

Research Paper

Effects of in ovo Injection of L-carnitine and Betaine on Hatchability, Blood Metabolites Concentration, Carcass Characteristics, Expression of Some Growth Associated Genes and Development of One Day Old Chicks

Fereshteh Shokrani¹, Mohsen Daneshyar² , Zarbakt Ansari Pirsaraei³ and
Seyed Ali Mirghelenj⁴

1- Ph. D. Student of Poultry Nutrition, Department of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran

2- Professor, Department of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran,

(Corresponding author: daneshyar_mohsen@yahoo.com)

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

4- Associate professor, Department of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 8 April, 2023

Accepted: 3 December, 2023

Extended Abstract

Background: In ovo feeding of nutrients into the egg can reduce nutrient limitations within the egg, thereby improving embryo quality and chick growth. Therefore, significant attention should be given to the growth and development of the embryo to maximize performance after hatching. Additionally, providing nutrients to the embryo (embryo nutrition) may enhance growth performance and help overcome developmental limitations during the late embryonic period and early life of the chick. Administering certain nutrients during the incubation period can improve metabolism in chick embryos and yield beneficial effects on post-hatching performance. L-carnitine is a dipolar compound soluble in water, and its in ovo injection may benefit chickens due to their limited capacity to synthesize L-carnitine. Betaine, a derivative of the amino acid trimethylglycine, acts as a methyl group donor, and its beneficial effects on the performance of various bird species have been documented in numerous studies. This study aimed to investigate the effects of in ovo feeding of L-carnitine and betaine, either alone or in combination, on hatchability, carcass traits (drumstick, breast, liver, and egg yolk), blood indices (cholesterol, triglycerides, and total protein), and the expression of growth-associated genes (liver IGF-1 and muscle MyoD and Myf5) in chicks.

Methods: A total of 630 fertile eggs (Ross 308 strain from a 34-week-old breeder flock) were randomly assigned to six treatments, with five replicates and 21 eggs per replicate. The mean weight of the eggs was 56.64 ± 1.18 g. Treatments included a control group (non-injected), dry punch, physiological saline injection (100 μ L), in ovo injection of L-carnitine (8 mg), in ovo injection of betaine (2.5 mg), and in ovo injection of both L-carnitine and betaine (8 mg L-carnitine + 2.5 mg betaine). Treatment solutions were injected into the amniotic sac on day 14 of incubation. A total of 100 μ L of the injection solution was injected with an insulin syringe into the upper third of the egg, reaching a depth of 19 mm. The injection solution was maintained at 30°C, while the environmental temperature was kept at 35°C, with each treatment lasting approximately 15 minutes. After injection, the injection site was sealed. The eggs were then placed in an incubator set at 37.5°C and 61% humidity. Infertile eggs and those with dead embryos were transferred to the laboratory for examination of embryonic mortality. After hatching, the chicks were weighed using a digital scale with an accuracy of 0.01 g to determine post-hatch weight. Two chicks from each replicate were selected and slaughtered to assess carcass traits (drumstick, breast, liver, and egg yolk). Blood samples were taken from the neck to determine blood parameters (cholesterol, triglycerides, and total protein). The liver and breast muscle of the one-day-old chicks were collected to measure relative gene expression. Relative gene expressions were quantified using Real-Time PCR with gene-specific primers. Data obtained from gene expression were analyzed using the Livak method. The remaining chicks were reared for seven days, during which weight gain, feed consumption, and feed conversion ratio were determined. Data were analyzed using the general linear model procedures of SAS 9.1.

Results: The results indicated that in ovo injection of 8 mg L-carnitine decreased mortality and increased hatchability ($p < 0.05$). However, injection of 2.5 mg betaine increased embryo mortality during the final stage of incubation and decreased the percentage of hatched chicks ($p < 0.05$). In ovo injection of L-carnitine and betaine, both alone and in combination, reduced serum triglyceride and cholesterol concentrations ($p < 0.05$) but did not significantly affect total protein concentration ($p > 0.05$). Furthermore, in ovo injection of L-carnitine and betaine, alone or in combination, increased the percentage of breast and thigh yield in newly hatched chicks ($p < 0.05$). However, there was no effect on yolk sac and liver weights ($p > 0.05$). The injections did not influence the functional characteristics of the chickens at 7 days of age ($p > 0.05$). Additionally, L-carnitine and betaine, either alone or in combination, increased the relative expression of the IGF-1 gene in the liver and the MyoD and Myf5 genes in the breast muscle of hatched chicks ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this research indicate that L-carnitine may reduce embryo mortality during incubation by mitigating oxidative stress, thereby increasing the hatching rate. Overall, the findings suggest that in ovo injection of L-carnitine and betaine can stimulate IGF-1 secretion and subsequently enhance the expression of muscle regulatory genes (MyoD, Myf5), promoting the proliferation and maturation of satellite cells during the embryonic stage. Therefore, L-carnitine and betaine can be recognized as positive stimulants of the IGF-1 signaling pathway, contributing to muscle growth and overall chicken development.

