی وزن‌دهی شده بلوک‌بندی Weighted blok wise G	بیز BayesB
T1	0.25±0.01	0.28±0.01	0.33±0.01	0.24±0.01
T2	0.38±0.03	0.4±0.03	0.43±0.03	0.32±0.02
T3	0.37±0.01	0.41±0.01	0.45±0.01	0.38±0.01
T4	0.44±0.02	0.47±0.02	0.5±0.02	0.4±0.02



شکل ۱- نمودارهای تغییرات صحت در تکرارهای مختلف پویس ژنومی چند جمعیتی برای ماتریس‌های ژنومی متفاوت در صفات T1 تا T4

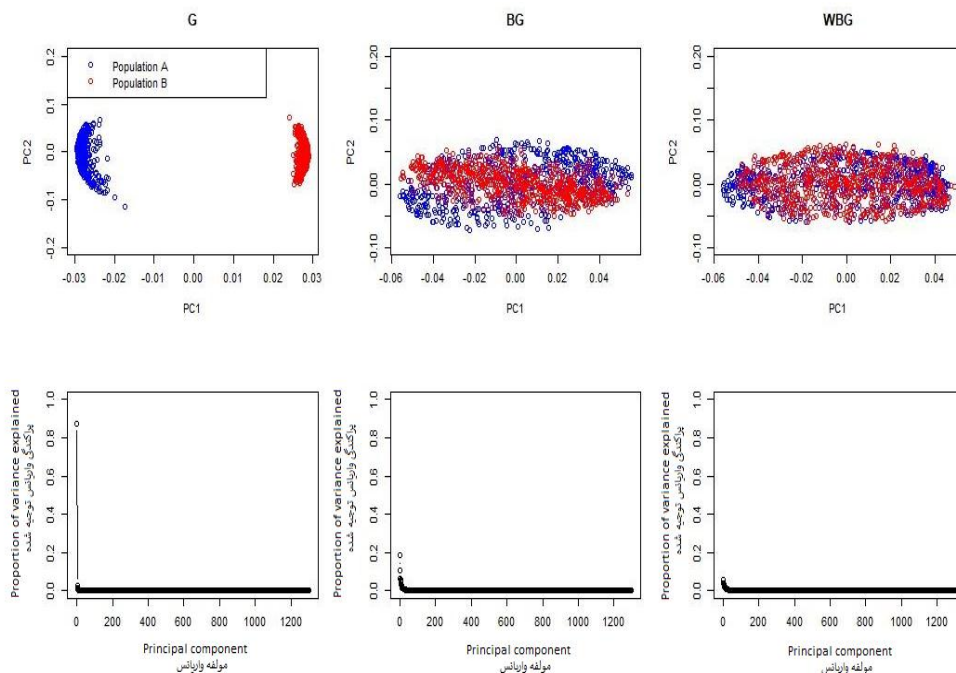
Figure 1- Plots of iterations of accuracies from T1 to T4 traits

اطلاعات فنوتیپی یا مشاهدات کمتر از مدل‌های ssGBLUP و WssGBLUP نسبت به مدل‌های گفته شده کارایی کمتری دارد و صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی این روش کمتر از روش‌های گفته شده است (Zhang et al., 2016) همچنین نتایج نشان داد، با افزایش تراکم QTL صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی افزایش یافت، که این امر به دلیل آن است که ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی در حالت چند ژنی کارایی بیشتری نسبت به حالت تک ژنی صفات دارد

نتایج برآورد صحت در زمان همگرایی تکرارها در مطالعات پویس ژنومی تک مرحله‌ای نشان داد، که استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده (BG) و بلوک‌بندی وزن‌دهی شده (WBG) می‌تواند صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی به روش WssGBLUP چند جمعیتی را بهبود بخشد (جدول ۲). علاوه بر این نتایج نشان داد که روش آماری بیز B چند جمعیتی به دلیل متفاوت بودن فاز LD در جمعیت‌های مختلف و همچنین به دلیل

نتایج رسم نمودار PCA ماتریس‌های روابط خویشاوندی در تکراری که صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی به همگرایی می‌رسد، نشان داد که ماتریس WBG نسبت به ماتریس‌های BG و G توانسته است، فاصله ژنتیکی بین جمعیت را کاهش دهد و این امر باعث افزایش توان روش پویس ژنومی چند جمعیتی و افزایش صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی شده است (Wu et al., 2015). به طوری که در PC1 میزان واریانس برای ماتریس‌های WBG، BG و G به ترتیب ۰/۰۷، ۰/۲ و ۰/۸ برآورد شد (شکل ۲). این نتایج نشان داد که ماتریس WBG توانسته است، نسبت به سایرین بیشتر از اطلاعات نواحی ژنومی مشترک بین حیوانات دو جمعیت A و B برای همگن‌سازی خویشاوندی ژنومی چند جمعیتی استفاده نماید (Veroneze et al., 2016). دیتویلر و همکاران (Daetwyler et al., 2012) نشان دادند که نزدیکی و دوری رابطه خویشاوندی ژنومی بین حیوانات مرجع و آزمون بر روی صحت و اریبی پیش‌بینی ارزش اصلاحی مؤثر هستند و هر چقدر روابط خویشاوندی ژنومی بین حیوانات بیشتر باشد، صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی بیشتر خواهد بود.

(Goddard and Hayes, 2009; Vanraden, 2008; Wientjes et al., 2015). استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی وزن‌دهی شده (WBG) برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی به روش WssGBLUP چند جمعیتی نسبت به ماتریس‌های BG و G به صورت میانگین باعث به ترتیب ۱۸ و ۳۲ درصد افزایش صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی شده است. همچنین در هنگام برآورد اثرات نشانگرهای ژنومی به روش WssGWAS نسبت به سایر ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی در زمان کمتری به همگرایی صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی می‌رسد (شکل ۱). ژنگ و همکاران (Zhang et al., 2016) نشان دادند که استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی GW می‌تواند سرعت و عملکرد WssGWAS تک جمعیتی را بهبود بخشد. علاوه بر آن، اخیراً مطالعات نشان دادند که استفاده از ماتریس WBG می‌تواند صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی با روش GBLUP چند جمعیتی را نسبت به ماتریس G افزایش دهد (Veroneze et al., 2016). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی GW در روش ssGBLUP چند جمعیتی در جوامع آمیخته نمی‌تواند منجر به بهبود صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی شود (Alvarenga et al., 2020).



شکل ۲- نمودارهای تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی ژنومی برای ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی مختلف
Figure 2- PCA plots of different genomic relationship matrices

شیری معمولاً جهت و نحوه انتخاب‌ها نزدیک به یکدیگر است، که باعث می‌شود نواحی ژنومی تحت انتخاب مشترک در آن‌ها مشاهده شود. بنابراین، به لحاظ فاز LD نواحی مشترک زیادی بین آن‌ها وجود

مهم‌ترین عامل افزایش توان روش‌های آماری پویس ژنومی اندازه جمعیت مرجع است (Raven et al., 2014). حیوانات اقتصادی نظیر گاو شیری تحت انتخاب شدید هستند. همچنین در نژادهای گاو

نسبت به ماتریس G و Bیز توان بالاتری برای پیش‌بینی ارزش اصلاحی با WssGBLUP و پوشش ژنومی چند نژادی دارند (شکل ۳). علاوه بر این، مطالعات پوشش ژنومی چند جمعیتی با روش آزمون رگرسیونی ساده نشان دادند که استفاده از اطلاعات فنوتیپی و ژنوتیپی چند نژاد گاو شیری باعث افزایش توان شناسایی نشانگرهای ژنومی مرتبط با QTLها می‌شود (Raven et al., 2014).

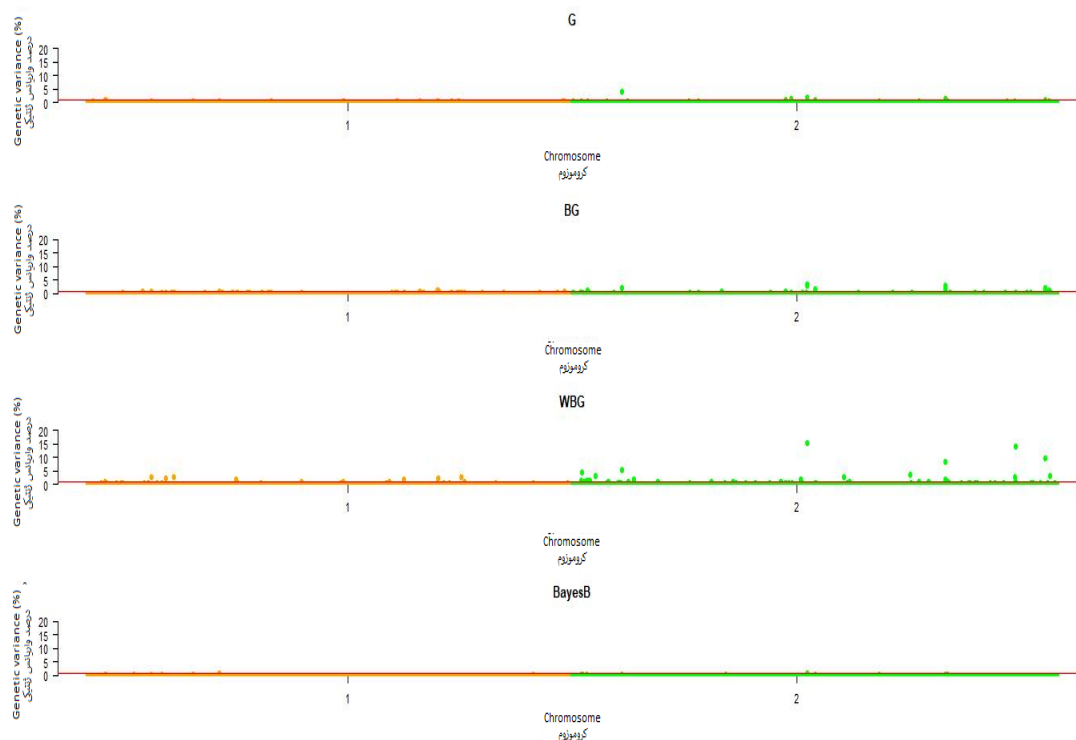
همچنین سانچز و همکاران (Sanchez et al., 2017) نشان دادند که استفاده از GWAS چند نژادی با استفاده از آزمون رگرسیونی ساده برای نقشه‌یابی QTLهای صفات مرتبط با تولید پروتئین شیر، توان روش آماری را برای شناسایی نشانگرهای ژنومی مرتبط با QTLها، به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالا برده است. مطالعه دیگری توسط ون دنبرگ و همکاران (van den Berg et al., 2016) بر روی پنج نژاد گاو شیری نشان داد که GWAS چند نژادی نسبت به تک نژادی باعث بهبود دقت شناسایی نواحی QTLها می‌شود. مطالعات اخیر نشان دادند که استفاده از اطلاعات فنوتیپی افراد فاقد ژنوتیپ می‌تواند نقش مهمی در بهبود پوشش ژنومی داشته باشد و علاوه بر آن، استفاده از ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی با همبستگی بین جمعیتی بالاتر نسبت به سایر ماتریس‌های روابط خویشاوندی می‌تواند باعث بهبودی پوشش ژنومی گردد. با توجه به مطالعات اخیر و نتایج این مطالعه، استفاده از جمعیت مرجع چند جمعیتی به دلیل افزایش مشاهدات فنوتیپی و اطلاعات ژنتیکی، باعث بهبود پوشش ژنومی چند نژادی شده است. علاوه بر آن، استفاده از ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده نظیر BG و WBG نسبت به ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی تک ساختمانی نظیر G و GW باعث بهبود پوشش ژنومی چندجمعیتی شده است.

