



## تاثیر تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج بر رشد و تمایز جنسیتی جوجه های گوشتی

افسانه سربزی فرح آباد<sup>۱</sup>، زربخت انصاری پیرسرائی<sup>۲</sup>، پوریا بی پروا<sup>۳</sup> و عیسی دیرنده<sup>۴</sup>

<sup>۱، ۳ و ۴</sup> - دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، استادیار گروه علوم پایه و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۲</sup> - دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (نویسنده مسئول: zarbakht\_ansari@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۰

### چکیده

یکی از مشکلات صنعت طیور یک دست نبودن گله در مزرعه گوشتی است هر چند که در کارخانه های جوجه کشی جوجه گوشتی و بوقلمون، اغلب جوجه های تعیین جنسیت شده را به تولید کنندگان تجاری می فروشند، زیرا تفاوت های جنسی در مقدار رشد و بازدهی مصرف خوراک، جداسازی نرها و ماده ها را برای تامین نیازهای بازار از نظر تولید لاشه های یک دست و مشخص ضروری می سازد. پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج بر رشد و جنسیت جوجه های گوشتی انجام شد. این پژوهش با ۵۰۰ عدد تخم مرغ سویه راس ۳۰۸ به صورت طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار چهار تکرار و ۲۵ عدد تخم مرغ در هر تکرار به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- شاهد بدون تزریق ۲- شاهد با تزریق (توزریق حلال ها) ۳- تزریق ۵۰ mg/L عصاره گرده کاج ۴- تزریق ۱۰۰ mg/L عصاره گرده کاج ۵- تزریق ۱۵۰ mg/L عصاره گرده کاج بود. صفات اقتصادی، درصد جوجه درآوری، تمایز جنسیتی و بیان نسبی ژن IGF-I و IGF-II مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد استفاده از تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج تاثیر معنی داری بر درصد جوجه درآوری، صفات اقتصادی و تمایز جنسیت جوجه های گوشتی نداشت، اما تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج سبب کاهش بیان نسبی ژن IGF-I و IGF-II شد و در تیمارهای عصاره گرده کاج پاسخ به دوز در بیان نسبی ژن IGF-I در بافت سینه و IGF-II در بافت ران مشاهده شد به طوری که در تزریق ۱۵۰ mg/L عصاره گرده کاج سبب افزایش معنی داری در بیان نسبی ژن IGF-I در بافت سینه شد.

واژه های کلیدی: تزریق درون تخم مرغی، تمایز جنسیتی، رشد، عصاره گرده کاج

### مقدمه

تاریخچه تمایز جنسیت مربوط به قرن نوزدهم است که زیست شناسان، امکان تخم گذاری خروس را مورد بحث قرار دادند، به گونه ای که در منابع علمی قرن بیستم، به بررسی های موردی درباره فنوتیپ های هرمافرودیت و تغییرات آنی جنسیت پرداخته شد. یکی از موضوع های جذاب بحث تمایز جنسیت در چشم انداز تجاری سازی و کاربرد آن در صنعت طیور است (۵۵). زیرا یکی از مشکلات صنعت طیور در مزرعه مرغ مادر تخم گذار تولید جوجه های نر است، زیرا این جوجه ها از لحاظ تولید گوشت و تخم مرغ قابل بهره برداری نیست (۴۹)، همچنین از مشکلات دیگر صنعت طیور یک دست نبودن گله در مزرعه گوشتی است، هر چند که در کارخانه های جوجه کشی جوجه گوشتی و بوقلمون، اغلب جوجه های تعیین جنسیت شده را به تولید کنندگان تجاری می فروشند، زیرا تفاوت های جنسی در مقدار رشد و بازدهی مصرف خوراک، جداسازی نرها و ماده ها را برای تامین نیازهای بازار از نظر تولید لاشه های یک دست و مشخص ضروری می سازد (۵۵) از سوی دیگر پرورش دهندگان طیور به دلیل ضریب تبدیل بهتر و نرخ رشد بیشتر (۳۰۸) و دفع ازت کمتر در جنس نر نسبت به ماده (۱۹) تمایل بیشتری به خریداری جنس نر دارند. درجنین نر پرندگان به دلیل دارا بودن تستوسترون بخش مدولا هردو گناد رشد کرده و تبدیل به بیضه می شود از سوی دیگر در جنین ماده پرندگان به دلیل دارا بودن استروژن فراوان و تستوسترون کم بخش کورتکس گناد چپ رشد کرده و تبدیل به تخمدان می شود (۴۱). تغییر نسبت تستوسترون و استروژن سبب تمایز جنسیت می شود از آنجایی که این نسبت از طریق مهار آنزیم آروماتاز تغییر می یابد، بنابراین

بازدارنده آروماتاز در مرحله ای که گناد جوجه نامتمایز است، ماده ژنتیکی را وادار به تکامل فنوتیپ غالب نر می نماید (۱۱۳). بیان شده است که تزریق مهار کننده آروماتاز در تخم مرغ سبب تمایز جنسیت نر شد؛ همچنین در ماده های تمایز یافته غلظت تستوسترون پلاسما افزایش و بیان ژن P450 و غلظت استرادیول پلاسما کاهش یافت (۴۰،۳۹). برخی از گیاهان دارای ترکیبات غیراسترویدی هستند که فعالیت استروژنیک دارند این ترکیبات به نام فیتواستروژن است (۳۳) فیتواستروژن ها در بعضی از موارد به عنوان آنتاگونیست و در بعضی از موارد به عنوان آگونیست عمل می کند (۳۲). گیاه سیر دارای فیتواستروژن است تزریق عصاره سیر به مقدار ۱ میلی گرم در هر تخم مرغ سبب تمایز جنسیت نر شده بدون آن که در جوجه درآوری تاثیر بگذارد (۴۸). بعضی از گیاهان دارای آندروژن گیاهی هستند که مصرف آن ها سبب افزایش تستوسترون جانوری می شود. گزارش شده تزریق عصاره گرده خرما به موش به مقدار ۱۴۰ میلی گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن سبب افزایش تستوسترون شد (۱). استفاده از گرده گل گونه ارکید و گرده جمع آوری شده از پاهای زنبور عسل باعث افزایش معنی دار تستوسترون در موش های نر (۲۴ گرمی) شد (۱۷). ترکیبات شیمیایی مخروط نر کاج شامل پروتین خام (۱۲/۷ درصد)، چربی خام (۱/۵ درصد)، فیبر خام (۳۵/۶ درصد)، مواد معدنی (۳/۱ درصد)، انرژی خالص (۲۱ درصد) و انرژی متابولیسمی (۵/۷ کیلوژول بر گرم) است و همچنین این ماده دارای خواص آنتی بیوتیکی نیز است (۵۶). گرده کاج دارای تستوسترون و آندروژن (۳۵) و همچنین ویتامین D است (۳۷). استفاده از گرده کاج در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم به صورت خوراکی در موش،

عصاره یک میلی لیتر DMSO به منظور حل شدن عصاره اضافه شد (۵۲). تبدیل واحد عصاره به mg/L انجام شد و سپس براساس فرمول  $M_1V_1=M_2V_2$  میزان دوز مورد نظر با بالون ژوژه به حجم رسانده شد.

