نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـــار ۱۳۹٦
ص‌ص: ۱۲۹~۱٤۲

تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی کلسیم، فسفر و ویتامین D بر جوجه‌درآوری و عملکرد، فراسنجه‌های بیوشیمیائی خون و استخوان

- **نواب قبادی** (نویسنده مسئول)
عضوهیات علمی گروه علوم دامی ، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران- ایران
- **حمیدرضا همتی متین**
دانش آموخته دکتری تخصصی تغذیه طیور،دانشگاه تربیت مدرس،تهران- ایران

تاریخ دریافت : بهمن ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۸۱۶۰۷۲۳
Email: navabd21@yahoo.com

چکیده

اثرات تزریق درون تخم‌مرغی کلسیم (Ca)، فسفر (P) و ویتامین D (VitD) بر درصد جوجه درآوری، ویژگی‌های استخوان و عملکرد جوجه‌های گوشتی پس از تفریخ، در دو آزمایش بررسی شد. در آزمایش اول، تعداد ۱۰۸۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار (سویه‌ی راس ۳۰۸) به‌طور تصادفی به ۹ گروه آزمایشی اختصاص داده شدند. تیمارها شامل ۱- کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)، ۲- کنترل منفی (بدون تزریق محلول)، ۳- تزریق محلول Ca، ٤- تزریق محلول P، ٥- تزریق محلول VitD، ٦- تزریق محلول Ca×P، ۷- تزریق محلول Ca×VitD، ۸- تزریق محلول P×VitD و ۹- تزریق محلول Ca×P×VitD بودند. حجم مقدار تزریق ۰/٥ میلی لیتر بود. در آزمایش دوم، پس از تفریخ، تعداد ۸۰ قطعه جوجه گوشتی از تیمارهای دوره انکوباسیون انتخاب (۷۲۰ قطعه) و در قالب طرح کاملا تصادفی (٤ تکرار با ۲۰ قطعه پرنده) به مدت ٦ هفته پرورش یافتند. نتایج نشان دادند که درصد جوجه‌درآوری با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P×VitD افزایش یافت (P<0.05). همین تیمار در مقایسه با سایر تیمارها باعث افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پلاسمایی جوجه‌های گوشتی در ۱ و ٤۲ روزگی شد (P<0.05). قدرت شکنندگی استخوان جوجه‌های گوشتی در ۱ و ٤۲ روزگی با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P، Ca×VitD و Ca×P×VitD در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود (P<0.05). درصد Ca درشت‌نی جوجه‌های گوشتی در ۱ و ۲۱ روزگی با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×VitD و Ca×P×VitD نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (P<0.05). نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌کنند که اثرات تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD در روز اول انکوباسیون بر حسب نوع ماده‌ی تزریقی متفاوت است و می‌تواند به شکلی متفاوت توسعه‌ی استخوان را تحت تاثیر قرار دهد، با این حال تزریق ترکیبی مواد مغذی نسبت به تزریق منفرد آن‌ها موثرتر بود.

واژه‌های کلیدی: استخوان، تزریق داخل تخم‌مرغی، جوجه گوشتی، فسفر، کلسیم، ویتامین D

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 129-142

Effect of in ovo Injection of calcium, phosphorus and vitamin D on hatchability, Performance, blood biochemical and bone parameters of broiler chickens

By: N.Ghobadi[1]*, H.R.Hematti Matin[2]
1. Department Of Animal Science , Payam Noor University,pox19395-3697, Tehran- Iran
2. Undergraduate PhD in Poultry Nutrition, Shaheed Modarres University, Tehran, Iran
* Contact Author: +989188160723 , Corresponding author: navabd21@yahoo.com

Received: February 2016 **Accepted: June 2016**

In two experiments, the effect of *In Ovo* Injection (IOI) of calcium (Ca), phosphorus (P), and vitamin D (VitD) was studied on hatchability, post-hatch bone characteristics, and broiler chick's performance. In first experiment, the 1080 fertilized eggs (Ross strain) were randomly distributed into 9 experimental groups. Treatments were 1- positive control (injection of physiologic serum) 2- negative control (without injection of solution), 3- injection of Ca solution, 4- injection of P solution, 5- injection of VitD solution, 6- injection of Ca×P, 7- injection of Ca×VitD, 8- injection of P×VitD solution, 9- injection of Ca×P×VitD. The volume of injection was 0.5 ml. After hatched, 80 chicks of each experimental group were selected and reared under a completely randomized design with 4 replicates, 20 birds each for 6 weeks. The hatchability percentage increased by IOI of Ca×P×VitD ($P<0.05$). The alkaline phosphatase activity of broiler chicks was greater for IOI of Ca×P×VitD at 1 and 42 days of age compared to that of the other treatments ($P<0.05$). The bone breaking strength of broilers increased by IOI of Ca×P, Ca×VitD, and Ca×P×VitD at 1 and 42 days of age in comparison to that of other treatments ($P<0.05$). Bone Ca concentration of broiler chickens increased by IOI of Ca×VitD and Ca×P×VitD at d 1 and 21 in compared with other treatments ($P<0.05$). The obtained results suggest that the effect of IOI of Ca, P, and VitD /egg on 1-d of incubation varied based on injected nutrients type and differently affect bone development, however, IOI of combination of nutrients are more effective rather than its individual application.

Key words: Bone, Broiler performance, In ovo injection, Calcium, Phosphorus, Vitamin D.

مقدمه

سرعت رشد جوجه‌های گوشتی در طی دهه‌های اخیر به طور چشمگیری افزایش یافته است (Petracci and Cavani, 2012) و ضرورت وجود ساختار استخوانی مطلوب را طلب می‌کند. از این رو، نیاز جنین جوجه‌های گوشتی به انواع مواد مغذی برای توسعه‌ی ساختار استخوانی افزایش یافته است. احتمالا عدم تعادل بین نیاز جنین و ذخایر مواد مغذی موجود در داخل تخم‌مرغ، اصلی‌ترین عامل محدودکننده‌ی حداکثر رشد و نمو جوجه‌ها قبل و بعد از تفریخ است. رشد و توسعه‌ی استخوان عمدتا در خلال توسعه‌ی جنینی رخ می‌دهد، به همین خاطر برای بهبود شرایط استخوانی جوجه‌های گوشتی چندین روش مورد بررسی قرار گرفته است (Bello و همکاران، ۲۰۱۴ b).