دارد و در GWAS چند نژادی QTL های با اثرات بزرگ که در این نواحی تحت انتخاب مشترک وجود دارند، شناسایی می‌شوند (van den Berg et al., 2016). نتایج پوشش ژنومی نشان داد که استفاده از ماتریس WBG نسبت به سایر ماتریس‌های G و BG باعث شده است، که تعداد بیشتری نشانگر ژنومی مرتبط با QTLهای صفات T1 تا T4 شناسایی شوند (جدول ۳). حتی در مقایسه با Bیز نیز توان بالاتری برای پوشش ژنومی چند جمعیتی داشت (شکل ۳) (Zhang et al., 2016). علاوه بر این، نشانگرهایی وجود داشتند که بین ماتریس‌های BG و WBG مشترک شناسایی شدند، اما در WBG از درصد واریانس توجیه شده بالاتری برخوردار بودند. به دلیل اینکه WBG در ابتدا نسبت به صفت اختصاصی می‌شود، می‌تواند با دقت بیشتری در وزن‌دهی‌های تکراری روش WssGWAS نشانگرهای اختصاصی یک صفت خاص با استفاده از اطلاعات چند نژاد را شناسایی نماید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده شد، استفاده از ماتریس WBG باعث شد که پیش‌بینی‌های ارزش اصلاحی در اولین تکرار به همگرایی صحت در چرخه ۱۰ تکراری پوشش ژنومی تک مرحله‌ای برسد. با استفاده از Bیز در صفات T1 تا T4 به ترتیب ۱، ۲، ۳ و ۵ نشانگر ژنومی با واریانس توجیه شده بالای یک درصد شناسایی شد، که این نشان می‌دهد روش Bیز به دلیل سختگیری‌ها و محدودیت‌هایی که در توزیع پیشین برآورد اثرات نشانگرهای ژنومی اعمال می‌کند، برای پوشش ژنومی چند جمعیتی و پیش‌بینی ارزش اصلاحی ژنومی با جمعیت مرجع چند جمعیتی نسبت به روش‌های ssGBLUP و WssGBLUP مناسب نیست، اما کمپر و همکاران (Kemper et al., 2015) نشان دادند که روش آماری Bیز R نسبت به GBLUP برای نقشه‌یابی و پیش‌بینی ارزش اصلاحی به‌روش چند نژادی کارایی بهتری دارد. البته، مطالعه آن‌ها با استفاده از ماتریس G انجام شده است. در مطالعه اخیر نشان داده شد، ماتریس‌های BG و WBG

جدول ۳- تعداد نشانگرهای ژنومی با بیش از یک درصد واریانس ژنتیکی افزایشی توجیه شده ماتریس‌های روابط خویشاوندی ژنومی

Table 3- Proportion of variance (%) explained of different genomic relationship matrices

صفات Traits	ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی		ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی بلوک‌بندی شده		ماتریس روابط خویشاوندی ژنومی وزن‌دهی شده بلوک‌بندی	
	G		Blok wise G		Weighted Blok wise G	
	تعداد نشانگرهای ژنومی nSNPs	مجموع واریانس ژنومی توجیه شده (%) %TV	تعداد نشانگرهای ژنومی nSNPs	مجموع واریانس ژنومی توجیه شده (%) %TV	تعداد نشانگرهای ژنومی nSNPs	مجموع واریانس ژنومی توجیه شده (%) %TV
T1	10±0.1	16.6±0.2	12±0.1	28.4±0.1	15±0.1	45.5±0.2
T2	17±0.2	33.8±0.1	17±0.1	36.3±0.1	24±0.1	68.1±0.1
T3	12±0.1	19.3±0.3	13±0.2	25.2±0.2	17±0.3	36.5±0.2
T4	18±0.3	14.4±0.1	20±0.2	31.5±0.1	27±0.1	59.3±0.1



شکل ۳- نمودارهای درصد واریانس‌های توجیه شده برای روش‌های مختلف

Figure 3- Manhattan plots of proportion of variance (%) explained of different methods

نتیجه‌گیری کلی

مطالعات اخیر و مطالعه حاضر نشان دادند که پویس ژنومی چند نژادی با روش آماری WssGWAS می‌تواند باعث بهبود پویس ژنومی چند نژادی برای شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با صفات اقتصادی شود. علاوه بر آن، نتایج این مطالعه نشان داد که برای پویس ژنومی چند نژادی با روش آماری WssGWAS می‌توان به جای ماتریس روابط خویشاوندی G از ماتریس روابط خویشاوندی BG یا WBG استفاده نمود. ماتریس WBG به دلیل اینکه در ابتدای

ورود چرخه تکراری وزن‌دهی روش WssGWAS توسط نتایج آنالیز روش آماری بیز B وزن‌دهی جداگانه شده است و هر نشانگر ژنومی در تکرار $t=0$ در ماتریس WBG واریانس مخصوص به خود را دارند با زمان کمتری به همگرایی صحت پیش‌بینی ارزش اصلاحی می‌رسند. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات پویس ژنومی چند جمعیتی با استفاده از روش WssGWAS برای شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با اثرات ژنتیکی افزایشی و غیر افزایشی صفات، از ماتریس‌های BG یا بهبود یافته آن WBG استفاده شود.

References

1. Aguilar, I., Misztal, I., Johnson, D. L., Legarra, A., Tsuruta, S., & Lawlor, T. J. (2010). Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 743–752. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2730>
2. Alvarenga, A. B., Veroneze, R., Oliveira, H. R., Marques, D. B. D., Lopes, P. S., Silva, F. F., & Brito, L. F. (2020). Comparing alternative single-step GBLUP approaches and training population designs for genomic evaluation of crossbred animals. *Frontiers in Genetics*, 11(April), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00263>
3. Campos, G. D. L., Vazquez, A. I., Fernando, R., Klimentidis, Y. C., Sorensen, D., de los Campos, G., Vazquez, A. I., Fernando, R., Klimentidis, Y. C., & Sorensen, D. (2013). Prediction of complex human traits using the genomic best linear unbiased predictor. *PLoS Genetics*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003608>
4. Cesarani, A., Lourenco, D., Tsuruta, S., Legarra, A., Nicolazzi, E. L., VanRaden, P. M., & Misztal, I. (2022). Multibreed genomic evaluation for production traits of dairy cattle in the United States using single-step genomic best linear unbiased predictor. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 5141–5152. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21505>
5. Cole, J. B., van Raden, P. M., O'Connell, J. R., van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., & Wiggans, G. R. (2009). Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *Journal of Dairy*

- Science*, 92(6),2931–2946. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1762>
6. Daetwyler, H. D., Kemper, K. E., van der Werf, J. H. J., & Hayes, B. J. (2012). Components of the accuracy of genomic prediction in a multi-breed sheep population. *Journal of Animal Science*, 90(10),3375–3384. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4557>
 7. De Roos, A. P. W., Hayes, B. J., Spelman, R. J., & Goddard, M. E. (2008). Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genetics*, 179(3),1503–1512. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.084301>
 8. Erbe, M., Hayes, B. J., Matukumalli, L. K., Goswami, S., Bowman, P. J., Reich, C. M., Mason, B. A., & Goddard, M. E. (2012). Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with imputed high-density single nucleotide polymorphism panels. *Journal of Dairy Science*, 95(7),4114–4129. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5019>
 9. Gao, H., Christensen, O. F., Madsen, P., Nielsen, U. S., Zhang, Y., Lund, M. S., & Su, G. (2012). Comparison on genomic predictions using three GBLUP methods and two single-step blending methods in the Nordic Holstein population. *Genetics Selection Evolution*, 44(1),8. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-8>
 10. Goddard, M. E., & Hayes, B. J. (2009). Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*, 10(6),381–391. <https://doi.org/10.1038/nrg2575>
 11. Gualdrón Duarte, J. L., Gori, A. S., Hubin, X., Lourenco, D., Charlier, C., Misztal, I., & Druet, T. (2020). Performances of Adaptive MultiBLUP, Bayesian regressions, and weighted-GBLUP approaches for genomic predictions in Belgian Blue beef cattle. *BMC Genomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06921-3>
 12. Kemper, K. E., Reich, C. M., Bowman, P. J., Vander Jagt, C. J., Chamberlain, A. J., Mason, B. A., Hayes, B. J., & Goddard, M. E. (2015). Improved precision of QTL mapping using a nonlinear Bayesian method in a multi-breed population leads to greater accuracy of across-breed genomic predictions. *Genetics Selection Evolution*, 47(1),1–17. <https://doi.org/10.1186/s12711-014-0074-4>
 13. Legarra, A., Christensen, O. F., Aguilar, I., & Misztal, I. (2014). Single Step, a general approach for genomic selection. *Livestock Science*, 166(1),54–65. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.029>
 14. Legarra, A., Christensen, O. F., Vitezica, Z. G., Aguilar, I., & Misztal, I. (2015). Ancestral relationships using metafounders: Finite ancestral populations and across population relationships. *Genetics*, 200(2),455–468. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177014>
 15. Liu, X., Tian, D., Li, C., Tang, B., Wang, Z., Zhang, R., Pan, Y., Wang, Y., Zou, D., Zhang, Z., & Song, S. (2023). GWAS Atlas: An updated knowledgebase integrating more curated associations in plants and animals. *Nucleic Acids Research*, 51(D1),D969–D976. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac924>
 16. Lourenco, D., Legarra, A., Tsuruta, S., Masuda, Y., Aguilar, I., & Misztal, I. (2020). Single-step genomic evaluations from theory to practice: using snp chips and sequence data in blupf90. *Genes*, 11(7),1–32. <https://doi.org/10.3390/genes11070790>
 17. Lund, M. S., Sahana, G., de Koning, D. J., Su, G., & Carlborg, Ö. (2009). Comparison of analyses of the QTLMAS XII common dataset. I: Genomic selection. *BMC Proceedings*, 3(S1),1–8. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-3-s1-s1>
 18. Meuwissen, T. H., Solberg, T. R., Shepherd, R., & Woolliams, J. A. (2009). A fast algorithm for BayesB type of prediction of genome-wide estimates of genetic value. *Genetics Selection Evolution*, 41(2),1–10. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-2>
 19. Pedrosa, V. B., Boerman, J. P., Gloria, L. S., Chen, S.-Y., Montes, M. E., Doucette, J. S., & Brito, L. F. (2023). Genomic-based genetic parameters for milkability traits derived from automatic milking systems in North American Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(4), 2613-2629. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22515>
 20. Pérez, P., & De Los Campos, G. (2014). Genome-wide regression and prediction with the BGLR statistical package. *Genetics*, 198(2),483–495. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.164442>
 21. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3),559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
 22. Raven, L. A., Cocks, B. G., & Hayes, B. J. (2014). Multibreed genome wide association can improve precision of mapping causative variants underlying milk production in dairy cattle. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-62>
 23. Reales, G., & Wallace, C. (2023). Sharing GWAS summary statistics results in more citations. *Communications Biology*, 6(1),6–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04497-8>
 24. Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Croiseau, P., Fritz, S., Hozé, C., Miranda, G., Martin, P., Barbat-Leterrier, A., Letaïef, R., Rocha, D., Brochard, M., Boussaha, M., & Boichard, D. (2017). Within-breed and multi-breed GWAS on imputed whole-genome sequence variants reveal candidate mutations affecting milk protein composition in dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*, 49(1),68. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0344-z>
 25. Su, G., Christensen, O. F., Janss, L., & Lund, M. S. (2014). Comparison of genomic predictions using genomic