#### تعیین دوز تیمارها

این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه سطح عصاره گرده کاج (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/L) و پنج تیمار و ۱۰۰ عدد تخم مرغ در هر تیمار، چهار تکرار و ۲۵ تخم مرغ در هر تکرار که به صورت تصادفی در دستگاه جوجه کشی پخش شد. تیمار آزمایشی شامل:

تیمار یک: کنترل منفی (بدون تزریق)

تیمار دو: کنترل مثبت (با تزریق حلال دای متیل سولفوکساید و آب)

تیمار سه: تزریق عصاره گرده کاج ۵۰ mg/L

تیمار چهار: تزریق عصاره گرده کاج ۱۰۰ mg/L

تیمار پنج: تزریق عصاره گرده کاج ۱۵۰ mg/L

برای تعیین این دوزها دو پیش آزمایش انجام شد.

#### تزریق داخل تخم مرغ

در روز صفر جنینی در دامنه دمایی ۱۸-۲۰ درجه سانتی گراد، ابتدا زیر کیسه هوایی (قسمت مورد نظر برای تزریق) با الکل ضد عفونی شد سپس قسمت مورد نظر با نیدل گیج ۲۱ سوراخ و از هر دوز به مقدار ۳۰ میکرو لیتر در زیر کیسه هوایی با نیدل گیج ۲۲ تزریق شد سپس محل تزریق را با چسب پارافین پوشانده و در دستگاه جوجه کشی با دمای ۳۷/۴ درجه و رطوبت ۵۲ درصد ستر گذاشته شد.

#### جیره آزمایشی

جیره آزمایشی (تا هفت روزگی) بر پایه ذرت و سویا و براساس احتیاجات ذکر شده در راهنما پرورش جوجه گوشتی راس (۳۰۸) با استفاده از نرم افزار UFFDA تنظیم شد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

سبب بهبود آرتریت و کاهش التهاب شده و همچنین سطح سرمی لیپوپروتئین با دانسیته کم (LDL) را کاهش و لیپوپروتئین با دانسیته زیاد (HDL) را افزایش داد (۲۲). تزریق گرده کاج همراه با دی گالاتوز به موش (۱ و ۲ میلی گرم) باعث تاخیر در پیری سلول های فیبروبلاست و تکثیر این سلول شده و همچنین فاکتور نکروزه کننده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین-۶ (IL-6) را کاهش داد (۲۶). استفاده از پلی ساکارید سولفات گرده کاج باعث توقف چرخه میتوزی سلول های سرطانی جگر شد (۱۱)؛ همچنین استفاده عصاره گرده کاج باعث مهار رادیکال های آزاد و مهار رشد سلول های سرطانی شد (۲۲).

گرده کاج با دارا بودن هورمون های فیتواستروژن و فیتوآندروژن (۳۶) ممکن است با کاهش اثرات استروژنی سبب تغییر تمایز جنسیت به سمت نرزاری شود از سوی دیگر ممکن است گرده کاج با دارا بودن مواد مغذی سبب افزایش رشد جوجه های گوشتی شود. بنابراین هدف از این تحقیق تاثیر تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج بر رشد و جنسیت جوجه های گوشتی بود.

#### مواد و روش ها

##### جمع آوری مخروط کاج

مخروط نر درخت کاج الدار (۲۰) از منطقه تربت جام در عرض جغرافیا ۳۵/۱۷ N و ۶۰/۳۵ E در ارتفاع ۹۵۰/۴ M از درختان این شهرستان جمع آوری شد.

##### عصاره گیری گرده کاج

یک گرم از گرده کاج را داخل ۲۰ میلی لیتر متانول ریخته و در حمام التراسونیک در دمای ۲۴-۳۰ سانتی گراد به مدت ۱/۵ ساعت اولتراسونیک شد و سپس عصاره گرده کاج از کاغذ صافی عبور داده شد. آنگاه با روش رفلکس تحت گاز، حلال زادی (متانول) انجام شد و پس از خشک شدن کامل

جدول ۱- ترکیب جیره آزمایشی

Table 1. Composition of experimental diet	
اجزای خوراک (درصد)	مواد خوراکی
۵۰/۹۳	ذرت
۴۰/۵۷	کنجاله سویا
۳/۶۱	روغن
۱/۷۵	دی کلسیم
۱/۲	سنگ آهک
۰/۳۹	نمک
۰/۲۵	مکمل معدنی
۰/۲۵	مکمل ویتامینی
۰/۴۸	دی-آل-متیونین
۰/۴۲	لیزین
۰/۲۲	ترئونین
	ادامه جدول..
	ترکیب مواد مغذی برحسب درصد
	انرژی (کیلو کالری/کیلو گرم)
۲۹۱۰	پروتئین
۲۲/۳۱	لیزین
۱/۴۴	متیونین
۰/۵۹	متیونین + سیستئین
۱/۰۸	ترئونین
۰/۹۷	کلسیم
۰/۹۵	فسفر
۰/۴۷۵	سدیم
۰/۱۸	

**صفات مورد بررسی در آزمایش**

گامه پایانی). ویژگی این گامه‌ها در جدول بیان شده است (۱۸،۱۲).

برای تعیین کیفیت جوجه‌های هچ شده شاخص‌هایی مانند فعالیت جوجه، وضعیت پوشش بدنی، ورم شکمی، وضعیت ناف، چشم و پا به طور چشمی ارزیابی انجام گرفت و براساس پژوهش تونا و همکاران (۴۴) رتبه‌بندی شد و آنالیز آماری به روش ویلمسن و همکاران (۵۰) انجام شد.

بعد از هچ جوجه‌ها، تخم‌مرغ‌های هچ نشده را باز کرده و علت مرگ و میر یادداشت شد و سپس با استفاده از رابطه زیر (۵۱) درصد جوجه درآوری محاسبه شد. گامه‌های مرگ و میر جنینی به سه بخش کلی تقسیم شد که عبارت بودند از: روز یک تا هفت جنینی (گامه نخست)، روز هشت تا ۱۴ جنینی (گامه میانی)، روز ۱۵ تا ۲۱ جنینی

$$\text{درصد هچ جوجه} = \frac{\text{تعداد جوجه هچ شده}}{\text{تعداد تخم مرغ باور}} \times 100$$

$$\text{مرگ و میر} = \frac{\text{تعداد جنین مرده}}{\text{تعداد تخم مرغ باور}} \times 100$$

$$\text{درصد مرگ و میر جنینی} = \frac{\text{جنین یا جوجه تلف شده در هر گامه}}{\text{تعداد تخم مرغ‌های باور}} \times 100$$

وزن کشی شدند. ضریب تبدیل غذایی در دوره‌های پژوهش از تقسیم خوارک مصرفی دوره بر افزایش وزن دوره محاسبه شد. وزن هر واحد در محاسبه ضریب تبدیل غذایی در نظر گرفته شد:

برای محاسبه تمایز جنسیت، جوجه‌های هچ شده را با روش Feather Sexing مورد تعیین جنسیت قرار گرفتند و در روز هفت پرورش، جوجه‌ها را کشتار و اندام تناسلی آنها مورد ارزیابی چشمی قرار گرفت. از ابتدای دوره پرورش جوجه‌ها از سن ۱ تا ۷ روزگی با استفاده از ترازو دیجیتال با دقت  $\pm 5$  گرم

$$\text{میانگین خوراک مصرف روزانه هر جوجه طی ۷ روز} = \frac{\text{وزن جوجه‌های زنده در ابتدای هفته} - \text{وزن جوجه‌های زنده در پایان هفته}}{\text{تعداد جوجه‌های زنده در ابتدای هفته} - \text{تعداد جوجه‌های زنده در پایان هفته}} \times 7$$

$$\text{افزایش وزن روزانه هر جوجه} = \text{میانگین افزایش وزن هفتگی هر جوجه} \times 7$$

$$\text{ضریب تبدیل} = \frac{\text{خوراک مصرفی (گرم)}}{\text{افزایش وزن (گرم)}} \times 100$$

**انجام Real-Time PCR**

Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X (کاتالوگ نامبر YT2551) خریدار شده از شرکت یکتا تجهیز انجام شد. پس از تایید توالی و صحت طول قطعه توالی، با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI آغازگر مورد نظر ساخته شد (۲۳،۲۴). همچنین سطوح ژن‌ها IGF-I و IGFII با روش لیواک (۳۸) محاسبه شد.

**اندازه‌گیری بیان ژن IGF-I و IGF-II**

جوجه‌ها در هفت روزگی با جابه‌جایی مهره گردنی کشتار و نمونه ران و سینه به یخچال  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

روش استخراج RNA با کیت شرکت RNX-PLU (کاتالوگ نامبر RN7713C) و برای ساخت cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit شرکت یکتا تجهیز (کاتالوگ نامبر YT4500) استفاده شد.

جدول ۲- ویژگی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 2. Characteristics of the primers used in this research				
اندازه باند (bp)	جهت	توالی آغازگر (۵' - 3')	شماره ثبت در بانک ژن	ژن
۱۳۴	رفت برگشت	GAGACAGAGGCTTCTACTTCA TGGCTTTATTGGAGCACAG	NM_001004384.2	IGF-I
۹۸	رفت برگشت	TGTGGAGGAGTGCTGCTTTC GGGAGGTGGCGGAGAGGTCA	NM_001030342.1	IGF-II
۳۰۰	رفت برگشت	TGCGTGACATCAAGGAGAAG TGCCAGGTACATTGTGGTA	NM_205518	$\beta$ -Actin

Insulin-Like Growth factor-1: IGF-I Insulin-Like Growth factor-2: IGF-II, Beta-actin:  $\beta$ Actin

## مدل آماری

داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۴۳) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی داری ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

$Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ijk}$   
در این فرمول  $Y_{ijk}$  مقدار مشاهده،  $\mu$  میانگین جامعه،  $T_i$  اثر عصاره گرده کاج،  $e_{ijk}$  اثر عوامل باقیمانده می باشد.

## نتایج و بحث

### درصد جوجه درآوری

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر درصد جوجه درآوری در جدول ۳ آمده است. بین تیمارهای تزریق شده و تیمار تزریق نشده برای درصد جوجه درآوری از لحاظ آماری تفاوت معنی دار وجود داشت ( $P < 0/05$ )، ولی تفاوت معنی داری در تیمارهای تزریق عصاره گرده کاج در مقایسه با تیمار شاهد کنترل مثبت وجود نداشت که احتمال دارد به دلیل اثر تزریق و اثر حلال استفاده شده در عصاره باشد.

نتایج مربوط به تاثیر تزریق گرده کاج بر گامه های جنینی در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان می دهد بین تیمارهای تزریق شده و تیمار تزریق نشده در گامه جنینی نخست تفاوت معنی داری وجود داشت ( $P < 0/05$ )؛ ولی در گامه های جنینی دیگر هیچ تفاوت معنی دار مشاهده نشد.

کاسکن و همکاران (۱۱) گزارش کردند که تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده گل در روز ۱۶ جنینی تاثیر معنی داری بر درصد جوجه درآوری نداشت. برک و هنری (۹) بیان کردند تزریق درون تخم مرغی فدرازول در سفیده در روز قبل از جوجه کشی تاثیر معنی داری روی این صفت نداشت. همچنین سایر پژوهش ها نشان دادند که تزریق عصاره گیاهی در روز پنجم جنینی در سفیده تخم مرغ تاثیر معنی داری بر درصد جوجه درآوری نداشت (۲۵، ۱۵، ۵). وایات و هووارث (۵۲) گزارش کردند تزریق دو میلی گرم DMSO

(Dimethyl sulfoxide) در زرده تخم مرغ در روز قبل از جوجه کشی سبب مرگ و میر صد در صد در گامه نخست جنینی شد، ولی تزریق ۰/۰۵ و ۰/۲۵ میلی لیتر به ازای هر تخم تاثیر معنی داری بر درصد جوجه درآوری نداشت. همان طور که در جدول ۴ مشاهده می شود بیشترین مرگ و میر در گامه نخست جنینی بود. در این پژوهش مقدار استفاده شده از DMSO، ۰/۰۳۵ میلی لیتر به ازای هر تخم مرغ بود. ولی احتمال می رود که با تغییر محل تزریق اثر DMSO تغییر کرده است زیرا نحوه انتشار DMSO زمانی که در زرده تخم مرغ تزریق شود با رشد جنین، سبب تغییر نفوذ پذیری غشا زرده شده و مقدار آزاد شدن DMSO از زرده به سمت جنین آهسته تر می شود و براساس غلظت دوز تغییر می کند ولی زمانی که در روز صفر جنینی در سفیده تزریق شود به دلیل چند فاز بودن تخم مرغ از طریق انتشار به رویان منتقل می شود.

### کیفیت جوجه

نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر کیفیت جوجه نشان دادند که هیچ کدام از تیمارها تاثیر معنی داری بر کیفیت جوجه نداشت ( $P > 0/05$ ). کیفیت جوجه یکی از پارامترهای موثر در رشد و مقاومت جوجه به شرایط محیطی است (۵۰) به طوری که کیفیت بهتر جوجه، نشان دهنده جوجه سالم تر و مقاوم تر به بیماری ها و شرایط تنش زا محیط است و همچنین بعد از هج قابلیت زنده ماندن بیشتری دارد.

تلفات جوجه های گوشتی در سطح تجاری حدود ۳-۴ است، ولی هنری و برک (۹) بیان کردند تزریق فدرازول به تخم مرغ سبب افزایش ۸ درصدی تلفات جوجه های گوشتی شد. همچنین تزریق عصاره چای سیاه تاثیر معنی داری بر تلفات جوجه های گوشتی نداشت (۲۵).

در شرایط پژوهش انجام گرفته هیچ تاثیری بر کیفیت دیده نشد، ولی احتمال دارد با تغییر تیمار و شرایط پژوهش نتایج دیگری به دست آید.