کلسیم (Ca) عمده‌ترین ماده‌ی معدنی در بدن حیوانات است (McDonald و همکاران، ۱۹۹۵؛ Ayasan and Okan, 1999) که بیش از ۹۰ درصد آن در ساختار استخوان‌ها شرکت داشته و در ترکیب با فسفر (P)، کریستال‌های فسفات یا هیدروکسی آپاتیت[1] را ایجاد می‌کنند (Scott و همکاران، ۱۹۸۲؛

[1] - Hydroxyapatite

Bello و همکاران، b ۲۰۱۴). به جز تشکیل استخوان، Ca و P نقش‌های حیاتی دیگری در بدن داشته و ارتباط بسیار نزدیکی با ویتامین D (VitD) دارند (McDonald و همکاران، ۱۹۹۵؛ Nordin و همکاران، ۱۹۹۷). نشان داده شده است که VitD و مشتقات آن، جذب P را در جوجه‌های گوشتی و موش‌های صحرایی بهبود می‌دهند. مکانیسم (های) درگیر در این موضوع روشن نیست اما چندین تئوری پیشنهاد شده است [برای مثال: VitD پمپ فسفر وابسته به کلسیم را در سلول‌های پوشاننده‌ی روده تحریک می‌کند یا VitD به عنوان یک هورمون ناقل فسفر، انتقال فسفر را در اندام‌های جذبی شامل روده افزایش می‌دهد (Shim و همکاران، ۲۰۰۸)]. ویتامین D_3 یا از جیره جذب می‌شود یا در پوست از ترکیب دی‌هیدروکلسترول[2] ساخته می‌شود (De Matos, 2008). ویتامین D_3 در پرندگان برای معدنی شدن مناسب استخوان و تشکیل پوسته‌ی تخم‌مرغ ضروری می‌باشد (Bello و همکاران، b ۲۰۱۴). معدنی‌شدن استخوان فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که به یون‌های Ca، P و VitD در مایعات بدن برای تشکیل ساختار اولیه کریستال‌های استخوان نیاز دارد (Dziedzic-Gocławska, 1995). از سوی دیگر کمبود Ca، P یا VitD در جوجه‌های گوشتی به مشکلات بسیاری در دوره‌ی رشد منتهی می‌شود و به موجب آن کیفیت گوشت مصرفی نیز کاهش می‌یابد. (Blake and Fogelman, 2002; Bennett, 2008). یک روش برای تامین نیازمندی‌های جنین با مواد غذایی بیشتر، تزریق داخل تخم‌مرغی مواد مغذی می‌باشد (Uni و همکاران، ۲۰۰۵؛ Salary و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghobadi and Hemati Matin, 2015). در این راستا گزارش شده است که تزریق داخل تخم‌مرغی ۲۵-هیدروکسی کوله‌کلسی‌فرول[3] رشد و نمو استخوان‌ها را بهبود داده است (Bello و همکاران، b۲۰۱۴). آن‌ها پیشنهاد دادند یک بار تزریق داخل تخم‌مرغی ۲۵-هیدروکسی کوله‌کلسی‌فرول معادل با مکمل کردن جیره‌ای آن می‌باشد (Bello و همکاران، b۲۰۱۴). این فرضیه وجود دارد که تزریق هم‌زمان داخل تخم‌مرغی چندین مکمل از مواد مغذی بتواند نسبت به تزریق منفرد آن‌ها موثرتر باشد. در مطالعات پیشین تزریق هم‌زمان داخل تخم‌مرغی چند ماده‌ی مغذی به صورت کمپلکس Ca، P و VitD بر توسعه‌ی استخوان جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت (Ghobadi and Hemati Matin, 2015). مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی تزریق داخل تخم‌مرغی مواد مغذی Ca، P و VitD به شکل منفرد و یا ترکیبی بر جوجه‌درآوری، توسعه‌ی سیستم اسکلتی و عملکرد جوجه‌های گوشتی جهت تکمیل نتایج مربوط به تزریق داخل تخم‌مرغی چند ماده‌ی مغذی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

در آزمایش اول، به منظور تعیین اثرات تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و P به همراه VitD بر جوجه‌درآوری، تعداد ۱۰۸۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار سویه‌ی راس ۳۰۸ (سن مرغ مادر۴۰ هفته، میانگین وزن تخم‌مرغ ۶۲ گرم) از شرکت بهپرور تهیه شد. تخم‌مرغ‌ها توزین و بر اساس میانگین وزنی مشابه (۴±۶۲ گرم) در ۹ گروه آزمایشی با ۴ تکرار توزیع شدند. شرایط دمایی دستگاه جوجه‌کشی بر اساس توصیه‌ی سازنده تنظیم شد به صورتی که در بخش ستر دمای ۳۷/۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و در بخش هچر دمای ۳۷/۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. رطوبت نسبی هم در ستر به صورت ۶۳ تا ۶۵ درصد و در هچر به صورت ۷۳ تا ۷۵ درصد بود. تزریق دورن تخم‌مرغی در روز اول انکوباسیون و با مقدار نیم میلی لیتر از محلول‌ها به ازای هر تخم‌مرغ صورت گرفت. تیمارها شامل ۱- کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)، ۲- کنترل منفی (بدون تزریق محلول)، ۳- تزریق محلول Ca، ۴- تزریق محلول P، ۵- تزریق محلول VitD، ۶- تزریق محلول Ca×P، ۷- تزریق محلول Ca×VitD، ۸- تزریق محلول P×VitD، و ۹- تزریق محلول Ca×P×VitD بودند. تزریق تا عمق حدودا ۱/۳ سانتی‌متر و در آلبومین با استفاده از سر سوزن شماره ۲۵ انجام گرفت (Bhanja و همکاران، ۲۰۰۴؛ Ghobadi and Hemati Matin, 2015). غلظت‌های VitD، Ca و P به ترتیب ۵۰ میکروگرم، ۱۰ پی‌پی‌ام و ۵ پی‌پی‌ام بودند. برای تزریق ابتدا محل کیسه‌ی هوایی تخم‌مرغ‌ها با استفاده

[2] - Dehydrocholesterol
[3]- 25-hydroxycholecalciferol

از روش نوربینی مشخص و سپس محلول تزریق به وسیله سرنگ به تخم‌مرغ‌ها تزریق شد. به منظور جلوگیری از انتقال آلودگی احتمالی پس از هر بار خالی شدن سرنگ، از سرنگ جدید استفاده شد. قبل از تزریق، محل مورد نظر با الکل ضدعفونی شده و بعد از تزریق توسط پارافین مذاب مسدود شد. عمل تزریق در محفظه‌ی تعبیه شده‌ی پلاستیکی که دما (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) در آن‌جا کنترل می‌شد، صورت گرفت. در روز ۲۱ انکوباسیون، تعداد جوجه هچ شده در هر تیمار یادداشت و درصد جوجه‌درآوری محاسبه شد. همچنین وزن جوجه‌های تفریخ شده نیز ثبت شد.