Keywords: Betaine, In ovo injection, Insulin like growth factors, L-carnitine, Myogenic regulator factors

How to Cite This Article: Shokrani, F., Daneshyar, M., Ansari, Z., & Mirghelenj, S. A. (2024). Effects of In ovo Injection of L-carnitine and Betaine on Hatchability, Blood Metabolites Concentration, Carcass Characteristics, Expression of Some Growth Associated Genes and Development of One Day Old Chicks. *Res Anim Prod*, 15(1), 83-94.
<https://doi.org/10.61186/rap.15.43.75>



مقاله پژوهشی

تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری، غلظت متابولیت‌های خون، ویژگی‌های لاشه و بیان برخی از ژن‌های مرتبط با رشد و نمو در جوجه‌های گوشتی یک روزه

فرشته شکرانی^۱، محسن دانشیار^۲ , زربخت انصاری پیرسرانی^۳ و سید علی میرقلنج^۴

۱- دانشجوی دکتری تغذیه طیور، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسؤل: daneshyar_mohsen@yahoo.com)

۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۴- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲
صفحه: ۸۳ تا ۹۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تغذیه مواد مغذی به داخل تخم مرغ می‌تواند محدودیت مواد مغذی موجود در تخم مرغ را کاهش دهد و به بهبود کیفیت رشد جنین و جوجه کمک نماید. بنابراین جهت دستیابی به حداکثر عملکرد پس از تفریح، بایستی توجه زیادی بر رشد و نمو جنین صورت گیرد. همچنین، تامین مواد مغذی برای جنین (تغذیه جنینی) در اواخر دوره جنینی و اوایل زندگی جوجه می‌تواند به منظور برطرف کردن محدودیت‌های رشد و نمو مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از برخی مواد مغذی طی دوره انکوباسیون می‌تواند باعث بهبود سوخت و ساز در جنین شده و اثرات مفیدی بر عملکرد بعد از تفریح داشته باشد. ال-کارنیتین ترکیبی دوقطبی محلول در آب است و به دلیل ظرفیت محدود جوجه‌های جوان برای سنتز ال-کارنیتین، افزودن این ماده می‌تواند اثرات سودمندی برای جوجه داشته باشد. بتائین از مشتقات اسیدهای آمینه (تری متیل گلیسین) است و به عنوان دهنده گروه متیل عمل می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی تاثیر تغذیه جنینی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری، شاخص رشد و بیان برخی از ژن‌های مرتبط با رشد و نمو در جوجه‌های گوشتی یک روزه انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این تحقیق تعداد ۶۳۰ عدد تخم مرغ نطفه دار نژاد راس سویه ۳۰۸ (سن مرغ‌های مادر ۳۴ هفته) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۵ تکرار و تعداد ۲۱ عدد تخم مرغ در هر تکرار استفاده شد. میانگین وزن تخم مرغ‌ها برابر $56/64 \pm 1/18$ (سن مرغ‌های مادر ۳۴ هفته) بوده است. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون تزریق)، تزریق خشک (سوراخ کردن تخم مرغ)، تزریق سرم فیزیولوژی (۱۰۰ میکرولیتر)، تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین (۸ میلی گرم)، تزریق درون تخم مرغی بتائین (۲/۵ میلی گرم) و تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین (۸ میلی گرم ال-کارنیتین و ۲/۵ میلی گرم بتائین) بودند. تزریق در روز ۱۴ دوره جوجه‌کشی درون کیسه آمینوتیک انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول تزریق به وسیله سرنگ انسولین با زاویه ۴۵ درجه در یک سوم بالای تخم مرغ با عمق تزریق ۱۹ میلی متر تزریق گردید. دمای محلول تزریقی هنگام تزریق ۳۰ درجه سانتی گراد بود و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای هر تیمار انجام شد. بعد از تزریق محل تزریق با استفاده از چسب مسدود شد. تخم مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی (با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۱ درصد) قرار