جدول ۳- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر درصد جوجه درآوری و مرگ میر

Table 3. Effect of experimental treatments on hatchability and mortality percent

تیمار	درصد جوجه درآوری	درصد مرگ و میر
شاهد بدون تزریق	۹۲/۰۰ <sup>a</sup>	۸ <sup>b</sup>
شاهد با تزریق (DMSO)	۴۵/۹۹ <sup>d</sup>	۵۱/۶۲ <sup>a</sup>
عصاره گرده کاج ۵۰ (mg/L)	۳۷/۵۴ <sup>d</sup>	۵۹/۱۰ <sup>a</sup>
عصاره گرده کاج ۱۰۰ (mg/L)	۴۲/۹۶ <sup>d</sup>	۵۱/۴۰ <sup>a</sup>
عصاره گرده کاج ۱۵۰ (mg/L)	۴۵/۳۷ <sup>d</sup>	۵۲/۴۷ <sup>a</sup>
P-value	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳
SEM	۶/۰۲	۵/۸۳

میانگین های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی داری می باشند ( $P \leq 0/05$ )

جدول ۴- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر درصد گامه جنینی

Table 4. Effect of experimental treatments on embryonic stage percentage			
تیمار	گامه نخست (روز ۷-۱ جنینی)	گامه میانی (روز ۸-۱۴ جنینی)	گامه پایانی (روز ۱۵-۲۱ جنینی)
شاهد بدون تزریق	۰/۰	۰/۰	۴/۰۰
شاهد با تزریق (DMSO)	۴۲/۹۱ <sup>d</sup>	۶/۱۵	۱/۳۱
عصاره گرده کاج ۵۰ (mg/L)	۴۱/۶۷ <sup>d</sup>	۲/۳۳	۳/۲۶
عصاره گرده کاج ۱۰۰ (mg/L)	۴۳/۳۷ <sup>d</sup>	۱/۰۸	۶/۹۳
عصاره گرده کاج ۱۵۰ (mg/L)	۳۵/۷۱ <sup>d</sup>	۲/۴۴	۴/۵۴
P-value	۰/۰۰۰۷	۰/۲۳	۰/۳۷
SEM	۰/۶۳	۰/۲۷	۰/۳۳

میانگین های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی داری می باشند ( $P \leq 0.05$ )

## تمایز جنسیت

نتایج مربوط به تیمارهای آزمایشی و اثر آن بر تمایز جنسیت در جدول ۵ آمده است. هیچ کدام از تیمارهای آزمایشی تاثیر معنی داری بر تمایز جنسیت نداشت ( $P > 0.05$ ). در این راستا متقی طلب و جمشاسب (۲۷) گزارش کرد تزریق عصاره آبی و الکلی گوجه فرنگی به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۳ میکرو لیتر و تزریق عصاره سیر تا ۸۶ درصد سبب نر زایی شد. ولی زاده و صراط نوری (۴۸) بیان کردند تزریق عصاره سیر به مقدار یک میلی گرم به ازای هر تخم مرغ سبب تمایز جنسیت به سمت نر شد بدون آن که در جوجه دراوری تاثیر بگذارد. فاضلی و همکاران (۱۵) گزارش کردند که تزریق

عصاره سیر و گوجه فرنگی به مقدار ۰/۱ میلی لیتر در هر تخم مرغ سبب افزایش درصد جوجه نر شد. ادنگیا و همکاران (۳) گزارش کردند استفاده گرده کاج در خوراک گربه ماهی از زمان لاروی تا بچه ماهی (هنوز تمایز جنسیت شروع نشده است) به طور معنی داری سبب تمایز جنسیت تا ۹۰-۸۰ شده است. مورتسن و آریکور (۲۸) بیان کردند زمانی که سلول کبد ماهی سالمونلا ۷۲ ساعت در معرض DMSO با دوز ۰/۱ میلی گرم قرار گیرند سبب افزایش بیان نسبی گیرنده استروژنی ER- و ER- می شود. احتمال دارد DMSO با افزایش گیرنده استروژنی ER- و ER- سبب بی اثر کردن عصاره گرده کاج شود.

جدول ۵- تاثیر تیمارهای آزمایشی بر درصد تمایز جنسیت

Table 5. Effect of experimental treatments on sex differentiation percentage		
تیمار	نر	ماده
شاهد بدون تزریق	۵۸/۳	۴۱/۶۷
شاهد با تزریق (DMSO)	۴۵/۰۵	۵۴/۹۴
عصاره گرده کاج ۵۰ (mg/L)	۵۳/۵۷	۴۶/۴۳
عصاره گرده کاج ۱۰۰ (mg/L)	۵۵/۸۸	۴۴/۱۲
عصاره گرده کاج ۱۵۰ (mg/L)	۴۵/۷۱	۵۴/۲۹
P-value	۰/۵۹	۰/۱۱
SEM	۰/۱۱	۰/۱۱

میانگین های با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی داری می باشند ( $P \leq 0.05$ )

## صفات اقتصادی

هیچ کدام از تیمار آزمایشی تاثیر معنی داری بر صفات اقتصادی مانند وزن اولیه، وزن هفت روزگی، نرخ رشد، ضریب تبدیل و ویژگی لاشه نداشت ( $P > 0.05$ ). فاضلی و همکاران (۱۵) گزارش کردند که تزریق درون تخم مرغی عصاره سیر و گوجه فرنگی تاثیر معنی داری بر ضریب تبدیل و افزایش وزن داشت. ادنگیا و همکاران (۳) گزارش کردند مکمل گرده کاج در غذای تجاری گربه ماهی در مراحل لاروی تا بچه ماهی تاثیر معنی داری بر ضریب تبدیل و میانگین وزن نداشت ولی از مرحله بچه ماهی تا بند انگشتی سبب افزایش میانگین وزن و بهبود ضریب تبدیل شد. در پژوهش که روی گرده کاج انجام شد افزودن گرده کاج در خوراک خوک باعث افزایش معنی دار دفع کلسترول و کاهش قابلیت هضم شد (۵۶). در طیور جنس نر نسبت به ماده ضریب تبدیل بهتر، نرخ رشد بیشتر (۸،۳۰) و دفع ازت کمتری دارد (۱۹). تمایز جنسیت به سمت جنس نر به معنی افزایش تعداد نرهای

دارای ژنتیک ماده و فنوتیپ نر است. وایلانت و همکاران (۴۷)، تمایز جنسی را به پنج دسته تقسیم کردند: ماده عادی: تخمدان چپ طبیعی و دارای اویداکت. ماده با فنوتیپ نر: تخمدان چپ طبیعی و دارای بیضه کوچک در سمت راست و دارای اویداکت. ماده با فنوتیپ نر: بیضه توسعه نیافته در سمت راست و Ovotestis (گنادی دارای ویژگی های بیضه و تخمدان) در چپ و دارای اویداکت. ماده با فنوتیپ نر: دارای دو بیضه توسعه نیافته، لوله دفرانت نازک و اویداکت. ماده با فنوتیپ نر: دارای دو بیضه توسعه یافته و لوله دفرانت نازک پر از اسپرم و اویداکت. یانگ و همکاران (۵۴) گزارش کردند تزریق دوزهای ۰/۳ و ۰/۱ میلی گرم فدرازول در تخم مرغ نطفه دار، باعث افزایش تستوسترون در جنس ماده شد، ولی غلظت این هورمون در جنس ماده به طور معنی داری از جنس نر کمتر بود.