در آزمایش دوم، به منظور بررسی اثرات تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و P به همراه VitD بر عملکرد جوجه‌های گوشتی، تعداد ۸۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی از هر گروه آزمایشی دوره‌ی انکوباسیون انتخاب و در قالب طرح کاملا تصادفی برای ۶ هفته پرورش داده شدند. برنامه‌ی نوردهی به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت تاریکی بود. دمای سالن در روز اول دوره‌ی پرورش ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد و بعد از آن دما هر هفته تا هفته‌ی سوم، ۳ درجه‌ی سانتی‌گراد کاهش یافت و بعد از آن دما ثابت نگه داشته شد. نیازهای غذایی توصیه شده در کاتالوگ راهنمای مدیریت پرورش جوجه گوشتی سویه‌ی راس مبنای تنظیم جیره‌های مورد استفاده در آزمایش قرار گرفت (Ross 308، ۲۰۱۴؛ جدول ۱). دسترسی پرندگان به جیره‌ی آردی شکل و آب به صورت آزاد بود. افزایش وزن بدن و مصرف خوراک به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد و ضریب تبدیل غذایی بر اساس آن‌ها محاسبه شد. برای بررسی نتایج اثرات تزریق داخل تخم‌مرغی در روز تفریخ، دو پرنده از هر تکرار به شکل تصادفی انتخاب و خون‌گیری از پرنده‌ها صورت گرفت. همچنین بعد از کشتار، استخوان درشت‌نی پای راست و چپ آن‌ها جدا شد. بعد از لخته شدن نمونه خون‌ها در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سرم جدا شده به آزمایشگاه منتقل شد و فعالیت آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت‌های اختصاصی اندازه‌گیری شد (Biosystem-EN ISO 13485, Spain). درشت‌نی پای راست بلافاصله در فریزر قرار داده شده و درشت‌نی پای چپ توزین و خشک شدند (Ghobadi and Hemati Matin 2015). محتوای خاکستر، کلسیم، فسفر و مس نمونه درشت‌نی پای راست توسط ICA (Integra XL GBC, USA) تعیین شد (Nouri Sanami و همکاران، ۲۰۱۴). با استفاده از تکنیک‌های شرح داده شده توسط Bello و همکاران (۲۰۱۴a) درشت‌نی پای چپ در معرض قدرت شکنندکی استخوان قرار گرفتند (Instron Universal Testing Machine Model 4502, Canton, MA). به طور خلاصه، استخوان‌های درشت‌نی در بین دو جایگاه نگهدارنده‌ی دستگاه که به فاصله‌ی ۴ سانتی‌متری قرار داده شدند. با استفاده از یک لودسل ۵۰ کیلوگرمی و با سرعت ۱۰ میلی‌متر در هر دقیقه، نیرویی به بخش مشابهی از نقطه میانی هر درشت‌نی وارد گردید. مقدار نیروی وارد شده توسط دستگاه ثبت شد. در روزهای ۲۱ و ۴۲، اندازه‌گیری‌های اشاره شده در بالا تکرار شدند.

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۸) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌های دوره‌ی پرورشی به صورت یک طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه‌ی GLM نرم‌افزار، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن چند دامنه‌ای در سطح خطای آزمایشی ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری آزمایش به صورت زیر می‌باشد:

$$Yijk=\mu + Ti + eij$$

در فرمول فوق **Yij**= مقدار عددی هر یک از مشاهده‌ها در آزمایش، **μ**= میانگین جمعیت، **Ti** = اثر تیمارهای آزمایشی، **eij**= اثر خطای آزمایش در نظر گرفته شده است.

جدول ۱- ترکیب جیره در دوره‌های مختلف آزمایشی

اجزای خوراکی (درصد)	۱ تا ۲۱ روزگی	۲۲ تا ۴۲ روزگی
ذرت	۵۹/۱۵	۶۰/۶۷
کنجاله‌ی سویا (۴۲ درصد پروتئین خام)	۳۴/۲۸	۳۴/۱۱
روغن سویا	۱/۶۶	۱/۲۹
سنگ آهک	۱/۶۴	۱/۳۶
دی کلسیم فسفات	۱/۸۸	۱/۶۱
پرمیکس ویتامین و مواد معدنی[۱]	۰/۵۰	۰/۵۰
نمک	۰/۳۳	۰/۳۳
DL–متیونین	۰/۲۹	۰/۱۲
L–لیزین	۰/۱۹	–
L–ترئونین	۰/۰۷	–
جوش شیرین	۰/۰۱	۰/۰۱
مواد مغذی محاسبه شده		
انرژی قابل متابولیسم (Kcal/kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام (٪)	۲۱/۵۴	۲۱/۵۴
کلسیم (٪)	۱/۰۰	۰/۸۵
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۷	۰/۴۲
متیونین قابل هضم (٪)	۰/۴۶	۰/۳۷
متیونین و **سیستئین** قابل هضم (٪)	۰/۷۵	۰/۶۹
لیزین قابل هضم (٪)	۱/۱۹	۰/۹۴

[۱] به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A: IU ۱۱۰۰۰، ویتامین D_3: IU ۳۰۰۰، ویتامین E: ۵۰ میلی‌گرم، ویتامین K_3: ۵ میلی‌گرم، تیامین: ۲ میلی گرم، ریبو فلاوین: ۸ میلی‌گرم، پانتوتنات کلسیم: ۱۲/۴۰ میلی‌گرم، نیاسین: ۵۰ میلی‌گرم، پیریدوکسین: ۷ میلی‌گرم، اسید فولیک: ۲ میلی‌گرم، ویتامین B_{12}: ۱/۶ میلی‌گرم، بیوتین: ۵ میلی‌گرم، کلرید کولین: ۱۱۰۰ میلی گرم، آنتی اکسیدات: ۱۰۰ میلی‌گرم، Mn: ۸۰ میلی‌گرم، Zn: ۸۴/۵ میلی گرم، Fe: ۲۵۰ میلی‌گرم، Cu: ۲۰ میلی‌گرم، I: ۱/۰ میلی‌گرم، Co: ۰/۴۸ میلی‌گرم و Se: ۰/۳ میلی‌گرم.