- relationship matrices built with different weighting factors to account for locus-specific variances. *Journal of Dairy Science*, 97,6547–6559. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8210>
26. Su, G., Gulbrandsen, B., Gregersen, V. R., & Lund, M. S. (2010). Preliminary investigation on reliability of genomic estimated breeding values in the Danish Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 93(3),1175–1183. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2192>
 27. Tiezzi, F., & Maltecca, C. (2015). Accounting for trait architecture in genomic predictions of US Holstein cattle using a weighted realized relationship matrix. *Genetics Selection Evolution*, 47(1),1–13. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0100-1>
 28. van den Berg, I., Boichard, D., & Lund, M. S. (2016). Comparing power and precision of within-breed and multibreed genome-wide association studies of production traits using whole-genome sequence data for 5 French and Danish dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 99(11),8932–8945. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11073>
 29. Vanraden, P. M. (2008). Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science*, 91(11),4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
 30. Veroneze, R., Lopes, P. S., Lopes, M. S., Hidalgo, A. M., Guimarães, S. E. F., Harlizius, B., Knol, E. F., van Arendonk, J. A. M., Silva, F. F., & Bastiaansen, J. W. M. (2016). Accounting for genetic architecture in single- and multipopulation genomic prediction using weights from genomewide association studies in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(3),187–196. <https://doi.org/10.1111/jbg.12202>
 31. Wang, H., Misztal, I., Aguilar, I., Legarra, A., Fernando, R. L., Vitezica, Z., Okimoto, R., Wing, T., Hawken, R., & Muir, W. M. (2014). Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Frontiers in Genetics*, 5(MAY),134. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00134>
 32. Wang, H., Misztal, I., Aguilar, I., Legarra, A., & Muir, W. M. (2012). Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genetics Research*, 94(2),73–83. <https://doi.org/10.1017/S0016672312000274>
 33. Wientjes, Y. C. J., Bijma, P., Vandenplas, J., & Calus, M. P. L. (2017). Multi-population genomic relationships for estimating current genetic variances within and genetic correlations between populations. *Genetics*, 207(2),503–515. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300152>
 34. Wientjes, Y. C. J., Calus, M. P. L., Goddard, M. E., & Hayes, B. J. (2015). Impact of QTL properties on the accuracy of multi-breed genomic prediction. *Genetics Selection Evolution*, 47(1),42. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0124-6>
 35. Wijesena, H. R., Nonneman, D. J., Snelling, W. M., Rohrer, G. A., Keel, B. N., & Lents, C. A. (2023). gBLUP-GWAS identifies candidate genes, signaling pathways, and putative functional polymorphisms for age at puberty in gilts. *Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.1093/jas/skad063>
 36. Wu, X., Lund, M. S., Sun, D., Zhang, Q., & Su, G. (2015). Impact of relationships between test and training animals and among training animals on reliability of genomic prediction. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 132(5),366–375. <https://doi.org/10.1111/jbg.12165>
 37. Zhang, X., Lourenco, D., Aguilar, I., Legarra, A., & Misztal, I. (2016). Weighting strategies for single-step genomic BLUP: An iterative approach for accurate calculation of GEBV and GWAS. *Frontiers in Genetics*, 7(AUG),151. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00151>
 38. Zhang, Z., Liu, J., Ding, X., Bijma, P., de Koning, D. J., & Zhang, Q. (2010). Best linear unbiased prediction of genomic breeding values using a trait-specific marker-derived relationship matrix. *PLoS ONE*, 5(9),1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012648>
 39. Zhang, Z., Ober, U., Erbe, M., Zhang, H., Gao, N., He, J., Li, J., & Simianer, H. (2014). Improving the Accuracy of Whole Genome Prediction for Complex Traits Using the Results of Genome Wide Association Studies. *PLoS ONE*, 9(3),1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093017>
 40. Zhou, L., Lund, M. S., Wang, Y., & Su, G. (2014). Genomic predictions across Nordic Holstein and Nordic Red using the genomic best linear unbiased prediction model with different genomic relationship matrices. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131(4). <https://doi.org/10.1111/jbg.12089>



Research Article

Vol. 15, No.4, 2023, p. 599-611

Estimation of True Productive Life and Their Correlation with Milk Production in Industrial Holstein Cows of Iran

Saeid Mokhtarzadeh Dilmaghani¹, Mohamadreza Sanjabi^{2*}, Abdoalreza Salehi³

1- Ph.D. Candidate of Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran.

2- Associate Professor of Agricultural Research Institute of Iranian Research Organization for Science and Technology, Iran.

3- Associate Professor, Department of Animal and Poultry Science, Abureyhan College of Agricultural Technology, University of Tehran, Iran.

*Corresponding Author's Email: msanjabi@gmail.com

Received: 14-02-2023
Revised: 27-04-2023
Accepted: 13-05-2023
Available Online: 07-06-2022

How to cite this article:

Mokhtarzadeh Dilmaghani, S., Sanjabi, M. R., & Salehi, A. (2023). Estimation of True Productive Life and Their Correlation with Milk Production in Industrial Holstein Cows of Ira. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 15(4), 599-611. (in Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80934.1133>

Introduction: When the urban population around the capitals or big cities increases, then need an intensive and modern dairy industrial farms or even mega dairy farm to support milk and dairy products demands. Therefore, many family farms shifted to big dairy farms which expecting more specializing and modern technology to be used towards reduction of the cost of milk production per cow. Management of these farms also completely different from housing, reproduction, nutrition and other technical points-of-view. In order to investigate true productive life and milk production during the last 15 years (2006-2020 years), in 20 industrial Holstein mega dairy farms this study was done. All the farms had a specialist in the fields of hygienic condition, calf rearing, balancing the diet, heat and Pregnancy detection and planed mating program for semen selection and breeding to control the production and type performance and preventing the inbreeding which help to use maximum inbreeding coefficient, if required.

Materials and Methods: The correlation between the lengths of true productive life (TPL), maximum lifetime milk production (MLMP305), and maximum lifetime peak of milk production (MLPMP) in 20 industrial Holstein mega dairy farms were investigated. The information recorded in the herd management software in the cattle breeding units, which included the information of the culled cows and all the existed cows in the herds from April 1385 to January 1400, were analyzed. The data includes 176,674 cattle records, of which 43,587 are related to existing cattle and 133,087 data are related to culled ones. The information of the existing cows was done in order to control the information of the herds and also monitor them. Finally, 133,087 data related to existing cows were edited and filled in the computerize program. To calculate the standard milk of 305 days, it is necessary to milk the animals three times a day and the animals have at least 4 monthly records of milk and also that the dryness of these animals has been recorded as the end of the milking period. The Data has been analyzed by univariate method of SAS software (Version 9.4). The Holstein-Friesian cow herds, on average, comprised 2069 cows, with a range from a minimum of 400 to a maximum of 5301 cows. These herds were distributed across 14 provinces throughout Iran. The average age at first calving was 750 days, and the standard 305-day milk yield averaged 12,342 kg during the third lactation. TPL records from 113584 cows and MLMP305 records from 78036 and MLPMP records of 111276 cows were used. The data were analyzed for the correlation between the characteristics of the true productive life, milk production of 305 days and the peak of



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/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.2023.80934.1133>

milk production Also, the linear regression between the true productive life and milk production were analyzed.

Results and Discussion: The average TPL of the animals under investigation is 33.57 months and the standard deviation of the data is 20.77. The average MLMP305 by these animals is 12472 kg and their standard deviation is 2513 kg. The average MLPMP of the animals was 51.83 kg. The highest correlation was between MLMP305 and MLPMP, which is 74.66%. The correlation between TPL and LPMP was 47.88% ($P < 0.0001$) and the correlation between TPL and LMP305 was 33.27 % ($P < 0.0001$). Our results are in accordance with studies such as Van Vleck, 1964, Hudson Van Vleck, 1981, and Ducrocq et al. 1988, but were in contrast with the results of Hare et al. 2006, and Ajili et al. 2007, and Dallago et al. 2022. The highest level of correlation (as expected) is between 305-day milk production and the peak of milk production.