به طور معنی‌دار کاهش یافت (۷)؛ همچنین گزارش شده است که تزریق موضعی IGF-I در موش با هدف افزایش بیان ژن IGF-I در بافت ماهیچه‌ای در بعد از تولد منجر به هایپرتروفی فیبرها شد (۲) و بیان شده است که رشد ماهیچه سینه در طی نمو جنینی آهسته بود و در اوایل تولد بیان نسبی IGF-I و IGF-II به بیشترین مقدار رسید (۴).

جوجه‌های گوشتی که نرخ رشد سریع دارند غلظت پلاسمایی IGF-I در آنها بیشتر است (۶). اختلال کامل در ژن IGF-I کبد موش پس از دوره زایمان، باعث شد غلظت پلازما IGF-I به مقدار ۷۵ درصد کاهش یابد در حالی که نرخ رشد نرمال بود (۵۳).

رایس و همکاران (۳۴) بیان کردند جنین‌هایی که در رشد تاخیر داشتند در میانه جوجه‌کشی سرژ IGF-I نشان نمی‌دهند این به دلیل تاثیر IGF-I در کنترل طبیعی و نمو جنینی است IGF-I تکثیر را از راه افزایش تعداد سلول و سطوح پروتین و ساخت DNA و جذب آمینواسید و گلوکز و جلوگیری از تجزیه پروتین تحریک می‌کند. از سوی دیگر افزایش بیان ژن فاکتور تنظیمی ماهیچه را تحریک می‌کند (۲۱).

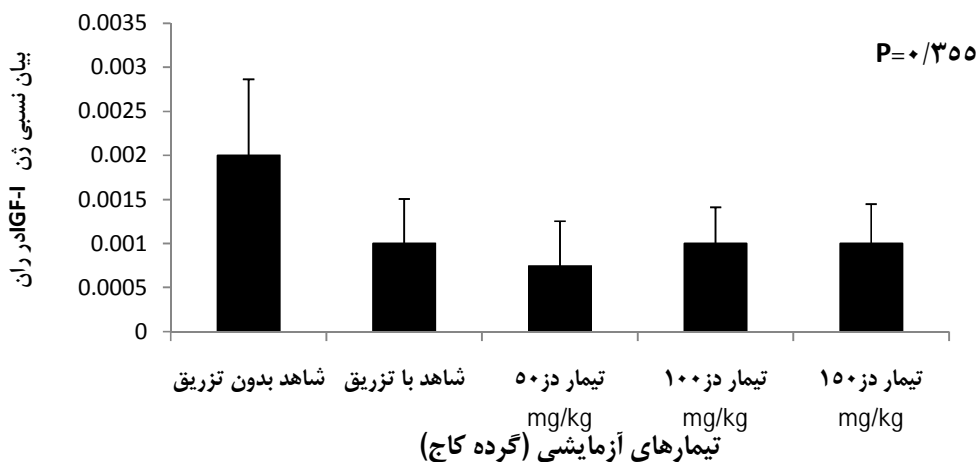
همچنین گزارش شده است IGF-I تکثیر در انواع سلول‌ها از جمله مایوبلاست‌ها (سلول بنیادی ماهیچه) را تحریک می‌کند (۳۱)، تزریق گرده کاج همراه با دی‌گالاکتوز به موش (۱ و ۲ میلی گرم) باعث تاخیر در پیری سلول‌های فیبروبلاست و تکثیر این سلول شد (۲۶).

با توجه به نگاره ۱ و ۲ میزان بیان نسبی ژن IGF-I در سینه بیشتر از ران بود، احتمال دارد که گرده کاج با دارا بودن مواد مغذی و تستوسترون سبب تحریک IGF-I و افزایش تعداد سلول‌های مایوبلاست شده است و به این دلیل در بافت سینه دارای ماهیچه بیشتر نسبت به ران است.

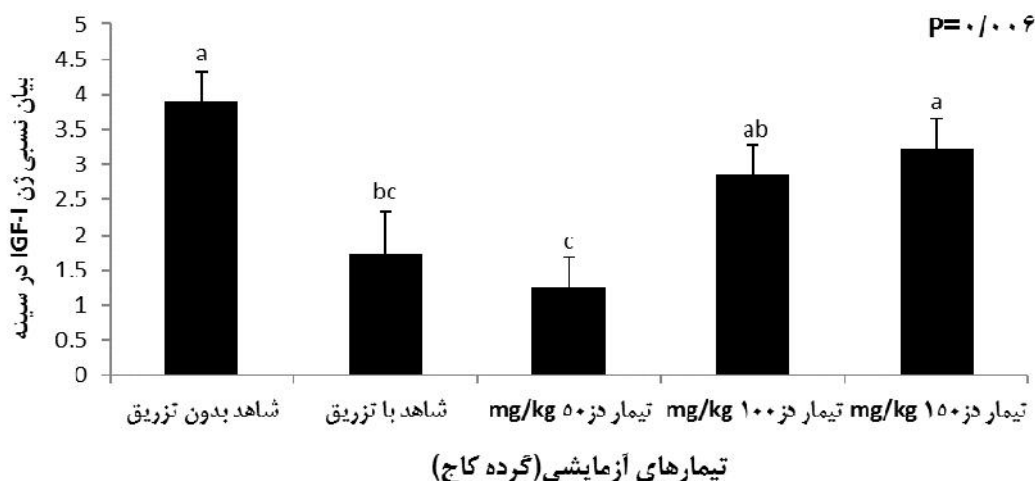
اختلاف در نتایج ضریب تبدیل و نرخ رشد احتمال دارد به دلیل مقدار تغییر تمایز جنسیتی باشد. این نتیجه ممکن است به دلیل میزان تغییر گنادها و مقدار تستوسترون تراوش شده از گنادها باشد.

### بررسی بیان ژن

با توجه به نگاره ۱، نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن فاکتور رشد IGF-I در بافت ران جوجه، معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). نگاره ۲ نتایج مربوط به تاثیر عصاره گرده کاج بر بیان نسبی ژن فاکتور رشد IGF-I در بافت سینه جوجه را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود عصاره گرده کاج بر بیان نسبی ژن فاکتور رشد IGF-I در بافت سینه جوجه تاثیر معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ) در تیمار تزریق شده (شاهد تزریق شده، تیمار با دز ۵۰ mg/l عصاره گرده کاج) بیان نسبی ژن IGF-I در بافت سینه کاهش یافته که احتمال دارد به دلیل افزایش تنش محیطی (سوارخ کردن تخم مرغ، افزایش بار میکروبی درون تخم مرغ، اثرات زیان آور حلال) در زمان تزریق باشد ولی با افزایش دز پاسخ به دز دیده می‌شود به طوری که در تیمار ۱۵۰ mg/l عصاره گرده کاج بیان نسبی ژن IGF-I در بافت سینه به طور معنی‌دار افزایش یافت. اوربن و همکاران (۴۶) گزارش کردند تزریق تستوسترون (جزی از هورمون آندروژنی) در مردان میان سال سبب افزایش IGF-I می‌شود. ادنگیا و همکاران (۳) عنوان کردند گرده کاج دارای فیتوآندروژن متابولیک است و افزودن گرده کاج در غذای تجاری گربه ماهی در مرحله بچه ماهی تا بند انگشتی سبب افزایش میانگین وزن شد. گونک و همکاران (۱۶) بیان کردند رشد عضله سینه در زمان جنینی سرعت کمی داشته ولی در اوایل دوره پرورش سریع شد و همچنین در عضله سینه غلظت IGF-I در نزدیکی تولد