نتایج

نتایج اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر درصد جوجه‌درآوری و وزن بدن جوجه‌های گوشتی پس از تفریخ در جدول ۲ آورده شده است. نتایج حاکی از آن است که بیشترین درصد جوجه‌درآوری مربوط به گروه تزریق شده با کمپلکس Ca×P×VitD بود (**P<0.05**)، هرچند تفاوت آن با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P، Ca×VitD و P×VitD معنی‌دار نبود؛ ولی تزریق داخل تخم‌مرغی منفرد Ca و منفرد VitD به کاهش درصد جوجه‌درآوری منجر شد (**P<0.05**). همچنین وزن بدن جوجه‌ها در زمان تفریخ در گروه‌های تزریق شده با Ca×P×VitD و Ca×VitD در تخم‌مرغ‌ها نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (**P<0.05**).

اعداد مندرج در جدول ۳، اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P به همراه VitD را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی نشان می‌دهند. همان گونه که مشخص است وزن بدن، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

جدول ۲- اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و P به همراه VitD بر درصد جوجه‌درآوری و وزن بدن جوجه‌های گوشتی

تیمارها	درصد جوجه‌درآوری (٪)	وزن بدن (گرم)
کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)	۷۸/۰۱^{b}	۴۵/۲۲^{b}
کنترل منفی (بدون تزریق)	۶۷/۷۸^{c}	۴۴/۵۷^{b}
تزریق Ca	۶۷/۵۰^{c}	۴۴/۶۱^{b}
تزریق P	۷۶/۶۷^{b}	۴۷/۵۳^{ab}
تزریق VitD	۶۸/۰۱^{c}	۴۵/۲۴^{b}
تزریق Ca×P	۸۴/۴۴^{ab}	۴۷/۲۶^{ab}
تزریق Ca×VitD	۸۳/۰۱^{ab}	۵۳/۱۴^{a}
تزریق P×VitD	۸۱/۳۹^{ab}	۵۰/۷۸^{ab}
تزریق Ca×P×VitD	۸۸/۶۸^{ab}	۵۳/۴۰^{a}
خطای استاندارد میانگین‌ها	۱/۶۱۳	۰/۸۵۶
ارزش P	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۵

مقادیر تزریق‌ها شامل ۵۰ میکروگرم VitD، ۱۰ پی‌پی‌ام Ca، و ۵ پی‌پی‌ام P می‌باشد.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری ندارند (**P<0.05**).

جدول ۳ - اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و P به همراه VitD بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در طول دوره‌ی آزمایشی

تیمارها	وزن زنده بدن (گرم)	خوراک مصرفی (گرم)	ضریب تبدیل غذایی
کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)	۲۱۶۱/۷	۴۱۰۵/۶	۱/۹۲
کنترل منفی (بدون تزریق)	۲۳۲۱/۸	۴۰۹۶/۴	۱/۷۸
تزریق Ca	۲۱۶۰/۳	۴۱۹۲/۵	۱/۹۶
تزریق P	۲۱۲۳/۲	۴۱۶۹/۶	۱/۹۷
تزریق VitD	۲۱۸۳/۷	۳۹۹۳/۱	۱/۸۳
تزریق Ca×P	۲۲۶۹/۰	۴۱۶۹/۱	۱/۸۵
تزریق Ca×VitD	۲۴۸۸/۱	۴۲۱۱/۷	۱/۶۷
تزریق P×VitD	۲۱۶۴/۴	۴۰۲۱/۰	۱/۸۶
تزریق Ca×P×VitD	۲۳۰۱/۰	۴۲۴۹/۴	۱/۸۵
خطای استاندارد میانگین‌ها	۳۹/۳۱۵	۴۰/۹۳۴	۰/۰۳۵
ارزش P	۰/۴۹۸۸	۰/۸۹۴۱	۰/۷۷۰۴

مقادیر تزریق‌ها شامل ۵۰ میکروگرم VitD، ۱۰ پی‌پی‌ام Ca، و ۵ پی‌پی‌ام P می‌باشد.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری ندارند (P<0.05).

جدول ۴، اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD را بر فعالیت آلکالین فسفاتاز پلاسمای جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که فعالیت پلاسمایی آنزیم آلکالین فسفاتاز جوجه‌های گوشتی با تزریق داخل تخم‌مرغی مجموعه‌ی Ca×P×VitD در یک و ۴۲ روزگی جوجه‌ها نسبت به سایر تیمارها بالاتر بود (P<0.05). علاوه بر این، تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×VitD و Ca×P×VitD سبب ایجاد فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پلاسمایی بالاتری در جوجه‌های گوشتی و تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و شاهد بدون تزریق به کمترین فعالیت آلکالین فسفاتاز پلاسمایی در سن ۲۱ روزگی منتهی شد (P<0.05).

جدول ٤- اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر فعالیت آلکالین فسفاتاز (U/L) جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف

تیمارها	روز ۱	روز ۲۱	روز ۴۲
کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)	۶۲۸/۰۰^{bc}	۲۷۲/۶۷^{abc}	۲۶۰/۰۰^{e}
کنترل منفی (بدون تزریق)	۶۰۵/۳۳^{cd}	۲۶۹/۰۰^{bc}	۲۶۰/۶۷^{e}
تزریق Ca	۵۴۵/۰۰^{e}	۲۶۷/۰۰^{c}	۲۹۶/۰۰^{cd}
تزریق P	۵۶۰/۶۷^{e}	۲۸۴/۶۷^{abc}	۲۶۳/۰۰^{e}
تزریق VitD	۵۴۷/۶۷^{e}	۲۸۴/۰۰^{abc}	۲۷۴/۰۰^{de}
تزریق Ca×P	۶۴۴/۶۷^{b}	۲۸۵/۶۶^{abc}	۳۰۸/۳۳^{bc}
تزریق Ca×VitD	۶۲۵/۶۷^{bc}	۲۹۶/۰۰^{a}	۳۳۳/۰۰^{b}
تزریق P×VitD	۵۸۰/۰۰^{ed}	۲۹۳/۶۷^{ab}	۳۱۳/۳۳^{bc}
تزریق Ca×P×VitD	۶۸۲/۳۳^{a}	۲۹۸/۰۰^{a}	۳۶۰/۰۰^{a}
خطای استاندارد میانگین‌ها	۹/۳۵۱	۳/۰۱۸	۷/۰۱۳
ارزش P	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۷	<۰/۰۰۰۱

مقادیر تزریق‌ها شامل ۵۰ میکروگرم VitD، ۱۰ پی‌پی‌ام Ca، و ۵ پی‌پی‌ام P می‌باشد. میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری ندارند ($P<0.05$).