داده شدند. بعد از تفریح، جوجه‌ها وزن کشی شدند. همچنین تخم مرغ‌های نابارور و تخم مرغ‌های با جنین مرده برای بررسی گامه‌های مرگ و میر جنینی به آزمایشگاه منتقل و شکسته شدند. جوجه‌ها پس از تفریح، با ترازی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند و وزن پس از تولد تعیین شد. سپس دو جوجه از هر تکرار برای بررسی خصوصیات لاشه (ران، سینه، جگر و کیسه زرده) انتخاب و کشتار شدند. خون‌گیری از سیاهرگ گردن برای اندازه‌گیری برخی از فراسنجه‌های خونی (کلسترول، تری گلیسرید و پروتئین کل) انجام شد. برای بررسی بیان نسبی ژن‌ها، نمونه بافت جگر و ماهیچه سینه از جوجه یک روزه جدا شد. بیان نسبی ژن‌ها به وسیله واکنش Real-Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده از بیان ژن با روش لیاوک واکاوی اولیه شد. جوجه‌های باقیمانده به مدت هفت روز پرورش داده شدند و افزایش وزن، مصرف خوراک اندازه‌گیری و ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد. واکاوی داده‌ها با رویه GLM نرم افزار SAS انجام شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین باعث کاهش تلفات و افزایش جوجه درآوری گردید ($P < 0/05$). تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین باعث افزایش مرگ و میر جنین در گامه پایانی و کاهش درصد جوجه درآوری گردید ($P < 0/05$). تزریق ال-کارنیتین و بتائین به تنهایی و با هم تاثیری بر وزن جوجه‌ها در هنگام تفریح نداشت ($P > 0/05$). تزریق ال-کارنیتین به همراه بتائین باعث کاهش غلظت تری گلیسرید و کلسترول سرم خون شد ($P < 0/05$). درحالی‌که تاثیری بر غلظت پروتئین کل در سرم خون نداشت ($P > 0/05$). تزریق ال-کارنیتین و بتائین به تنهایی و یا ترکیب ال-کارنیتین و بتائین باعث افزایش درصد سینه و ران در جوجه یک روزه گردید ($P < 0/05$). درحالی‌که تزریق ال-کارنیتین و بتائین تاثیری بر وزن کیسه زرده و جگر نداشت ($P > 0/05$). تزریق ال-کارنیتین و بتائین و ترکیب با هم تاثیری بر ویژگی‌های عملکردی جوجه‌ها در هفت روزگی نداشت ($P > 0/05$). علاوه بر این، تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین به تنهایی و ترکیب با هم باعث افزایش بیان نسبی ژن IGF-1 در بافت جگر و ژن‌های MyoD و Myf5 در ماهیچه سینه شد ($P < 0/05$).
نتیجه‌گیری کلی: نتایج پژوهش نشان داد که تزریق ال-کارنیتین با کاهش تنش اکسیداتیو ممکن است مرگ و میر جنین در مرحله جوجه درآوری را پایین آورده و در نتیجه نرخ جوجه درآوری را بهبود می‌دهد. به طور کلی، نتایج نشان داد که تزریق ال-کارنیتین و بتائین با افزایش بیان ژن IGF-1، می‌تواند ترشح IGF-1 را تحریک کرده و در نتیجه بیان برخی از ژن‌های تنظیمی ماهیچه (MyoD, Myf5) را افزایش داده و در پی آن تکثیر و بلوغ سلول‌های ماهوارهای را در مرحله جنینی بهبود دهد. بنابراین می‌توان ال-کارنیتین و بتائین را برای فعال سازی مسیر سیگنالی IGF-1 جهت تحریک رشد ماهیچه و رشد جوجه‌های گوشتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ال-کارنیتین، بتائین، تزریق درون تخم مرغی، فاکتور رشد شبه انسولینی، فاکتورهای تنظیمی ماهیچه

مقدمه

فیزیولوژیکی جنین جوجه‌ها را قبل و بعد از هج تحت تاثیر قرار می‌دهد. تزریق مناسب نه تنها هج را در جوجه‌ها بهبود می‌بخشد، بلکه وضعیت تغذیه‌ای را نیز بهبود داده و منجر به رشد بیشتر در جوجه‌ها شد (Ebrahimi et al., 2017). عوامل متعددی از جمله باروری تخم، مواد مغذی تخم، شرایط دستگاه جوجه‌کشی و مدیریت هجری بر قابلیت جوجه درآوری موثر

تزریق درون تخم مرغی با مواد مغذی طبیعی، مانند اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، محرک‌ها و هورمون‌ها می‌تواند رشد و توسعه جنین را بهبود بخشد و جوجه‌ها را برای رشد سریع آماده سازد (Rezaeian et al., 2022). تزریق مواد مغذی به درون تخم مرغ وضعیت