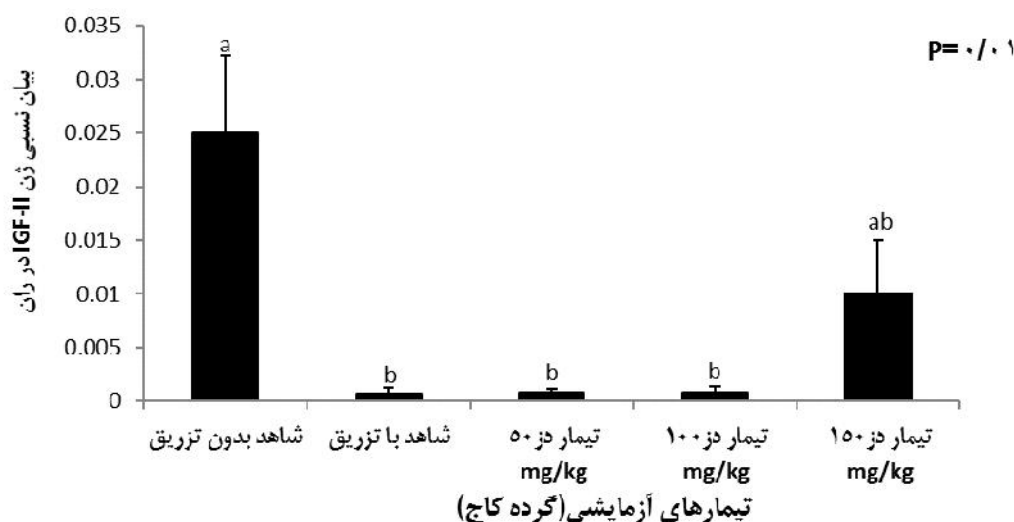
نگاره ۱- بیان نسبی ژن IGF-I در بافت ران. میانگین دارای حروف ناهمساند تفاوت آماری معنی‌داری دارند ( $P < 0.05$ )  
Figure 1. Relative gene expression of IGF-I in thigh tissue. Means bearing different superscript letters differ significantly ( $P < 0.05$ )



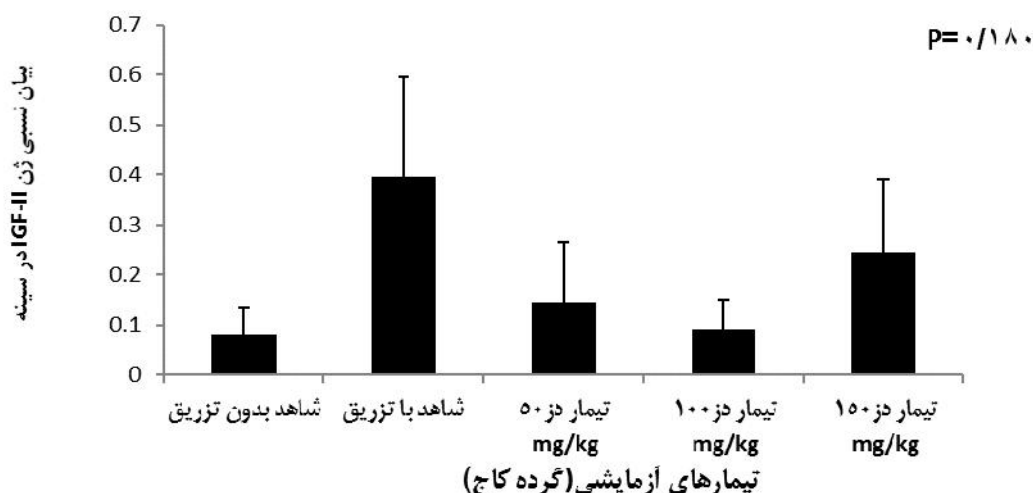
نگاره ۲- بیان نسبی ژن IGF-I در بافت سینه. میانگین دارای حروف ناهمساند تفاوت آماری معنی داری دارند ( $P < 0.05$ ).  
Figure 2. Relative gene expression of IGF-I in breast tissue. Means bearing different superscript letters differ significantly ( $P < 0.05$ )

از تولد به طور معنی داری کاهش می یابد. گیرنده IGF-IR میل ترکیبی زیادی با IGF-I دارد و با IGF-II حدود ۱۰ برابر میل ترکیبی آن از IGF-IR کمتر است (۲۱). گیرنده نوع دوم IGF میل ترکیبی زیاد با IGF-II دارد و میل ترکیبی IGF-I با این گیرنده کم است (۲۱) هورمون رشد سنتز و تراوش IGF-I را در جگر با پیوند به گیرنده GH تحریک می کند (۲۹) در صورتی که IGF-II مستقل از هورمون رشد و در جگر تولید می شود (۴۵). از آن جا که گیرنده IGF-II در جنین پرندگان وجود ندارد عملکرد IGF-I و IGF-II در جنین جوجه با هم مشابه است (۱۴). احتمال دارد تفاوت در نگاره ۲ و نگاره ۳ به دلیل تفاوت در بیان ژن IGF-I و IGF-II باشد ولی هر دو نمودار نشان دهنده این است که با افزایش دوز یا تغییر در مکان و زمان تزریق اثرات مطلوب تری به دنبال دارد.

با توجه به نگاره ۳ نتایج مربوط به تاثیر تیمارهای آزمایشی بر بیان نسبی ژن IGF-II در بافت ران جوجه، تفاوت معنی داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ) و همانند نمودار ۲ بیان نسبی ژن IGF-II مانند IGF-I در تیمار تزریق شده کاهش یافت که احتمال دارد به دلیل افزایش تنش محیطی (سوارخ کردن تخم مرغ، افزایش بار میکروبی درون تخم مرغ، اثرات زیان آور حلال) در زمان تزریق باشد ولی با افزایش دز، پاسخ به دز دیده می شود به طوری که در تیمار ۱۵۰ mg/L تمایل به معنی داری مشاهده شد. با توجه به نگاره ۴، در نتایج مربوط به تاثیر عصاره گرده کاج بر بیان نسبی ژن فاکتور رشد IGF-II در بافت سینه جوجه، تفاوت معنی داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). استوار و روتین (۴۲) بیان کردن غلظت پلاسمایی IGF-II در نرخ رشد پستانداران تاثیر گذار است در زمان جنینی IGF-II تقریباً بیان نسبی بیشتری دارد، ولی بعد



نگاره ۳- بیان نسبی ژن IGF-II در بافت ران. میانگین دارای حروف ناهمساند تفاوت آماری معنی داری دارند ( $P < 0.05$ ).  
Figure 3. Relative gene expression of IGF-II in thigh tissue. Means bearing different superscript letters differ significantly ( $P < 0.05$ )



نگاره ۴- بیان نسبی ژن IGF-II در بافت سینه. میانگین دارای حروف ناهمبند تفاوت آماری معنی داری دارند ( $P < 0.05$ ).  
Figure 4. Relative gene expression of IGF-II in breast tissue. Means bearing different superscript letters differ significantly ( $P < 0.05$ )

تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج تاثیر معنی داری بر جوجه درآوری، کیفیت، صفات اقتصادی و تمایز جنسیت جوجه های گوشتی نداشت. تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج در مقایسه با تیمارهای با تزریق شده (به خصوص بیشترین سطح آن) سبب افزایش معنی دار در بیان نسبی IGF-I شد. تزریق درون تخم مرغی عصاره گرده کاج تاثیر معنی داری در بیان نسبی ژن IGF-II نداشت ولی همانند بیان نسبی ژن IGF-I پاسخ به دز دیده شد.