در جدول ۵ اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر رسوب مواد معدنی در استخوان درشت‌نی جوجه‌های گوشتی در سنین یک، ۲۱ و ۴۲ روزگی آورده شده است. نتایج نشان دهنده‌ی این مطلب است که درصد کلسیم درشت‌نی جوجه‌های گوشتی با تزریق داخل تخم‌مرغی ترکیبی Ca×VitD و Ca×P×VitD در مقایسه با سایر تیمارها در روز یک و ۲۱ افزایش نشان داد ($P<0.05$). درصد فسفر درشت‌نی جوجه‌های گوشتی در روز یک بعد از تفریخ با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×VitD و Ca×P×VitD، در روز ۲۱ بعد از تفریخ با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P×VitD و در ۴۲ روزگی با تزریق داخل تخم‌مرغی P و P×VitD افزایش یافت ($P<0.05$). با این حال، تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P×VitD محتوای عنصر مس درشت‌نی جوجه‌های گوشتی را در یک و ۲۱ روزگی افزایش داد ($P<0.05$)، در حالی که محتوای عنصر مس درشت‌نی جوجه‌های گوشتی با تزریق داخل تخم‌مرغی VitD و Ca×P در ۴۲ روزگی افزایش یافت ($P<0.05$).

اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر ماده‌ی خشک، محتوای خاکستر استخوان و قدرت شکنندگی استخوان درشت‌نی جوجه‌های گوشتی در سنین یک، ۲۱ و ۴۲ روزگی در جدول ۶ نشان داده شده است. ماده‌ی خشک درشت‌نی جوجه‌های گوشتی به طور معنی‌داری در روز یک بعد از تفریخ با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca و در روز ۲۱ و ۴۲ روزگی بعد از تفریخ با تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P×VitD افزایش نشان داد ($P<0.05$). به علاوه، محتوای خاکستر درشت‌نی جوجه‌های گوشتی با تزریق Ca×VitD در داخل تخم‌مرغ در یک و ۴۲ روزگی افزایش یافت، در حالی که تزریق داخل تخم‌مرغی Ca×P×VitD محتوای خاکستر درشت‌نی جوجه‌های گوشتی را در سن ۲۱ روزگی افزایش داد ($P<0.05$). مقاومت درشت‌نی جوجه‌های گوشتی با تزریق Ca×P، Ca×VitD و Ca×P×VitD در یک و ۴۲ روزگی در مقابل نیروی وارده افزایش نشان داد ($P<0.05$).

جدول ۵- اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر رسوب مواد معدنی در استخوان (میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم استخوان) جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف

تیمارها	روز ۱			روز ۲۱			روز ۴۲		
	کلسیم	فسفر	مس	کلسیم	فسفر	مس	کلسیم	فسفر	مس
کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)	۷/۲۳^{c}	۳/۹۶^{ab}	۳/۲۴^{bc}	۱۵/۵۴^{bc}	۷/۱۰^{bc}	۱/۰۲^{cde}	۱۶/۲۵	۷/۱۷^{b}	۱/۰۶^{bcd}
کنترل منفی (بدون تزریق)	۷/۵۳^{abc}	۳/۸۳^{abc}	۳/۰۹^{c}	۱۴/۸۱^{c}	۷/۰۵^{bc}	۰/۸۹^{ed}	۱۵/۹۱	۷/۸۲^{ab}	۱/۰۱^{cd}
تزریق Ca	۷/۷۶^{ab}	۳/۱۸^{c}	۳/۶۹^{d}	۱۵/۰۵^{c}	۶/۷۰^{c}	۱/۱۸^{c}	۱۶/۷۸	۸/۳۰^{ab}	۱/۱۷^{ab}
تزریق P	۶/۶۵^{d}	۳/۵۱^{bc}	۲/۵۲^{d}	۱۵/۵۷^{bc}	۶/۴۳^{c}	۱/۳۴^{b}	۱۶/۳۳	۹/۰۸^{a}	۱/۱۸^{ab}
تزریق VitD	۷/۱۲^{cd}	۳/۵۲^{bc}	۲/۶۳^{d}	۱۶/۰۰^{abc}	۷/۲۵^{bc}	۱/۱۲^{cd}	۱۵/۹۲	۸/۳۰^{ab}	۱/۲۵^{a}
تزریق Ca×P	۷/۴۹^{abc}	۴/۰۷^{ab}	۳/۴۷^{b}	۱۷/۴۶^{ab}	۷/۹۹^{ab}	۱/۰۷^{cde}	۱۵/۹۹	۸/۱۷^{ab}	۱/۳۱^{a}
تزریق Ca×VitD	۷/۸۹^{a}	۴/۴۹^{a}	۴/۱۸^{a}	۱۷/۷۵^{a}	۶/۱۵^{c}	۰/۹۴^{e}	۱۶/۸۷	۸/۳۴^{ab}	۱/۱۹^{ab}
تزریق P×VitD	۷/۳۰^{bc}	۳/۵۶^{bc}	۳/۲۱^{bc}	۱۷/۴۰^{ab}	۸/۰۷^{ab}	۱/۰۳^{cde}	۱۸/۲۶	۸/۹۸^{a}	۰/۹۷^{d}
تزریق Ca×P×VitD	۷/۹۸^{a}	۴/۴۹^{a}	۴/۱۹^{a}	۱۷/۷۶^{a}	۸/۷۴^{a}	۱/۵۰^{a}	۱۷/۷۵	۸/۶۰^{ab}	۱/۱۵^{abc}
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۰۸۹	۰/۱۰۱	۰/۱۱۸	۰/۲۸۶	۰/۱۸۶	۰/۰۳۷	۰/۲۴۷	۰/۱۶۹	۰/۰۲۴
ارزش P	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۲۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۲۶	۰/۰۰۱۶	<۰/۰۰۰۱	۰/۲۳۵۶	۰/۲۲۴۷	۰/۰۰۱۷

مقادیر تزریق‌ها شامل ۵۰ میکروگرم VitD، ۱۰ پی‌پی‌ام Ca، و ۵ پی‌پی‌ام P می‌باشد.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری ندارند (P<۰.۰۵).