Conclusion: The positive correlation between TPL, MLMP305, and MLPMP, shows that the animals with higher peaks also have higher milk production in one lactation period also have a higher true productive life. Considering the high significant positive correlation of this report, by selecting animals with a high production life span, not only can the productive life span be improved in the future generations, but contrary to the existing belief, milk production can also be increased in the future generations. It should be mentioned that the conclusion of this paper is extendable, when we can control all physiological and nutritional factors and have a proper pregnancy detection method which lead to perfect calving management and results that has been done exactly in the farms which we studied.

Keywords: Interaction, Mega dairy Holstein farm, Milk production, Peak of milk production, True Productive life

برآورد طول عمر تولیدی حقیقی و همبستگی آن با تولید شیر در گله‌های صنعتی گاو شیری ایران

سعید مختارزاده^۱، محمدرضا سنجابی^{۲*} و عبدالرضا صالحی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۳

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی صفت طول عمر تولیدی حقیقی و همبستگی آن با تولید شیر در سال‌های ۱۳۸۵ تا ۱۴۰۰، در ۲۰ مزرعه گاو شیری صنعتی هلستاین در ایران صورت پذیرفت. بدین منظور، رابطه بین طول عمر حقیقی (TPL)، حداکثر تولید شیر ۳۰۵ در طول عمر (LMP305) و حداکثر پیک تولید شیر در طول عمر (LPMP) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی رکوردهای TPL، LMP305 و LPMP به ترتیب از اطلاعات ۱۱۳۵۸۴، ۷۸۰۳۶ و ۱۱۱۲۷۶ راس گاو استفاده شد. میانگین TPL، LMP305 و LPMP در حیوانات تحت مطالعه به ترتیب ۳۳/۵۷ ماه، ۱۲۴۷۲ کیلوگرم و ۵۱/۸۳ کیلوگرم محاسبه گردید. بیشترین همبستگی بین LMP305 و LPMP بود که ۷۴/۶۶ درصد محاسبه شد. همبستگی بین TPL و LPMP، ۴۷/۸۸ درصد و همبستگی بین TPL و LMP305، ۳۳/۲۷ درصد محاسبه شد. همبستگی مثبت بین TPL، LMP305 و LPMP نشان می‌دهد که گاوهای با پیک تولید بالاتر، تولید شیر بیشتری نیز در یک دوره شیردهی داشته و همچنین عمر تولیدی حقیقی بالاتری نیز دارند. با توجه به همبستگی مثبت بالای محاسبه شده در این گزارش، می‌توان این استنباط را داشت که در صورتی که انتخاب برای گاوهای با طول عمر بیشتر در گله صورت پذیرد، نه تنها می‌توان طول عمر تولیدی گاوها را افزایش داد، بلکه می‌توان تولید شیر را نیز همراه با آن در نسل‌های آینده بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: پیک تولید شیر، تولید شیر، طول عمر تولیدی حقیقی، گاو هلستاین، همبستگی

مقدمه

نگهداشت کدام دام سودمند است؟ طرفداران هر یک از دیدگاه‌ها نیز دلایل قابل قبولی برای ادعای خود دارند و آن اینکه اگر دامی تولید بالاتر داشته باشد، ولی طول عمر تولیدی آن پایین باشد، فرصت بروز پتانسیل خود را نداشته و از طرف دیگر، این دیدگاه مطرح است که آیا دامی که تولید پایین داشته باشد، نگهداشت آن کار عاقلانه‌ای است؟ با این وجود، نقطه بهینه در میزان تولید و طول عمر، شاید حلقه گم شده در این میان باشد. میانگین طول عمر تولیدی گاوهای شیری از کمتر از سه سال تا حداقل ۴/۵ سال در کشورهایی که صنعت گاو شیری پیشرفته‌ای دارند، متغیر است (De Vries, 2020). برای گله‌هایی که اندازه گله خود را ثابت نگه می‌دارند، دام‌ها مزایای جایگزینی، امکان انتخاب دام‌های مطلوب برای ماندن در گله را به گله‌دار می‌

با انجام انتخاب برای سالیان متمادی برای صفت تولید شیر در گاوهای شیری هلستاین، طول عمر دام‌ها کاهش یافته و همواره این چالش بین طرفداران گاوهای شیری پُر تولید با طول عمر پایین و گاوهای شیری با تولید پایین و طول عمر بالاتر برقرار است که

۱- دانشجوی دکتری سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، ایران.

۲- دانشیار، پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، تهران، ایران.

۳- دانشیار، دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان)، دانشگاه تهران، ایران.

*- نویسنده مسئول: (Email: msanjabii@gmail.com)

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2023.80934.1133>

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، داده‌های جمع‌آوری شده در مجموعه گاوداری‌های صنعتی شرکت گسترش کشاورزی و دامپروری فردوس پارس (هلدینگ کشاورزی و دامپروری فردوس پارس)، مورد استفاده قرار گرفت. شایان ذکر است که ثبت یکسان داده‌ها در نرم‌افزارهای گله و نیز ثبت رویه در ورود داده‌ها در کنار صحت داده‌های وارد شده از جمله مواردی است که در انتخاب این هلدینگ برای استفاده از داده‌های آن نقش بسزایی داشته است. در حال حاضر، تعداد گاوداری‌های تحت نظر این هلدینگ به ۲۱ واحد گاوداری شیری رسیده است. به علت اینکه یکی از گله‌ها در سال ۱۴۰۰ آغاز به فعالیت نموده و داده‌های موجود در آن مناسب برای محاسبه طول عمر تولیدی نمی‌باشند، اطلاعات ۲۰ واحد گاوداری در این تحقیق مورد آنالیز قرار گرفت.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ۲۰ واحد گاوداری صنعتی تحت آنالیز واقع در ۱۳ استان کشور گسترده‌اند که اقلیم‌های متنوعی همچون سرد کوهستانی، معتدل و مرطوب، گرم و خشک و نیز گرم و مرطوب را شامل می‌شوند. کوچک‌ترین گله ۳۸۵ راس و بزرگ‌ترین آن‌ها بالغ بر ۵۲۰۰ راس گاو مولد دارد. در حال حاضر، ۱۹ گله از گله‌های تحت آنالیز بالای ۱۰۰۰ راس دام مولد دارند و میانگین دام‌های موجود در گله‌های تحت آنالیز ۲۱۷۹ راس می‌باشد. تعداد کل گاوهایی مولد موجود در این ۲۰ گله، بالغ بر ۴۳۵۸۷ راس می‌باشد. نژاد دام‌های موجود در این گله‌ها خالص هلستاین با منشأ آمریکای شمالی می‌باشند که با HF 100 در حال تولید شیر می‌باشند. گله‌ها به‌صورت کاملاً بسته و صنعتی مدیریت می‌شوند. در حال حاضر، میانگین تولید گله‌ها بالغ بر ۴۰ کیلوگرم به‌ازای هر راس گاو شیری می‌باشد (جدول ۱).

نحوه محاسبه طول عمر حقیقی دام‌ها بدین گونه می‌باشد که تعداد روزهایی که دام در گله حضور داشته و شیر داده است را محاسبه نموده و برای هر دام گزارش می‌شود. به بیان دیگر، تمام روزهایی که پس از زایش اول دام تا زمان حذف از گله با خارج نمودن روزهای خشکی دام در هر دوره شیردهی، توسط دستور نگاشته شده در نرم‌افزار مدیریت گله (مدیران تحلیل‌گر سپاهان) محاسبه و به‌عنوان طول عمر حقیقی دام گزارش می‌شود.

دهد. تولیدکنندگان نیز تمایل دارند تا حیوانات جوان‌تر را در گله‌های خود حفظ نمایند، زیرا این حیوانات معمولاً از نظر ژنتیکی نسبت به گاوهای گله‌شان برتری دارند. با این حال، در سال‌های اخیر، علاقه به ارتقای طول عمر گاوها به دلیل هزینه‌های بالای مرتبط با پرورش دام‌های جایگزین‌ها و تا حدودی نگرانی‌های مربوط به دیدگاه‌های اجتماعی و رفاه حیوانات، مورد توجه قرار گرفته است. آنچه مسلم است، این است که از طریق بهبودهای ژنتیکی و مدیریتی، می‌توان افزایش طول عمر گله را به‌دست آورد.

ون ولک، اثر اولین دوره شیردهی و طول عمر گاوهای شیری را بررسی کرده و اعلام داشتند، برخلاف این دیدگاه که گاوهایی که تولید شیر بالاتری در اولین شیردهی خود دارند، گله را در سنین پایین ترک می‌کنند، این بررسی این را اثبات نمی‌کند. در واقع، به نظر می‌رسد که این گاوها نسبت به گاوهای مشابه خود که تولید کمتری دارند، بیشتر در گله می‌مانند و بیشتر شیر تولید می‌کنند (Van Vleck, 1964).

دی-وریس (۲۰۲۰) با یک مدل ساده از طول عمر تولیدی بهینه اقتصادی، تبادل بین هزینه جایگزینی گله، هزینه‌های بلوغ و پیری، هزینه فرصت ژنتیکی و هزینه فرصت ارزش گوساله را نشان داد. در مجموع، این عوامل نشان می‌دهد که طول عمر متوسط تولیدی تقریباً پنج سال تضمین شده است. در نتیجه، افزایش سود ژنتیکی، کارایی تولید مثل، راحتی گاو و مراقبت‌های بهداشتی، فرصت مدیران گله را برای تغییر طول عمر تولیدی برای افزایش سودآوری، بهبود پذیرش جامعه از تولید لبنیات یا هر دو را افزایش می‌دهد (De Vries, 2020).

در این بررسی، فرض بر این است که همبستگی منفی مابین تولید شیر استاندارد سه بار دوشش، پیک تولید شیر و طول عمر تولیدی دام برقرار می‌باشد و به بیان دیگر، اگر دامی تولید بالایی داشته و یا پیک تولید بالایی داشته باشد، سریع‌تر از دام‌های دیگر از گله حذف می‌شوند. بنابراین، سعی شده است، موارد چالش برانگیز مطرح شده در بالا را به نحوی مورد آنالیز قرار داده و با توجه به داده‌های عملکردی واقعی دام‌ها در شرایط پرورشی صنعتی گاو شیری ایران پاسخ مناسب استخراج شود. امید است، گامی هر چند کوچک در راستای اتخاذ تصمیم مناسب در ارتقای سلامت و رفاه دام‌ها و همچنین در انتخاب پدران نسل‌های آتی گله‌های شیری و متعاقب آن افزایش سودآوری دامداران برداشته شود.