## منابع

1. Abedi, A., M. Parviz, S.M. Karimian and H.R.S. Rodsari. 2013. Aphrodisiac activity of aqueous extract of Phoenix dactylifera pollen in male rats Journal of Physiology and Pharmacology Advances, 2: 235-242.
2. Adams, G.R. and S.A. McCue. 1998. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. Journal of Applied Physiology, 84: 1716-1722.
3. Adenigba, I., B. Tumbokon and A. Serrano. 2017. Androgenic and Anabolic effects of Pinus tabulaeformis Carr. Pollen in Clarias gariepinus. The Israeli Journal of Aquaculture, 69: 1388-1396.
4. Allan, G.J., D.J. Flint and K. Patel. 2001. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. Reproduction, 122: 31-39.
5. Aslani, M. and M. Mottaghtalab. 2011. Effect anti-aromatase tea extract on the sex ratio of broiler chicks, MS, University of Agricultural Sciences, Gilan, Iran, 80 (In Persian).
6. Bacon, W.L., K.E. Nestor, D.A. Emmerson, R. Vasilatos-Younken and D.W. Long. 1993. Circulating IGF-I in plasma of growing male and female turkeys of medium and heavy weight lines. Domestic Animal Endocrinology, 10: 267-277.
7. Beccavin, C., B. Chevalier, L.A. Cogburn, J. Simon and M.J. Duclos. 2001. Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate. Journal of Endocrinology, 168: 297-306.
8. Benyi, K., T.S. Tshilale, A.J. Netshipale and K.T. Mahlako. 2015. Effects of genotype and sex on the growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. Tropical Animal Health and Production, 47: 1225-1231.
9. Burke, W.H. and M.H. Henry. 1999. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. Poultry science, 78: 1019-1035.
10. Chu, H.L., H. Mao, W. Feng, J.W. Liu and Y. Geng. 2013. Effects of sulfated polysaccharide from Masson pine (Pinus massoniana) pollen on the proliferation and cell cycle of HepG2 cells. International Journal of Biological Macromolecules, 55: 104-108.
11. Co kun, I., H. Çayan, O. Yilmaz, A. Taskin, E. Tahtabıçen and H.E. Samli. 2014. Effects of in-ovo pollen extract injection to fertile broiler eggs on hatchability and subsequent chick weight. Turk Tarım ve Doga Bilimleri Dergisi, 1: 485-489.
12. Cobb hatchery management guide. 2001. The cobb Breeding company Ltd. Available on: www.cobbvntress.com
13. Elbrecht, A. and R. Smith. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chicken. Science, 255: 464-469.
14. Duclos, M.J., R.S. Wilkie and C. Goddard. 1991. Stimulation of DNA synthesis in chicken muscle satellite cells by insulin and insulin-like growth factors: evidence for exclusive mediation by a type-I insulin-like growth factor receptor. Journal of Endocrinology, 128: 35-NP.
15. Fazli, N., A. Hassanabadi, M. Mottaghtalab and H. Hajati. 2015. Manipulation of broiler chickens sex differentiation by in ovo injection of aromatase inhibitors and garlic and tomato extracts. Poultry Science, 94: 2778-2783.
16. Guernec, A., C. Berri, B. Chevalier, N. Wacrenier-Cere, E. Le Bihan-Duval and M.J. Duclos. 2003. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. Growth Hormone & IGF Research, 13: 8-18.
17. Hong, I.P., S.O. Woo and J.S. Jang. 2013. Effect on testosterone production in sprague-dawley rats of gastrodia and bee pollen. Journal Environ Health Sciences, 39: 43-47.
18. Hamburger V. and H.L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Journal of Morphology, 88: 49-92.
19. Hernandez, F., M. Lopez, S. Martinez, M.D. Megias, P. Catala and J. Madrid. 2012. Effect of low-protein diets and single sex on production performance, plasma metabolites, digestibility and nitrogen excretion in 1-to 48-day-old broilers. Poultry Science, 91: 683-692.
20. Kaylashki, A. 2006. Effects of Some Natural Factors on the Quantitative Characteristics of (Pinus eldarica Medw) in the West Forest of Mazandaran. Scientific Journal of Agriculture, 1: 81-87 (In Persian).