جدول ٦- اثر تزریق داخل تخم‌مرغی Ca، P و VitD بر ماده‌ی خشک (DM، درصد)، محتوای خاکستر استخوان (BMA[٤]، درصد) و قدرت شکنندگی استخوان درشت‌نی (BBS[٥]، کیلوگرم) جوجه‌های گوشتی

تیمارها	روز ۱			روز ۲۱			روز ۴۲		
	DM	BMA	BBS	DM	BMA	BBS	DM	BMA	BBS
کنترل مثبت (تزریق سرم فیزیولوژی)	۴۵/۷۶^{de}	۱۹/۶۷^{c}	۱/۱۷^{b}	۴۴/۰۶^{abc}	۳۳/۰۰^{cd}	۱۸/۰۰	۵۲/۸۸^{ab}	۲۹/۶۷^{ef}	۲۴/۶۷^{ab}
کنترل منفی (بدون تزریق)	۴۴/۲۹^{e}	۲۱/۰۱^{bc}	۱/۰۳^{b}	۴۳/۳۲^{abc}	۳۰/۰۰^{e}	۱۹/۰۰	۴۴/۱۶^{d}	۳۰/۰۰^{ef}	۲۶/۰۰^{ab}
تزریق Ca	۴۴/۰۱^{e}	۲۲/۰۰^{bc}	۱/۱۳^{b}	۳۹/۸۵^{c}	۳۱/۳۳^{de}	۱۸/۶۷	۵۰/۵۲^{abc}	۲۸/۶۶^{f}	۱۹/۸۰^{b}
تزریق P	۴۹/۲۵^{cd}	۲۰/۶۸^{c}	۱/۱۶^{b}	۳۹/۶۲^{c}	۳۲/۶۷^{cd}	۱۸/۰۰	۴۹/۱۸^{bcd}	۳۳/۰۰^{cde}	۲۳/۶۰^{ab}
تزریق VitD	۴۸/۲۱^{cd}	۲۰/۶۷^{c}	۱/۱۳^{b}	۴۲/۸۱^{bc}	۳۴/۶۶^{bc}	۱۸/۰۰	۴۴/۱۶^{d}	۳۴/۰۰^{c}	۲۸/۰۰^{ab}
تزریق CaP	۵۱/۱۹^{bc}	۲۳/۶۶^{ab}	۱/۵۰^{a}	۵۰/۷۶^{ab}	۳۵/۳۴^{ab}	۱۹/۳۳	۴۶/۶۲^{cd}	۳۵/۳۴^{bc}	۳۱/۰۰^{a}
تزریق Ca×VitD	۵۴/۸۴^{a}	۲۵/۳۳^{a}	۱/۵۷^{a}	۵۰/۶۲^{ab}	۳۲/۶۸^{cd}	۱۸/۰۰	۵۴/۲۱^{ab}	۴۲/۰۰^{a}	۳۱/۰۰^{a}
تزریق P×VitD	۴۸/۴۷^{cd}	۲۱/۰۰^{bc}	۱/۰۷^{b}	۴۴/۷۱^{abc}	۳۴/۶۵^{bc}	۱۹/۳۴	۴۹/۰۶^{bcd}	۳۳/۶۷^{cd}	۲۸/۰۰^{ab}
تزریق Ca×P×VitD	۵۳/۱۴^{ab}	۲۲/۳۳^{bc}	۱/۷۳^{b}	۵۲/۱۲^{a}	۳۷/۳۴^{a}	۲۱/۳۵	۵۴/۹۹^{a}	۳۸/۳۵^{ab}	۳۲/۳۴^{a}
خطای استاندارد میانگین‌ها	۰/۷۶۸	۰/۴۶۱	۰/۰۵۱	۱/۱۴۵	۰/۴۵۴	۰/۳۴۹	۰/۸۷۲	۰/۸۶۸	۱/۱۰۳
ارزش P	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۰	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۰۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۸۴۰	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۷	۰/۱۱۴۵

مقادیر تزریق‌ها شامل ۵۰ میکروگرم VitD، ۱۰ پی‌پی‌ام Ca، و ۵ پی‌پی‌ام P می‌باشد.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری ندارند (P<۰.۰۵).

٤- Bone Mineral Ash

٥- Bone Breaking Strength

بحث

نوع سوبسترا و جایگاه تزریق در داخل تخم‌مرغ، درصد جوجه‌درآوری و وزن بدن جوجه‌های تفریخ شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Salary و همکارن، ۲۰۱۴؛ Ghobadi and Hemati Matin, 2015). نتایج به دست آمده در آزمایش حاضر با آزمایش دیگر محققان هم‌خوانی دارد (Selim و همکاران، ۲۰۱۲). تزریق داخل تخم‌مرغی انفرادی یا ترکیبی از Ca، P و VitD (به جز Ca و VitD) درصد جوجه درآوری را افزایش داد. در آزمایشی مشابه، یک بار تزریق داخل تخم‌مرغی کمپلکس کلسیم- فسفر و ویتامین D (CaDPhos) وزن بدن جوجه‌های تفریخ شده را افزایش داد (Ghobadi and Hemati Matin, 2015).

به طور مشابه در دیگر آزمایش تزریق داخل تخم‌مرغ ۲۵-هیدروکسی D_3 جوجه درآوری را افزایش داد (Bello و همکاران، ۲۰۱۳) بدون آن که هیچ اثر مضری بر عملکرد کلی رشد داشته باشد (Bello و همکارن، ۲۰۱۴b). با این حال کاهشی در میزان جوجه‌درآوری با تزریق درون تخم‌مرغی منفرد Ca و VitD دیده شد. به طور کلی در آزمایشات انجام شده اشاره شده است که کاهش درصد جوجه‌درآوری می‌تواند به خاطر آشفتگی یونی محیط داخل تخم‌مرغ، کاهش شمار سلول‌های جنین زنده، کاهش توان آنتی‌میکروبی آلبومین و آلودگی‌های احتمالی حین تزریق باشد (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۱۲). با این همه، در مطالعه‌ی حاضر، تزریق Ca×VitD و Ca×P×VitD (در زمان تشکیل سیستم استخوانی روز اول انکوباسیون (Proszkowiec-Weglarz and Angel, 2013)) وزن بدن جوجه‌های تفریخ شده را افزایش داد.

فرض می‌شود که تزریق مواد مغذی می‌تواند از غشاء درونی عبور کند و به داخل جنین در حال توسعه وارد شود. این فرضیه بر اساس مشاهدات قبلی است که نشان دادند ذرات مختلف، زمانی که در آغاز انکوباسیون تزریق می‌شوند، پاسخ‌های ملکولی، رشد و نمو ماهیچه و استخوان را در انتهای دوره‌ی جنینی تحت تاثیر قرار می‌دهند (Zielinska و همکاران، ۲۰۱۱ و ۲۰۱۲؛ Grodzik و همکاران، ۲۰۱۳) بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، وزن بدن بالاتر به دست آمده در جوجه‌های تفریخ شده ممکن است به دلیل قابلیت دسترسی افزایش یافته و توسعه‌ی رشد و نمو ماهیچه‌ها و استخوان‌ها باشد. یافته‌هایی چنین توسط سایر محققان نیز تایید شده است (Sawosz و همکاران، ۲۰۱۲؛ Grodzik و همکاران، ۲۰۱۳).