است (Araújo *et al.*, 2016). قسمتی از فرآیند رشد به‌وسیله رشد ماهیچه است. رشد ماهیچه از دوران رویانی و جنینی شروع می‌شود اما همه فیبرهای ماهیچه‌ای در یک زمان طی دوره رویانی و جنینی شکل نمی‌گیرند. نخستین مرحله تشکیل فیبرهای ماهیچه‌ای دوره جنینی است که اطراف آن را سلول‌های میوژنیک تک‌هسته‌ای احاطه می‌کنند. بعدها این سلول‌ها به فیبرهای ثانویه تبدیل می‌شوند (Velleman, 2007). جایگاه این فیبرها براساس جایگاه فیبرهای اولیه است. سپس سارکومر، باند Z و قابلیت انقباض باعث بالغ شدن فیبرهای ماهیچه‌ای می‌شوند. یکی از این فاکتورهای رونویسی MRFها است که در برگیرنده MyoD، MyF-5، میوژنین و MRF-4 است. وظیفه MyoD و MyF-5 اختصاصی شدن، شکل‌گیری و نگهداری مایوبلاست‌ها است (Parker *et al.*, 2003). مطالعات نشان داده‌اند که بیان MyoD بیان میوژنین را بهبود داده و تمایز نهایی سلول‌های عضله اسکلتی را تحریک می‌کند. میوژنین همچنین در تمایز سلول‌های ماهوارهای درگیر است و به‌عنوان شاخص در توسعه داخل سلولی عضله مفید می‌باشد (Moradi *et al.*, 2021). افزون بر فاکتورهای تنظیمی ماهیچه، چندین فاکتور رشد نیز میانجی‌گر رشد هستند که از این میان فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF-1) بر رشد همه‌ی بدن تأثیر دارند. ثابت شده است که تمایز و هایپرتروفی مایوبلاست از مسیر سیگنالی IGF-1، بواسطه مکانیسم هدف راپاماسین (mTOR)، تنظیم می‌شود (Rommel *et al.*, 2001). تنها این فاکتور است که نقش تحریکی بر هر دوی تکثیر و تمایز ماهیچه دارد (Abouzed *et al.*, 2019). این فاکتورها از طریق میانجی‌گری MRFها و فعالیت IGF-1R تکثیر و تمایز را تحریک می‌کنند. مشخص شده است که افزایش رشد ایجادشده به‌وسیله‌ی تغذیه‌ی جنینی، موجب افزایش وزن در زمان تولد به‌میزان ۴-۲ درصد شده و این افزایش وزن تا هفته‌ی اول ادامه یافته است. از سوی دیگر، با توجه به اینکه تار ماهیچه‌های جوجه‌ها در زمان پیش از خروج از تخم شکل می‌گیرند و رشد ماهیچه‌ای پس از خروج از تخم وابسته به افزایش حجم یاخته‌های ماهیچه‌ای است (Shafey *et al.*, 2010)، بنابراین راهبرد تغذیه‌ای برای رشد جوجه‌ها نباید تنها به بهبود رشد پس از خروج جوجه‌ها از تخم محدود شود و بایستی با بکار بردن راهکارهای مناسب، زمینه‌ی افزایش رشد ماهیچه را در مراحل جنینی، با بهبود تغذیه‌ی جنینی پایه‌ریزی کرد. ال-کارنیتین ترکیبی شبه‌ویتامین است که به‌آسانی در آب حل می‌شود و دارای اثرات متنوعی از قبیل محافظت و تنظیم غشاهای سلولی، افزایش ایمنی، نقش متابولیکی و همچنین نقش کاتالیتیکی می‌باشد (Keralapurath *et al.*, 2010b). تحقیقات اخیر نشان داده