21. Laviola, L., A. Natalicchio and F. Giorgino. 2007. The IGF-I signaling pathway. *Current pharmaceutical design*, 13: 663-669.
22. Lee, K.H. and E.M. Choi. 2009. Effect of pine pollen extract on experimental chronic arthritis. *Phytotherapy Research*, 23: 651-657.
23. Liu, Y., W. Guo, Z. Pu, X. Li, X. Lei, J. Yao and X. Yang. 2016. Developmental changes of Insulin-like growth factors in the liver and muscle of chick embryos. *Poultry Science*, 95(6): 1396-1402.
24. Lu, F.Z., J. Chen, X.X. Wang and H.L. Liu. 2009. Investigation of the insulin-like growth factor system in breast muscle during embryonic and postnatal development in Langshan and Arbor Acres chickens subjected to different feeding regimens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(4): 471-482.
25. Mafia, M., M. Mottaghtalab and M. Hamooni Haghighat. 2010. Manipulation of the Sexual Distribution of Broiler Chickens Using Intraperitoneal Injection of Black Eagle Extract, MS, University of Agricultural Sciences, Guilan, Iran, 79 (In Persian).
26. Mao, G.X., D. Zheng, Y.B. Cao, Z.M. Chen, Y.D. Lv, Y.Z. Wang and J. Yan. 2012. Antiaging effect of pine pollen in human diploid fibroblasts and in a mouse model induced by D-galactose. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 85: 112-128.
27. Mottaghtalab M. and A. Jamshasb. 2016 Effect of *in ovo* injection of tomato extract on sex differences and economic performance of broiler chickens, Seventh Iranian Congress of Animal Science, Tehran, Iran, (In Persian).
28. Mortensen, A.S. and A. Arukwe. 2006. Dimethyl sulfoxide is a potent modulator of estrogen receptor isoforms and xenoestrogen biomarker responses in primary culture of salmon hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 79: 99-103.
29. Ohlsson, C., B.A. Bengtsson, O.G. Lsaksson, T.T. Andreassen, and M.C. Sootweg. 1998. Growth hormone and bone. *Endocrinol. Rev.* 19: 55- 79.
30. Ojedapo, L.O., O. Akinokun, T.A. Adedeji, T.B. Olayeni, S.A. Ameen and S.R. Amao. 2008. Effect of strain and sex on carcass characteristics of three commercial broilers reared in deep litter system in the derived savannah area of Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4: 487-491.
31. Quinn, L.S., B. Steinmetz, A. Maas, L. Ong and M. Kaleko. 1994. Type-I insulin-like growth factor receptor overexpression produces dual effects on myoblast proliferation and differentiation. *Journal of cellular physiology*, 159: 387-398.
32. Pourabbas, S., M. Kestemi and A.R. Reshk. 2011. Effects anxiolytic of fennel and probabilistic role of gobarergic system and estrogen receptors in these effects in rats. *Iranian physiology and pharmacology*, Volume 1: 134-143 (In Persian).
33. Rastgar Farajzad, A., K. Ghasemi and R. Idelzadeh. 2013. *Ganung Medical Physiology*, Ganung. Publishers world of adib. 750 pp (In Persian)
34. Robcis, H.L., T. Caldes and F.D. Pablo. 1991. Insulin-Like Growth Factor-I Serum Levels Show a Midembryogenesis Peak in Chicken That Is Absent in Growth-Retarded Embryos Cultured ex Ovo. *Endocrinology*, 128: 1895-1901.
35. Saden-Krehula, M., M. Tajic and D. Kolbah. 1971. Testosterone, epitestosterone and androstenedione in the pollen of Scotch pine P. silvestris L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 27: 108-109.
36. Saden-Krehula, M., M. Tajic and D. Kolbah. 1979. Sex hormones and corticosteroids in pollen of Pinus nigra. *Phytochemistry*, 18: 345-346.
37. Saden-Krehula, M. and M. Tajic. 1987. Vitamin D and its metabolites in the pollen of pine. Part 5: Steroid hormones in the pollen of pine species. *Die Pharmazie*, 42: 471-472.
38. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3: 1101-1108.
39. Shimada, K. 1998. Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 281: 450-460.
40. Shimada, K. and N. Saito. 2000. Molecular mechanisms of sex determination and differentiation. *Journal of Poultry Science*, 37: 3-11.
41. Smith, C.A. 2010. Rowley review. Sex determination in birds: A review. *Emu*, 110: 364-377.
42. Stewart, C.E. and P. Rotwein. 1996. Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 11330-11338.
43. SAS. 2006. Statistical analysis system proprietary software release 9.1. SAS Inst. Inc.,
44. Tona, K., F. Bamelis, B. De Ketelaere, V. Bruggeman, V.M. Moraes, J. Buyse, O. Onagbesan and Decuyper, E. 2003. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poultry Science*, 82: 736-741.
45. Towhidi, A., A. Dirandeh and T. Saberi Fred. 2010. Hormonal regulation of farm animal growth, translated by Hossner, K.I., first edition Tehran University Press 1-314. (In Persian)
46. Urban, R.J., Y.H. Bodenbun, C.H.A.R.I.E. S. Gilkison, Y.J.U.D. Foxworth, A.R. Coggan, R.R. Wolfe and A. Ferrando. 1995. Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 269: 820-826.
47. Vaillant, S., D. Guemene, M. Dorizzi, C. Pieau, N. Richard-Mercier and J.P. Brillard. 2003. Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (*Gallus domesticus*) treated with Fadrozole. *Molecular Reproduction and Development*, 65: 420-428.
48. Valizadeh, E. and H. Seratinouri. 2013. Effects of garlic extract, anti-estrogens, and aromatase inhibitor on sex differentiation in embryo. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 1: 51-55.
49. Weissmann, A., S. Reitemeier, A. Hahn, J. Gottschalk and A. Einspanier. 2013. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for *in ovo* gender identification. *Theriogenology*, 80: 199-205.
50. Willemsen, H., N. Everaert, A. Witters, L. De Smit, M. Debonne, F. Verschuere, P. Garain, D. Berckmans, E. Decuyper and V. Bruggeman. 2008. Critical assessment of chick quality measurements as an indicator of posthatch performance. *Poultry Science*, 87: 2358-2366.
51. Willemsen, H., B. Kamers, F. Dahlke, H. Han, Z. Song, Z. Ansari Pirsaraei, T. Kokou, D. Eddy and N. Everaert. 2010. High- and low-temperature manipulation during late incubation: effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. *Poultry Science*, 89: 2678-2690.
52. Wyatt, R.D. and B. Howarth. 1976. Effect of dimethyl sulfoxide on embryonic survival and subsequent chick performance. *Poultry Science*, 55: 579-582.
53. Yakar, S.J., L. Liu, B. Stannard, A. Butler, D. Accili, B. Sauer and D. LeRoith. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 7324-7329.
54. Yang, X.R., H.S. Jiang, J.X. Zheng, L.J. QU, S.R. Chen, J.Y. LI and Y.A.N.G. Ning. 2013. Dosage Effects of Fadrozole on Growth and Development of Sex-Reversed Genetic Female Chickens. *Journal of Integrative Agriculture*, 12: 1049-1053.
55. Zamiri M.G. 2001 Reproduction in domestic birds, translated by Robert, J. Charles Part IV: 134-95 (In Persian)
56. Zhao, L., W. Windisch and M. Kirchgesner. 1996. A study on the nutritive value of pollen from the Chinese Masson Pine (*Pinus massoniana*) and its effect on fecal characteristics in rats. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 35: 341-347.

## Effect of *in ovo* Injection of Pine Pollen Extract on Growth and Sex Differences of Broiler Chicks

Afsane Sarbozi Farah Abad<sup>1</sup> Zarbakht Ansari-Pirsaraei<sup>2</sup> Pourya Biparva<sup>3</sup> and  
Essa Dirandeh<sup>4</sup>

---

1, 3 and 4- Graduated M.Sc. Student of Animal Sciences Department, Assistant Professor of Basic Sciences  
Department and Assistant Professor of Animal Sciences Department, Sari Agricultural Sciences and Natural  
Resources University

2- Associate Professor of Animal Sciences Department, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University,  
(Corresponding Author: zarbakht\_ansari@yahoo.com)

Received: August 20, 2017 Accepted: January 10, 2018

---

### Abstract

One of the problems of the poultry industry is a lack of flocks in broiler farms. Although it is in the factories of hatchery broiler chickens and turkey, often sexing chickens to sell commercial growers, because sex differences in growth rate and feed efficiency, separating males and females to the necessary recurrence needs of uniform and specified market in terms of production carcasses. The current study was conducted to evaluate the effect of *in ovo* injection of Pine pollen extract on growth and sex differentiation of broiler chicks. A total of 500 Ross (W-308) egg completely randomized with five treatments were assigned to 4 replicates of 25 eggs in each pen. Treatments included: 1- Non-injected control 2- Sham control (DMSO) 3- injection 50 mg/L of Pine pollen extract 4- injection 100 mg/L of Pine pollen extract 5- injection 150 mg/L of Pine pollen extract. The economic characteristics, hatching percent and the sex differentiation and the relative expression of IGF-I and IGF-II were evaluated. The results of this study showed that Pine pollen extract had no significant effect on hatching percent, economic characteristics and the sex differentiation; but, *in ovo* injection of Pine pollen extract decreased the relative expression of IGF-I and IGF-II genes. Relative expression of IGF-I gene in breast tissue and IGF-II in the thigh tissue had a dose response to Pine pollen extract. Injection of 150 mg/L of pine pollen extract significantly increased relative gene expression of IGF-I in breast tissue.

**Keywords:** In ovo injection Sex differentiation Growth Pine pollen extract