بهبود معنی‌دار در میزان رشد جوجه‌های گوشتی، با بازتابی از تولید کلی گوشت و تغییرات کمتر در ساختار اسکلتی همراه بوده است (Bello و همکارن، ۲۰۱۴b). تراکم کمتر و تخلل بیشتر استخوان ممکن است نهایتا به افزایش شیوع مشکلاتی در پرندگان نظیر مشکلات اسکلتی و عدم رشد منتهی شود.

اگر چه کلسیم و فسفر، مواد معدنی اصلی تشکیل دهنده‌ی استخوان هستند، سایر عناصر نظیر مس و روی همچنین در ساختار استخوان یافت می‌شوند که نقش مهمی در تعیین درصد خاکستر استخوان دارد (Kim و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر این، حضور کافی ویتامین D برای فرآیند تشکیل استخوان ضروری است. آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در استخوان‌سازی و کلسیمی شدن استخوان دارد (Kim و همکاران، ۲۰۰۸).

همچنین مس، ماده‌ی معدنی ضروی در سنتز و ساختار کلاژن می‌باشد (Libby and Aikawa, 2002) که خاصیت ارتجاعی استخوان را نیز بهبود می‌دهد (Gralak و همکاران، ۲۰۰۴). به طورکلی، نتایج آزمایش حاضر نشان دادند که بین فعالیت آلکالین فسفاتاز پلاسمایی (که نشان‌دهنده‌ی افزایش متابولیسم فسفر است) و تجمع کلسیم، فسفر و مس در درشت‌نی ارتباط‌هایی وجود دارد.

به گونه‌ای که در آزمایش ملاحظه می‌شود، بالا بودن مقدار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز پلاسمایی هم‌راستا با مقادیر بالاتر کلسیم و مس استخوان درشت‌نی می‌باشد. با توجه به شکل‌گیری توسعه‌ی استخوان در اولین روز انکوباسیون (Hamburger and Hamilton, 1992)، این احتمال وجود دارد که تزریق داخل تخم‌مرغی انفرادی و یا مجموع Ca، P و ویتامین D در آغاز

انکوباسیون جذب مواد معدنی را تحریک/تسهیل کند که با افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز پلاسمایی هم‌راستا خواهد بود و به تشکیل استخوان جوجه‌های گوشتی کمک خواهد کرد (Pratt and Kaplan, 2000). در مطالعه‌ی مشابه، نشان داده شد که فعالیت آلکالین فسفاتاز با تزریق کمپلکس داخل تخم‌مرغی کلسیم، فسفر و ویتامین D (CaDPhos) افزایش می‌یابد (Ghobadi and Hemati Matin, 2015).

علاوه براین، تزریق داخل تخم‌مرغی VitD به غلظت‌های بالاتر کلسیم منتهی شده است که هم‌راستا با غلظت بالاتر کلسیم بوده است (Bello et al., 2013; Bello et al., 2014b). بهبود در استحکام درشت‌نی جوجه‌های گوشتی قرار گرفته در معرض تزریق داخل تخم‌مرغی Ca گزارش شده است (Ebrahimia و همکاران، ۲۰۱۵) که نتایج مطالعه‌ی حاضر با آن‌ها هم‌خوانی دارد. عدم تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های عملکردی بین تیمارها با یافته‌های تحقیقات قبلی هم‌خوانی دارد (Salary و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ghobadi and Hemati Matin, 2015). آن‌ها بیان کردند که درجه‌ی پاسخ به تزریق مواد مغذی در تخم‌مرغ مرغان مادر به ژنتیک، سن مرغ مادر، اندازه‌ی تخم‌مرغ و شرایط انکوباسیون بستگی دارد. رشد و نمو پرندگان تازه تفریخ شده به مقدار ماده‌ی مغذی باقی‌مانده در کیسه‌ی زرده بستگی دارد (Uni and Ferket, 2004). تصور بر این است که مواد مغذی زرده برای نگهداری پرنده تا زمان دسترسی به خوراک کافی است. با این همه، آغاز رشد ممکن است بیشتر به تغذیه‌ی بعد از تفریخ نسبت به مواد مغذی یافت شده در زرده بستگی داشته باشد (Nir and Levanon, 1993; Ghobadi and Hemati Matin, 2015). بنابراین، اگرچه با توجه به نقش کلسیم، فسفر و ویتامین D جوجه‌درآوری و تجمع مواد معدنی تغییر می‌کند، اما ارائه‌ی جیره‌های مشابه به همه‌ی گروه‌های آزمایشی به عملکرد تولیدی مشابه منتهی شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمایش حاضر نشان دادند که میزان تاثیر تزریق داخل تخم-مرغی منفرد و هم‌زمان مواد مغذی کلسیم و فسفر به همراه ویتامین D روی جوجه‌درآوری، تجمع مواد معدنی در استخوان به نقش تغذیه‌ای آن‌ها در توسعه‌ی جنین بستگی دارد. با این حال به نظر می‌رسد که تزریق داخل تخم‌مرغی کلسیم و فسفر به همراه ویتامین D به صورت جفتی و کمپلکس سه‌تایی سبب ایجاد تغییراتی در شرایط هموستازی جنین‌ها شده است که به موجب آن درصد جوجه‌درآوری در جوجه گوشتی افزایش یافته است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات قم به خاطر همکاری‌های لازم در اجرای تحقیق کمال تشکر را دارند.

منابع

Ayaşan, T. and Okan, F. (1999). Effects of dietary with different calcium and phosphorus on hatchability and various blood parameters in Japanese quails. Karadeniz Bölgesi Tarım Sempozyumu. 4-5 Ocak 1999. Bildiriler. Cilt 2. Sayfa: 717-726. O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Samsun,TURKEY.

Bello, A., Bricka, R.M., Gerard, P.D. and Peebles, E.D. (2014a). Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler bone development and mineralization on days 0 and 21 posthatch. *Poultry Science*. 93:1053-1058.

Bello, A., Hester, P.Y., Gerard, P.D., Zhai, W. and Peebles, E.D. (2013). Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on the hatchability and hatching chick quality of broilers. *Poultry Science*. 92:2551-2559.