جدول ۱- اطلاعات کلی مربوط به گله‌های تحت آنالیز (اعداد مربوط به گاوهای موجود، راندمان تولید و حذف کشتارگاهی مربوط به سال آخر آنالیز می‌باشند.)

Table 1- General information of the herds under analysis (the numbers related to the available cows, records of milk production, production efficiency and slaughterhouse removal are related to the last year of the analysis.)

نام گله File name	استان State	درصد حذف اجباری گله Percents of involuntary culled cows	میانگین راندمان تولید گله (کیلوگرم در روز) Average milk production of herd (kg/day)	تولید شیر سالیانه گله (هزارتن) Yearly milk production of herd (million kg)	تعداد گاوهای موجود Number of cows available
آذرنگین Azarneghin	آذربایجان شرقی East Azarbayjan	38.01	40.15	16.67	1288
دام اصیل Dam Asil	تهران Tehran	28.70	37.36	15.38	1269
درجزین Darjazin	همدان Hamadan	24.08	38.52	4.46	385
ایوان Eyvan	ایلام Ilam	25.32	40.10	7.64	626
قیام Ghiam	اصفهان Isfahan	24.69	42.50	71.44	5236
قدس Ghods	خراسان رضوی Razavi Khorasan	22.87	44.12	15.28	1047
قروه Ghorveh	کردستان Kordestan	24.18	38.72	30.22	2514
حسن آباد Hasanabad	تهران Tehran	25.38	40.01	15.01	1149
کنگاور Kangavar	کرمانشاه Kermanshah	30.06	37.94	23.54	1989
خرمدره Khoramdareh	زنجان Zanjan	24.91	41.58	48.21	3695
ماهیدشت Mahidasht	کرمانشاه Kermanshah	29.35	38.30	28.43	2388
مگسال Magsal	قزوین Ghazvin	27.71	41.20	37.11	2718
مهدشت Mahdasht	مازندران Mazandaran	35.88	38.20	35.98	2956
ملایر Malayer	همدان Hamadan	28.48	37.22	28.61	2469
نگین فام Neghinfam	خوزستان Khoozestan	32.23	32.64	22.73	2222
رحمت آباد Rahmatabad	اصفهان Isfahan	26.20	44.07	42.64	3091
تلیسه نمونه Taliseh Nemooneh	تهران Tehran	24.24	40.28	34.44	2667
یاسوج Yasooj	کهگیلویه و بویراحمد Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad	29.38	38.00	14.75	1246
ظفر Zafar	خراسان رضوی Razavi Khorasan	22.47	43.26	23.36	1668
زاگرس Zagros	چهار محال بختیاری Chaharmahal and Bakhtyari	27.79	40.37	38.25	2964
هلدینگ Holding	تهران Tehran	26.82	40.00	555.78	43587

عمر حقیقی دام‌ها می‌باشد و حوادثی همچون برق گرفتگی، خفگی در اثر گیر کردن در سربند، مارگزیدگی، افتادن در چال کود و غیره خارج از منطق فوق می‌باشد، لذا علت‌های حذف تمامی دام‌ها بررسی گردید و در نهایت، ۳۶۸ راس گاو را که ۰/۲۸ درصد داده‌ها را شامل می‌شد از پیکره داده‌ها خارج گردید.

گام چهارم پردازش: هر چند که فروش تلیسه آبستن به عنوان یک روش معمول در فروش دام مازاد در گله‌های صنعتی می‌باشد، ولی آنچه در عمل مشاهده می‌شود، این است که گله‌ها درصدی از گاوهای آبستن خود را به‌علت مازاد بودن و به‌صورت فروش گاو آبستن داشتنی در مزایده‌ها ارائه می‌کنند. با توجه به اینکه خروج این دام‌ها از گله به‌منزله اتمام عمر تولیدی این دام‌ها نبوده و این گاوها ادامه تولید خود را در گله‌های دیگر داشته‌اند و این مسئله با فرضیه تحقیق مغایر می‌باشد، لذا اطلاعات این دام‌ها به تعداد ۱۵۵۰۲ راس که ۱۱/۹۷ درصد از داده‌ها را شامل می‌شود، از پیکره داده‌ها خارج گردیدند (جدول ۲).

بعد از انجام پردازش‌های یاد شده (جدول ۲) و حذف اطلاعات ۱۹۵۰۳ راس دام دیگر که ۱۴/۶ درصد از داده‌ها را شامل می‌شد، در نهایت، اطلاعات ۱۱۳۵۸۴ راس گاو حذف شده (۸۵/۴۰ درصد داده‌ها) با استفاده از رویه همبستگی پیرسون توسط نرم‌افزار (نسخه ۹/۴) SAS آنالیز شدند.

معادله (۱)

$$TPL = \beta_0 + \beta_1 LMP305 + \beta_2 LPMP$$

که در آن، TPL: طول عمر تولیدی حقیقی دام، β_0 : عرض از مبدا، β_1 : ضریب بالاترین شیر تولیدی ۳۰۵ روز استاندارد سه بار دوشش، β_2 : ضریب بالاترین پیک تولید شیر، LMP305: بالاترین شیر تولیدی ۳۰۵ روز استاندارد سه بار دوشش در طول عمر تولیدی و LPMP: بالاترین پیک تولید شیر در طول عمر تولیدی می‌باشند.

نتایج و بحث

آنالیز اولیه داده‌ها با دستور univariate توسط نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. آمار توصیفی برای بیشترین تولید شیر استاندارد ۳۰۵ روز سه بار دوشش، در جدول ۳ ارائه شده است.

ویرایش داده‌ها: اطلاعات گاوهای حذف شده و موجود در گله‌ها از فروردین ماه ۱۳۸۵ تا دی ماه ۱۴۰۰ از نرم‌افزار مدیریت گله استخراج شدند. داده‌ها شامل ۱۷۶۶۷۴ رکورد گاو بود که ۴۳۵۸۷ راس مربوط به گاوهای موجود و ۱۳۳۰۸۷ داده مربوط به دام‌های حذف شده بود. اطلاعات گاوهای موجود (گاوهای حاضر در گله‌ها) در راستای کنترل اطلاعات گله‌ها و نیز پایش ثبت دقیق خروج گاوها از گله‌ها صورت پذیرفت. ۱۳۳۰۸۷ داده مربوط به دام‌های حذف شده بود که مورد ویرایش قرار گرفتند. گام‌های مربوط به ویرایش شامل موارد ذیل بودند:

گام اول پردازش: گاوهایی که در روز زایش از گله حذف شدند از لیست دام‌ها خارج شدند. با توجه به اینکه روزهای شیردهی حذف شده این دام‌ها برابر با صفر می‌باشد و در معادلات و پردازش‌های بعدی وجود عدد صفر در مخرج اخلاص ایجاد می‌کند، لذا در گام اول دام‌هایی که در روز زایش حذف شده بودند، شناسایی و حذف شدند. تعداد این دام‌ها، ۸۱ راس (۰/۰۶ درصد از داده‌ها) بودند که در جدول ۲ می‌توان گله‌هایی را که دارای این دام‌ها بودند را مشاهده نمود.

گام دوم پردازش: در پردازش داده‌ها، گاوهایی مشاهده شدند که علی‌رغم حذف این دام‌ها از گله، ولی اطلاعات تعداد روزهای شیردهی تا زمان حذف (داده اصلی در محاسبه طول عمر تولیدی) محاسبه نگشته بودند. علت عدم محاسبه این داده به دلیل وجود نقص در انتقال اطلاعات از نرم‌افزارهای قبلی، انتقال دام‌ها در بین گله‌ها (با توجه به اینکه سهام عمده تمامی گله‌ها متعلق به هلدینگ کشاورزی و دامپروری فردوس پارس می‌باشد، بعضی از مواقع برای تکمیل پروژه‌ها و یا اجرای طرح‌های افزایش ظرفیت از دام‌های موجود در گله‌های دیگر استفاده شده که با عنوان انتقال دام در بین گله‌ها ثبت شده‌اند) و عدم انتقال کامل اطلاعات، وجود اشتباهات در هنگام ورود داده‌ها در نرم‌افزار و سایر موارد بوده است. تعداد این دام‌ها، ۳۵۵۲ راس بوده که ۲/۶۷ درصد داده‌ها را شامل می‌شدند.

گام سوم پردازش: در بررسی علت‌های حذف دام‌ها مواردی مشاهده گردید که مربوط به حوادث غیر عادی در حذف دام را شامل می‌شدند. نظر به اینکه هدف اصلی از انجام این تحقیق، محاسبه طول

جدول ۲- گام‌های پردازش داده‌ها و عملیات صورت گرفته به تفکیک واحدهای تحت بررسی

Table 2- The steps of data processing and the operations carried out by the units under review

نام گله Farm name	دام‌های حذف شده با روزهای شیردهی صفر Number of deleted cows with zero milking days	دام‌های حذف شده بدون روزهای شیردهی ثبت شده Number of deleted cows with no recorded milking days	حذف‌های داشته Culled cows for other farms	حذف‌های حوادث غیر عادی Culled due to accidents	مانده داده‌ها بعد از پردازش Remaning data after processing	تعداد گاوهای موجود Number of cows available	تعداد کل گاوهای حذف شده Total number of culled cows	تعداد گاوهای حذف شده تحت آنالیز Number of culled cows used for analys
آذرنگین Azarneghin	1	85	427	14	5930	1288	4642	4116
دام اصیل Dam Asil	9	130	1106	16	6849	1269	5580	4328
درج‌زین Darjazin	2	0	55	2	1170	385	785	728
ایوان Eyvan	0	0	17	5	1135	626	509	487
قیام Ghiam	12	31	1473	48	23584	5236	18348	16796
قدس Ghods	3	16	986	9	5808	1047	4761	3750
قروه Ghorveh	3	718	0	6	4973	2514	2459	1735
حسن آباد Hasanabad	0	0	323	2	3007	1149	1858	1533
کنگاور Kangavar	3	332	449	23	9599	1989	7610	6806
خرمدره Khoramdareh	3	22	1423	42	17463	3695	13768	12281
ماهیدشت Mahidasht	4	772	65	10	4627	2388	2239	1392
مگسال Magsal	3	35	2029	80	12999	2718	10281	8137
مهدشت Mahdasht	5	407	1101	31	14874	2956	11918	10379
ملایر Malayer	1	8	73	11	7729	2469	5260	5168
نگین فام Neghinfam	6	93	21	6	6893	2222	4671	4551
رحمت آباد Rahmatabad	6	114	1596	12	10598	3091	7507	5785
تلیسه نمونه TalisehNemooneh	14	132	2102	19	13068	2667	10401	8148
یاسوج Yasooj	1	56	652	6	6274	1246	5028	4314
ظفر Zafar	2	26	892	19	7427	1668	5759	4822
زاگرس Zagros	3	575	712	7	12586	2964	9622	8328
مجموع Total	81	3552	15502	368	176593	43587	133006	113584

جدول ۳- آمار توصیفی داده‌های تحت آنالیز برای تولید شیر ۳۰۵ روز سه بار دوشش

Table 3- Descriptive statistics of the analyzed data for the maximum standard milk production of 305, 3x

شرح		Description	
تعداد N	78036	مجموع اوزان Sum weights	78036
میانگین Mean	12472.5759	مجموع مشاهدات Sum observations	973309929
انحراف استاندارد Std deviation	2513.17758	واریانس Variance	6316061.54
چولگی Skewness	-0.2671042	کشیدگی Kurtosis	0.40257261
مجموع مربعات تصحیح نشده Uncorrected SS	1.26326E13	مجموع مربعات تصحیح شده Corrected SS	4.92874E11
ضریب تغییرات C.V.	20.1496275	میانگین انحراف استاندارد Std error mean	8.99654334

آن‌ها که ۵۱/۸۳ کیلوگرم بوده را مشاهده نمود. همان‌طور که از شکل ۱ بر می‌آید، توزیع داده‌ها در این دو شاخص مشابه شکل زنگوله‌ای بوده و نرمال بودن داده‌ها از طریق مشاهده‌ای قابل استنباط است.

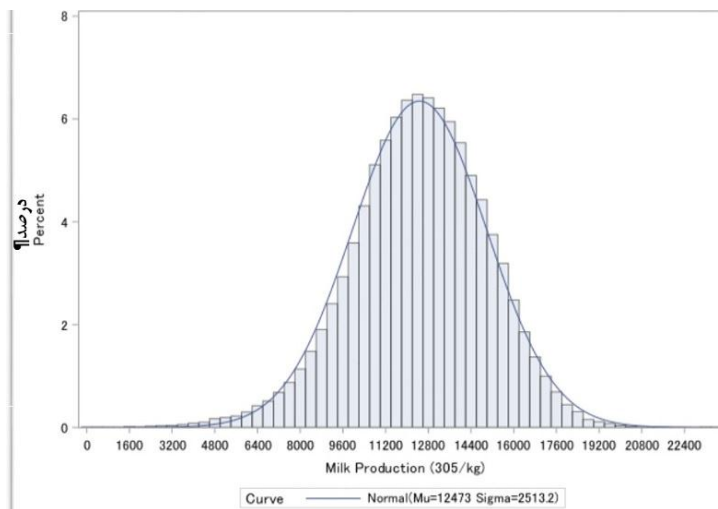
آمار توصیفی داده‌های طول عمر حقیقی دام‌ها:

در گزارش‌های بین‌المللی به‌منظور ملموس بودن طول عمر دام، آن را با واحد ماه گزارش می‌کنند و در بررسی ما نیز طول عمر حقیقی دام‌ها با واحد ماه گزارش شده است. در جدول ۴ آمار توصیفی برای طول عمر حقیقی دام‌ها قابل مشاهده است.

در این بخش، ۱۱۳۵۸۴ داده مورد پردازش قرار گرفت و فاقد داده گم شده بود. میانگین طول عمر تولیدی حقیقی دام‌های تحت بررسی ۳۳/۵۷ ماه است که نشان می‌دهد، دام‌ها فارغ از شکم تولیدی، به‌طور میانگین ۳۳/۵۷ ماه تولید شیر داشته (بدون احتساب روزهای خشکی در دوره تولید شیر) و سپس از گله حذف شده‌اند. انحراف استاندارد داده‌ها ۲۰/۷۷ می‌باشد. شکل مربوط به پراکنش داده‌ها در شکل ۲ قابل مشاهده است. همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشاهده می‌شود، ماهیت توزیع داده‌ها به نحوی است که از توزیع نرمال پیروی نکرده و لذا، بررسی نرمالیت این داده‌ها نیز عدد پایینی را نشان خواهد داد.

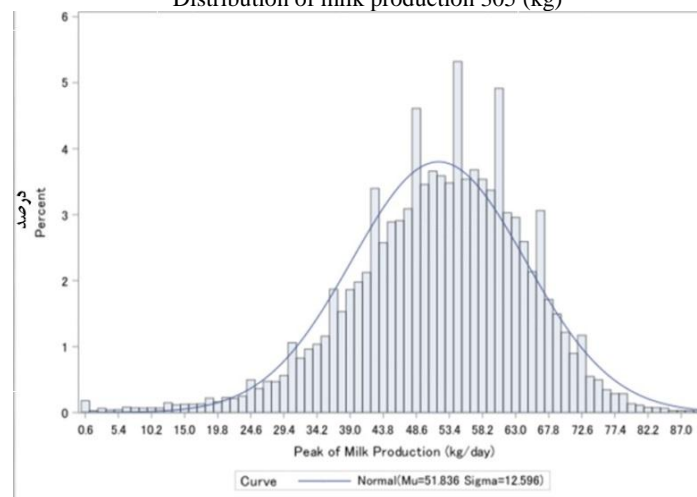
برای محاسبه شیر استاندارد ۳۰۵ روز سه بار دوشش دام‌ها نیاز است که دام‌ها حداقل دارای چهار رکورد ماهیانه شیر بوده و نیز ثبت خشکی این دام‌ها به‌منزله اتمام دوره شیردهی صورت گرفته باشد. به بیان دیگر، اگر دامی قبل از پایان دوره شیردهی اول خود حذف شود و یا اینکه تعداد رکورد شیر ماهانه آن کمتر از چهار رکورد باشد، شیر استاندارد ۳۰۵ روز آن توسط نرم‌افزار قابل محاسبه نیست. بدین ترتیب، تعداد ۷۸۰۳۶ رکورد که بالغ بر ۶۹/۷ درصد از داده‌ها می‌باشند، دارای شرایط مذکور بوده و شیر استاندارد ۳۰۵ روز سه بار دوشش آن‌ها توسط نرم‌افزار محاسبه گردیده است. همان‌طور که در جدول فوق مشاهده می‌شود، میانگین شیر استاندارد تولیدی این دام‌ها ۱۲۴۷۲ کیلوگرم بوده و انحراف استاندارد آن‌ها ۲۵۱۳ کیلوگرم می‌باشد.

تعداد رکورد موجود در آنالیز داده‌های مربوط به پیک تولید شیر ۱۱۱۲۷۶ راس می‌باشد که ۹۷/۹۷ درصد داده‌ها را شامل می‌شود که نشان از این دارد که داده‌های گم شده در این خصوص به ۲/۰۳ درصد است. این دام‌ها شامل دام‌هایی هستند که قبل از رکوردبرداری و ثبت رکورد ماهانه گله حذف شده‌اند و یا به هر دلیلی در طول دوره شیردهی خود حتی یک نوبت نیز ثبت رکورد نشده‌اند. میانگین پیک تولید شیر دام‌های تحت آنالیز ۵۱/۸۳ کیلوگرم بوده است. در شکل ۱ می‌توان توزیع داده‌های تولید شیر استاندارد ۳۰۵ روز حول میانگین آن‌ها که ۱۲۴۷۲ کیلوگرم بوده و نیز پیک تولید شیر حول میانگین



توزیع تولید شیر ۳۰۵ روز (کیلوگرم)

Distribution of milk production 305 (kg)



توزیع پیک تولید شیر (کیلوگرم در روز)

Distribution of peak of milk production. (kg-day)

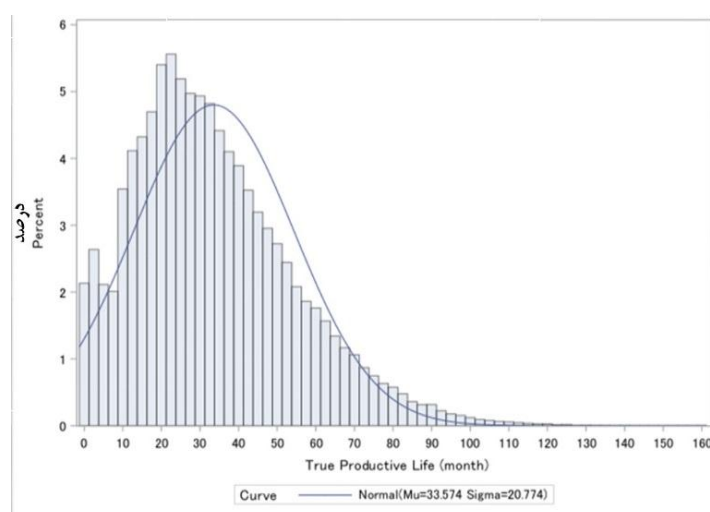
شکل ۱- توزیع داده‌های تولید شیر استاندارد ۳۰۵ روز سه بار دوشش و پیک تولید شیر

Figure 1- Distribution of milk production 305/kg/3x and peak of milk production kg/day

جدول ۴- آمار توصیفی مربوط به طول عمر حقیقی دامها (ماه)

Table 4- Descriptive statistics of the True Productive Life (month)

شرح Description			
تعداد N	113584	مجموع اوزان Sum weights	113584
میانگین Mean	33.5737067	مجموع مشاهدات Sum observations	3813435.9
انحراف استاندارد Std deviation	20.7741613	واریانس Variance	431.565777
چولگی Skewness	0.8047879	کشیدگی Kurtosis	0.65032895
مجموع مربعات تصحیح نشده Uncorrected SS	177049714	مجموع مربعات تصحیح شده Corrected SS	49018535.7
ضریب تغییرات C.V.	61.8762815	میانگین انحراف استاندارد Std error mean	0.06164032



شکل ۲- توزیع داده‌های طول عمر تولیدی حقیقی دام‌ها با میانگین ۳۳/۵۷ ماه

Figure 2- Distribution of true production life (average of 33.57 month)

۳۰۵ روز سه بار دوشش با بررسی ۷۸۰۳۶ داده از گاوهای حذف شده دارای شیر استاندارد شده، ۳۳/۲۷ درصد و معنی‌دار ($P < 0.0001$) محاسبه گردید (جدول ۵ و شکل ۳). نتایج این پژوهش با مطالعات برخی محققین مطابقت داشته (Hudson and Van Vleck, 1964; Ducrocq et al., 1988; Van Vleck, 1981; Hare et al., 2006; Dallago et al., 2022; Ajili et al., 2007). در شکل ۳ می‌توان پراکنش داده های طول عمر حقیقی دام را با شیر تولیدی ۳۰۵ روز استاندارد و نیز پیک تولید شیر استاندارد، مشاهده نمود.