Bello, A., Hester, P.Y., Gerard, P.D., Zhai, W. and Peebles, E.D. (2014b). Effects of commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on bone development and mineralization in male and female broilers. *Poultry Science*. 93: 2734-2739.

Bennett, M.B. (2008). Post-hatch growth and development of the pectoral and pelvic limbs in the black noddy, Anous minutes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular*. Integrative *Physiology*. 150:159-168.

Bhanja, S.K., Mandal, A.B. and Johari, E. (2004). Standardization of injection site, needle length, embryonic age and concentration of amino acids for in ovo injection in broiler breeder eggs. Indian. *Journal of Poultry Science*. 39: 105-111.

Blake, G.M. and Fogelman, I. (2002). Methods and clinical issues in bone densitometry and quantitative ultrasonometry. *Principles of Bone Biology*, 2: 1573-1585.

de Matos, R. (2008). Calcium metabolism in birds. Vet Clin North Am Exot Anim Pract., 11: 59-82.

Dziedzic-Gocławska, A. (1995). *Bone tissue* (in Polish). In: Histology. PZWL, 244-305.

Ebrahimi, M.R., Ahangari, Y.J., Zamiri, M.J., Akhlaghi, A. and Atashi, H. (2012). Does preincubational in ovo injection of buffers or antioxidants improve the quality and hatchability in long-term stored eggs?. *Poultry Science*. 91:2970-2976.

Ebrahimia, H., Shariatmadaria, F. and Karimi Torshizia M.A. (2015). Dietary supplementation and in ovo injection of 1α-OHD3 in a low-calcium and low-phosphorous diets for broilers. *Journal of Applied Animal Research*. DOI:10.1080/09712119.2015.1021803.

Ghobadi, N. and Hemati Matin H.R. (2015). Response of broiler chicks to in ovo injection of calcium, phosphorus, and vitamin D complex. *Global Journal of Animal Scientific Research*. 3:544-549.

Gralak, M.A., Piastowska, A.W., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Antczak, A. and Kulasek, G et al (2004). Effect of dietary protein level and sources on bone mineralization and structure in rats. *Biofactors*. 22:25-28.

Grodzik, M., Sawosz, F., Sawosz, E., Hotowy, A., Wierzbicki, M. and Kutwin, M. (2013). Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of in ovo administration of diamond nanoparticles and L-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles. *International Journal of Molecule Science*. 14: 23033-23044.

Hamburger, V. (1992). The stage series of the chick embryo. Developmental Dynamics, 195: 273-275.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). Series of normal stage in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 88: 49-92.

Kim, W.K., Bloomfield, S.A., Sugiyama, T. and Ricke, S.C. (2012). Concepts and methods for understanding bone metabolism in laying hens. *World's Poultry Science Journal*. 68:71-82.

Kim, Y.S., Kim, J.S., Cho, H.S., Rha, D.S., Kim, J.M. and Park, J.D. et al (2008). Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity,and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*. 20:575-583.

Libby, P. and Aikawa, M. (2002). Vitamin C, collagen, and cracks in the plaque. *Circulation*. 105: 1396-1398.

McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. and Morgan, C.A. (1995). Minerals. In: *Animal Nutrition*, 5th Edition. Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd. Singapore. 101-105.

National Research Council. (1994). *Nutrient Requirements for Poultry*, 9th rev, ed. National Academy Press, Washington, DC.

Nir, I. and Levanon, M. (1993). Research note: effect of posthatch holding time on performance and on residual yolk and liver composition. *Poultry Science*. 72:1994-1997.

Nordin, B.E.C., Gurr, M.I., McIntosh, G.H., Schaafsma, G., Miller, G.D. and Groziak, S.M. et al (1997). Dietary calcium in health. *Bulletin International Dairy Federation*. 322: 36-40.

Nouri Sanami, M., Ghaedi, B., Salary, J. and Hemati Matin, H.R. (2014). *In ovo* injection of L-arginine on performance and bone mineralization in broiler chicken. *Research Opinion in Animal Veterinary and Science*. 4:394-397.

Petracci, M. and Cavani, C. (2012). Muscle growth and poultry meat quality issues. *Nutrients*. 4:1-12.

Pratt, D.S. and Kaplan, M.M. (2000). Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. The *New England Journal of Medicine*. 4: 1266-1271.

Proszkowiec-Weglarz, M. and Angel, R. (2013). Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *Journal of Applied Poultry Research*. 22: 609-627.

Salary, J., Sahebi-Ala, F., Kalantar, M. and Hemati Matin, H.R. (2014). *In ovo* injection of vitamin E on post-hatch immunological parameters and broiler chicken performance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4:733-736.

SAS Institute. (2008) *SAS users Guide*. Statistic. Cray, NC. SAS Institute INC.

Sawosz, F., Pineda, L., Hotowy, A., Hyttel, P., Sawosz, E. and Szmidt, M. et al (2012). Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of silver nanoparticles and glutamine on molecular responses, and the morphology of pectoral muscle. *Baltic Journal of Comparative & Clinical Systems Biology*. 2:29-45.

Scott, M.L., Nesheim, M.C. and Young, R.J. (1982). Essential inorganic nutrients. In: *Nutrition of the chicken*. (Ed. 3). M. L. Scott and Associates, Ithaca, New York., 288-304.

Selim, S.A., Gaafar, K.M. and El-Ballal, S.S. (2012). Influence of *in-ovo* administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 24: 264-271

Shim, M.Y., Pesti, G.M., Bakalli, R.I. and Edwards Jr, H.M. (2008). The effect of breeder age and egg storage time on phosphorus utilization by broiler progeny fed a phosphorus deficiency diet with 1α-oh vitamin D3. *Poultry Science*. 87:1138-1145.

Uni, Z. and Ferket, P.R. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *World's Poultry Science Journal*. 60:101-111.

Uni, Z., Ferket, P.R., Tako, E. and Kedar, O. (2005). *In ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*. 8:764-770.

Zielinska, M., Sawosz, E., Grodzik, M., Balcerak, M., Wierzbicki, M. and Skomial, J. et al (2012). Effect of taurine and gold nanoparticles on the morphological and molecular characteristics of muscle development during chicken embryogenesis. *Archive Animal Nutrition*. 66:1-13.

Zielinska, M., Sawosz, E., Grodzik, M., Wierzbicki, M., Gromadka, M. and Hotowy, A. et al (2011). Effect of heparan sulfate and gold nanoparticles on muscle development during embryogenesis. *International Journal of Nanomedicine*. 6:3163-3172.