همبستگی بین تولید شیر، پیک تولید شیر و طول عمر حقیقی دام:

میزان همبستگی بین صفات طول عمر حقیقی دام، تولید شیر ۳۰۵ روز سه بار دوشش و بالاترین پیک تولید شیر، محاسبه شد (جدول ۵). همان‌گونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، تمامی این همبستگی‌ها مثبت و معنی‌دار بوده و بالاترین میزان همبستگی بین شیر تولیدی ۳۰۵ روز و پیک تولید شیر ۷۴/۶۶ درصد و معنی‌دار ($P < 0.0001$) است. میزان همبستگی بین طول عمر تولیدی حقیقی با میزان پیک تولید شیر، ۴۷/۸۸ درصد و معنی‌دار ($P < 0.0001$) گردید. همچنین میزان همبستگی طول عمر حقیقی و شیر تولیدی

جدول ۵- میزان همبستگی بین طول عمر حقیقی دام با شیر تولیدی ۳۰۵ روز سه بار دوشش و پیک تولید شیر

Table 5- Correlation of true productive life and milk production (305day/3x) and peak of milk production.

مورد Item	تولید شیر ۳۰۵ روز (کیلوگرم) Milk production (305/kg)	پیک تولید شیر (کیلوگرم در روز) Peak of milk Production (kg/day)	طول عمر تولیدی حقیقی True productive life (month)
تولید شیر ۳۰۵ روز (کیلوگرم)	1.00000	0.74660	0.33273
Milk production (305/kg)	78036	<.0001 78014	<.0001 78036
پیک تولید شیر (کیلوگرم در روز)	0.74660	1.00000	0.47884
Peak of milk production (kg/day)	<.0001 78014	111276	<.0001 111276
طول عمر تولیدی حقیقی	0.33273	0.47884	1.00000
True productive life (month)	<.0001 78036	<.0001 111276	113584

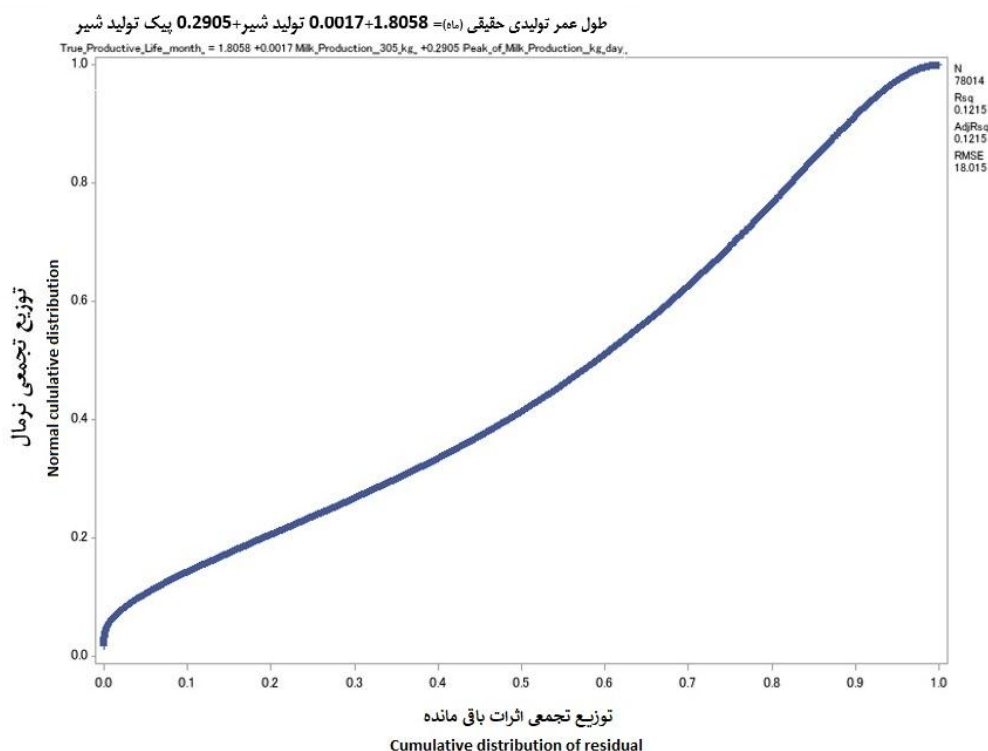
همان گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با پردازش داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS معادله مذکور نشان‌دهنده مؤلفه‌های رگرسیون به شرح ذیل است.

$$TPL = 1.8058 + 0.0017LMP305 + 0.2905 LPMP$$

پارامترهای برآورد شده توسط نرم‌افزار مؤید این مسئله است که عرض از مبدأ شکل، $1/8058$ بوده، یعنی در صورتی که اثر میزان $LMP305$ و $LPMP$ را صفر در نظر بگیریم، عدد محاسبه شده برای TPL برابر با این مقدار خواهد بود. همچنین، ضرایب $LMP305$ و $LPMP$ میزان تأثیر هر یک از این فاکتورها را بر میزان TPL محاسبه شده را می‌رساند، همان گونه که از ارقام بر می‌آید، میزان تأثیر $LPMP$ در TPL بیشتر از میزان $LMP305$ می‌باشد.

بررسی رگرسیون خطی میان طول عمر تولیدی حقیقی، شیر تولیدی ۳۰۵ روز و پیک تولید شیر:

در این آنالیز، متغیر طول عمر تولیدی حقیقی به‌عنوان متغیر وابسته و متغیرهای شیر تولیدی ۳۰۵ روز سه بار دوشش و پیک تولید شیر به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. میزان ضریب تبیین (R^2) برای این آنالیز $12/15$ درصد محاسبه گردید. این میزان ضریب تبیین بیانگر این است که $12/15$ درصد از تغییرات حادث شده در متغیر وابسته یعنی طول عمر حقیق دام بر اثر متغیر ثابت یعنی پارامترهای شیر تولیدی ۳۰۵ روز سه بار دوشش و پیک تولید شیر می‌باشد. پارامترهای ارائه شده در جدول ۶ بیانگر ارتباط معنی‌دار بین متغیرهای مستقل مدل با متغیر پاسخ است ($p < 0.0001$). به بیان دیگر، طول عمر تولیدی حقیقی به‌طور معنی‌داری متأثر از میزان تولید شیر و نیز پیک تولید شیر می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۳- رگرسیون خطی میان طول عمر تولیدی حقیقی و تولید شیر ۳۰۵ روز و پیک تولید شیر

Figure 3- Regression of True productive life and Milk Production (305day/3x) and Peak of Milk Production (kh/day)

صادق است، یعنی زمانی که دام تولید بالاتری دارد، انتظار می‌رود که پیک تولید بالاتری نیز داشته باشد. میزان بالای همبستگی ما بین طول عمر تولیدی حقیقی با پیک

تفسیر نتایج:

به بیان دیگر، زمانی که میزان پیک تولید دام بالا باشد، در حقیقت انتظار تولید شیر بیشتری نیز از آن می‌رود و بر عکس آن نیز

واقعیت مشاهده شده در گله‌های تحت بررسی وجود همبستگی مثبت ۳۳/۲۷ درصدی و معنی‌دار ($P < 0.0001$) را به همراه دارد. در این آنالیز، متغیر طول عمر تولیدی حقیقی به‌عنوان متغیر وابسته و متغیرهای شیر تولیدی ۳۰۵ روز و پیک تولید شیر به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. میزان ضریب تبیین برای این آنالیز ۱۲،۱۵ درصد محاسبه گردید. نتایج نشان از رد فرض صفر مبنی بر مستقل بودن متغیر طول عمر تولیدی حقیقی و نیز شیر تولیدی ۳۰۵ روز و پیک تولید شیر می‌باشد. به بیان دیگر، طول عمر تولیدی حقیقی به‌طور معنی‌داری متأثر از میزان تولید شیر و نیز پیک تولید شیر می‌باشد. همان‌گونه که در فرمول مربوطه و نیز شکل ۴ نیز مشاهده می‌شود، شیر استاندارد تولیدی با ضریب مثبت ۰/۰۰۱۷ و نیز پیک تولید شیر با ضریب مثبت ۰/۲۹۰۵ در ماندگاری دام اثر دارند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که طول عمر تولید دام با میزان بالاتر شیر استاندارد تولیدی و نیز با پیک تولیدی بالاتر افزایش می‌یابد. به عبارتی، هر چقدر دامی دارای پیک تولید بالاتر و نیز شیر استاندارد تولیدی بالاتری باشد، طول عمر تولیدی حقیقی بالاتری نیز خواهد داشت. این نتایج، پاسخی به چالش مطرح شده در ابتدای مقاله است که افزایش تولید شیر گاوهای شیری هلشتاین در طی سالیان نه تنها باعث کاهش طول عمر تولیدی آن‌ها نشده است، بلکه دام‌های با تولید شیر بالاتر دارای عمر تولیدی بالاتر حداقل در جمعیت دامی مورد بررسی داشته‌اند. لذا، توصیه بر این است، انتخاب و نگهداشت دام‌های با تولید بالاتر با طول عمر تولیدی بالا در گله‌ها در راستای افزایش سودآوری و تولید بهینه امری ممکن و معقول می‌باشد و انتخاب دام‌های پر تولید لزوماً به معنی دام‌های با طول عمر تولیدی پایین نمی‌باشد.

سیاسگزاری

بدینوسیله از مدیر عامل، مدیر تولید و همکاران فنی شاغل در شرکت کشاورزی و دامپروری فردوس پارس (هلدینگ دامپروری فردوس پارس) که داده‌های ارزشمند ثبت شده در واحدهای گاو‌داری را در اختیار اینجانب قرار دادند، صمیمانه سپاسگزارم.

تولید شیر، نشان از این دارد که دامی که پیک تولید بالاتری داشته است، طول عمر بالاتری نیز در گله داشته است و این می‌تواند برخلاف موارد مطرح شده در خصوص کاهش ماندگاری دام در اثر فشار بر تولید باشد. هر چند، در این خصوص می‌توان عوامل ذیل را تأثیرگذار دانست:

- توجه بیشتر به جیره و کیفیت خوراک به همراه اقدامات صورت گرفته برای رفاه و آسایش بهاربندهای پر تولید
- بیماری‌یابی بیشتر و تیمار مناسب‌تر بهاربندهای پر تولید
- حساسیت بیشتر در تصمیم‌گیری برای صدور مجوز حذف دام این نکته مؤید این است که همبستگی مثبت و قابل توجه بین طول عمر تولیدی حقیقی دام با شیر استاندارد ۳۰۵ روز سه بار دوشش، نشان از این دارد که دام‌های با پیک تولید بالا، تداوم تولید شیر مناسبی نیز داشته که متعاقب آن شیر استاندارد بالاتری را در پی داشته است و مضافاً اینکه طول عمر تولیدی حقیقی بالاتری نیز دارند. البته از یک زاویه دیگر نیز می‌توان این نکته را این‌گونه بیان کرد که زمانی که دام دارای تولید شیر بالاتری در یک دوره شیردهی است نه تنها از طول عمر تولیدی حقیقی آن نمی‌کاهد، بلکه دام‌های با تولید بالاتر، دارای طول عمر تولیدی بالاتری نیز هستند و این نکته دقیقاً پاسخ به شبهات مطرح شده در بیان مسئله می‌باشد. لذا، خروجی این بررسی می‌تواند این توصیه را به همراه داشته باشد که ماندگاری یا همان طول عمر تولیدی حقیقی در دام‌هایی که تولید شیر بالاتری دارند، بالاتر است. هر چند که وجود این نکته را می‌توان به موارد ذیل نیز دخیل دانست:

- ❖ در واحدهای گاو‌داری تجاری تولید شیر که در آن تولید شیر هدف اصلی واحد می‌باشد، نگهداری دام‌هایی که تولید بالاتری در یک دوره دارند، می‌تواند هم‌راستا با هدف وجودی گله باشد.
- ❖ با توجه به تولید بالای این دام‌ها، هزینه‌کرد برای تغذیه خوب و رفاه دام توجیه اقتصادی دارد.
- ❖ دام‌هایی که تداوم تولید شیر مناسب‌تری دارند، دیرتر به بهاربندهای کم‌تولید (که از کیفیت تغذیه پایین‌تر و امکانات رفاهی کمتری برخوردارند) منتقل شده و از امکانات بهاربندهای پرتولید بیشتر استفاده می‌نمایند.
- ❖ با توجه به بیماری‌یابی و فحلی‌یابی بیشتر در واحدهای پرتولید، تشخیص دام‌های بیمار سریع‌تر اتفاق می‌افتد.

References

1. Ajili, N., Rekik, B., Ben Gara, A., & Bouraoui, R. (2007). Relationships among milk production, reproductive traits, and herd life for Tunisian Holstein-Friesian cows. *African Journal of Agricultural Research*, 2(2), 047-051.
2. Dallago, G. M., Cue, R. I., Wade, K. M., Lacroix, R., & Vasseur, E. (2022). Birth conditions affect the longevity of Holstein offspring. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 1255-1264. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20214>
3. De Vries, A. (2020). Symposium review: Why revisit dairy cattle productive lifespan? *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3838-3845. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17361>
4. Ducrocq, V., Quaas, R., Pollak, E., & Casella, G. (1988). Length of productive life of dairy cows. 2. Variance component estimation and sire evaluation. *Journal of Dairy Science*, 71(11), 3071-3079.
5. Hare, E., Norman, H., & Wright, J. (2006). Survival rates and productive herd life of dairy cattle in the United States. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3713-3720. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72412-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72412-2)
6. Hudson, G. & Van Vleck, L. D. (1981). Relationship between production and stayability in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 64(11), 2246-2250.
7. Van Vleck, L. (1964). First lactation performance and herd life. *Journal of Dairy Science*, 47(9), 1000-1003.

Contents

Ruminant Nutrition

- Dietary Effects of Pomegranate Pomace Powder with or without Tannase Enzyme on Growth Performance and some Blood Parameters of Moghani Male Lambs** 475

Farzad Mirzaei Aghjehgheshlagh, Ali Nori, Bahman Navidshad, Leila kaviani Feizi, Samira karamati Jabehdar

- Investigating the Residual Heavy Metals Lead, Cadmium, Chromium, Arsenic and Nickel in Milk and Body Tissues of Holstien Dairy Cows** 489

Ahmad Davtalabzarghi, Moslem Bashtani, Abbasali Naserian, Mehrdad Mohri

- The Effects of Different Levels and Sources of Oil on Production Performance, Reproduction, Blood Metabolites and Nutrients Digestibility of Kurdish Ewes** 503

Masoud Didarkhah, Moosa Vatandoost

Poultry Nutrition

- The Effect of Ginger on Frozen-Thawed Sperm Quality and Fertility of Broiler Breeder Roosters** 515

Khalil Mirzadeh, Amin Kazemizadeh

- Effect of Wet Litter Biochar, Probiotic and Zeolite on Performance, immunity and Small Meat Quality of Broiler Chickens Reared under Cold Stress** 529

Shokoufeh Hasanvand, Ali Khatibjoo, Hassan Shirzadi, Yahya Mohammadi, Mohammad-Amir Karimi-Torshizi, Derakhshandeh Rahimi

Genetic

- Effect of Growth Hormone Locus Polymorphism on Weight Gain of Gosling** 547

Ghorban Elyasi Zarringhabaie

- Meta-Analysis of RNA-Seq and Microarray Expression Data to Identify Genes Effective in Sheep Muscle Growth and Development** 557

Fahime Mohammadi, Mojtaba Tahmoorespur, Ali Javadmanesh

- Study of Signatures of Positive Selection and Gene Ontology in some Domestic and Wild Sheep Breeds in Iran** 570

Majid Bigham, Mohammadreza Nassiri, Mahyar Heydarpour, Ali Javadmanesh

- Comparison of Different Genomic Relationship Matrices for Multibreed Weighted Single Step GWAS** 585

Seyed Mostafa Mazloom, Mohammad Mahdi Shariati

- Estimation of True Productive Life and Their Correlation with Milk Production in Industrial Holstein Cows of Iran** 599

Saeid Mokhtarzadeh Dilmaghani, Mohamadreza Sanjabi, Abdoalreza Salehi

« Scientific Journal »
Iranian Journal of Animal Science Research

Vol. 15

No. 4

2023

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad (F.U.M.)

Responsible Manager: H. Nassiri Moghaddam (Prof.)

Editor-in-Chief: R. Valizadeh (Prof.)

Editorial Board:

R. Valizadeh	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Danesh Mesgaran	Ruminant Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Chaji	Ruminant Nutrition	(Prof.)	Agricultural Science and Natural Resources University Of Khuzestan
H. Nassiri-Moghaddam	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
A. Golian	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
A. Hassanabadi	Poultry Nutrition	(Prof.)	(F.U.M.)
B. Dastar	Poultry Nutrition	(Prof.)	Gorgan Agricultural and Natural Resources University
H. Janmohammadi	Poultry Nutrition	(Prof.)	Tabriz University
F. Khajali	Poultry Nutrition	(Prof.)	Shahre kord University
N. Pirani	Genetics & breeding	(Asso. Prof.)	Shahre kord University
M.R. Nassiri	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
M. Tahmoores pour	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
S. Zerehdaran	Genetics & breeding	(Prof.)	(F.U.M.)
H. Doosti	Statistics	(Prof.)	Macquarie, Sydney, Australia
M. Sargolzaei	Genetics	(Asso. Prof.)	University of Guelph, Canada

Printed by: Ferdowsi University of Mashhad, Press.

Address: P.O. Box 91775-1163, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Phone: +98-51-38804656

Fax: +98-51-38787430

E-Mail: ijasr@ferdowsi.um.ac.ir

Web Site: <https://ijasr.um.ac.ir>

Contents

Ruminant Nutrition

- Dietary Effects of Pomegranate Pomace Powder with or without Tannase Enzyme on Growth Performance and some Blood Parameters of Moghani Male Lambs** 475
Farzad Mirzaei Aghjehgheshlagh, Ali Nori, Bahman Navidshad, Leila Kaviyani Feizi, Samira Karamati Jabehdar

- Investigating the Residual Heavy Metals Lead, Cadmium, Chromium, Arsenic and Nickel in Milk and Body Tissues of Holstien Dairy Cows** 489
Ahmad Davtalabzarghi, Moslem Bashiani, Abbasali Naserian, Meltrdad Mohri

- The Effects of Different Levels and Sources of Oil on Production Performance, Reproduction, Blood Metabolites and Nutrients Digestibility of Kurdish Ewes** 503
Masoud Didarkhah, Moosa Vatandoost

Poultry Nutrition

- The Effect of Ginger on Frozen-Thawed Sperm Quality and Fertility of Broiler Breeder Roosters** 515
Khalil Mirzadeh, Amin Kazemizadeh

- Effect of Wet Litter Biochar, Probiotic and Zeolite on Performance, Immunity and Small Meat Quality of Broiler Chickens Reared under Cold Stress** 529
Shokoufeh Hasanvand, Ali Khatibjoo, Hassan Shirzadi, Yahya Mohammadi, Mohammad-Amir Karimi-Torshizi, Derakhshandeh Rahimi

Genetic

- Effect of Growth Hormone Locus Polymorphism on Weight Gain of Gosling** 547
Ghorban Elyasi Zarringhabaie

- Meta-Analysis of RNA-Seq and Microarray Expression Data to Identify Genes Effective in Sheep Muscle Growth and Development** 557
Fahime Mohammadi, Mojtaba Tahmoorespur, Ali Javadmanesh

- Study of Signatures of Positive Selection and Gene Ontology in some Domestic and Wild Sheep Breeds in Iran** 570
Majid Bigham, Mohammadreza Nassiri, Mahyar Heydarpour, Ali Javadmanesh

- Comparison of Different Genomic Relationship Matrices for Multibreed Weighted Single Step GWAS** 585
Seyed Mostafa Mazloom, Mohammad Mahdi Shariati

- Estimation of True Productive Life and Their Correlation with Milk Production in Industrial Holstein Cows of Iran** 599
Saeid Mokhtarzadeh Dilmaghani, Mohammadreza Sanjabi, Abdoalreza Salehi