است (Araújo *et al.*, 2016). قسمتی از فرآیند رشد به‌وسیله رشد ماهیچه است. رشد ماهیچه از دوران رویانی و جنینی شروع می‌شود اما همه فیبرهای ماهیچه‌ای در یک زمان طی دوره رویانی و جنینی شکل نمی‌گیرند. نخستین مرحله تشکیل فیبرهای ماهیچه‌ای دوره جنینی است که اطراف آن را سلول‌های میوژنیک تک‌هسته‌ای احاطه می‌کنند. بعدها این سلول‌ها به فیبرهای ثانویه تبدیل می‌شوند (Velleman, 2007). جایگاه این فیبرها براساس جایگاه فیبرهای اولیه است. سپس سارکومر، باند Z و قابلیت انقباض باعث بالغ شدن فیبرهای ماهیچه‌ای می‌شوند. یکی از این فاکتورهای رونویسی MRFها است که در برگیرنده MyoD، MyF-5، میوژنین و MRF-4 است. وظیفه MyoD و MyF-5 اختصاصی شدن، شکل‌گیری و نگهداری مایوبلاست‌ها است (Parker *et al.*, 2003). مطالعات نشان داده‌اند که بیان MyoD بیان میوژنین را بهبود داده و تمایز نهایی سلول‌های عضله اسکلتی را تحریک می‌کند. میوژنین همچنین در تمایز سلول‌های ماهوارهای درگیر است و به‌عنوان شاخص در توسعه داخل سلولی عضله مفید می‌باشد (Moradi *et al.*, 2021). افزون بر فاکتورهای تنظیمی ماهیچه، چندین فاکتور رشد نیز میانجی‌گر رشد هستند که از این میان فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF-1) بر رشد همه‌ی بدن تأثیر دارند. ثابت شده است که تمایز و هایپرتروفی مایوبلاست از مسیر سیگنالی IGF-1، بواسطه مکانیسم هدف راپاماسین (mTOR)، تنظیم می‌شود (Rommel *et al.*, 2001). تنها این فاکتور است که نقش تحریکی بر هر دوی تکثیر و تمایز ماهیچه دارد (Abouzed *et al.*, 2019). این فاکتورها از طریق میانجی‌گری MRFها و فعالیت IGF-1R تکثیر و تمایز را تحریک می‌کنند. مشخص شده است که افزایش رشد ایجادشده به‌وسیله‌ی تغذیه‌ی جنینی، موجب افزایش وزن در زمان تولد به‌میزان ۴-۲ درصد شده و این افزایش وزن تا هفته‌ی اول ادامه یافته است. از سوی دیگر، با توجه به اینکه تار ماهیچه‌های جوجه‌ها در زمان پیش از خروج از تخم شکل می‌گیرند و رشد ماهیچه‌ای پس از خروج از تخم وابسته به افزایش حجم یاخته‌های ماهیچه‌ای است (Shafey *et al.*, 2010)، بنابراین راهبرد تغذیه‌ای برای رشد جوجه‌ها نباید تنها به بهبود رشد پس از خروج جوجه‌ها از تخم محدود شود و بایستی با بکار بردن راهکارهای مناسب، زمینه‌ی افزایش رشد ماهیچه را در مراحل جنینی، با بهبود تغذیه‌ی جنینی پایه‌ریزی کرد. ال-کارنیتین ترکیبی شبه‌ویتامین است که به‌آسانی در آب حل می‌شود و دارای اثرات متنوعی از قبیل محافظت و تنظیم غشاهای سلولی، افزایش ایمنی، نقش متابولیکی و همچنین نقش کاتالیتیکی می‌باشد (Keralapurath *et al.*, 2010b). تحقیقات اخیر نشان داده است که نیاز به ال-کارنیتین در بعضی از شرایط از جمله محدود بودن سنتز ال-کارنیتین در حیوانات جوان، مصرف جیره‌هایی با چربی بالا و مقدار ال-کارنیتین کم، افزایش می‌یابد. بنابراین افزودن آن به‌صورت مکمل به خوراک طیور سریع‌الرشد می‌تواند موثر باشد (Arslan, 2006). از سویی دیگر با توجه به رشد سریع در اواخر دوره جنینی و نیاز به انرژی و محدود بودن سنتز ال-کارنیتین در بدن، استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای موثر بر

بوسيله مسیر سیگنالی IGF-1 بهبود بخشد. بنابراین بخشی از رشد ماهیچه در دوران جنینی است که فاکتورهای تنظیمی و فاکتورهای رشد بر آن تأثیر دارند. تغذیه در دوران جنینی اهمیت ویژه‌ای دارد به‌طوری‌که عدم توجه به آن باعث تاخیر و کاهش رشد می‌شود. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری و بیان ژن‌های مرتبط با رشد و نمو جوجه گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر تغذیه جنینی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری و شاخص رشد و بیان ژن‌های مرتبط با رشد و نمو در جوجه‌های گوشتی در شرکت جوجه‌کشی شرکت هما واقع در ساری انجام شد. برای انجام این تحقیق ۶۳۰ عدد تخم مرغ نطفه‌دار نژاد راس سویه ۳۰۸ (سن مرغ‌های مادر ۳۴ هفته) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۵ تکرار و تعداد ۲۱ عدد تخم مرغ در هر تکرار استفاده شد. میانگین وزن تخم مرغ‌ها برابر 1.18 ± 0.64 بوده است و تفاوتی بین وزن اولیه تخم مرغ‌های مورد استفاده وجود نداشت. تخم مرغ‌ها شماره‌گذاری و وزن اولیه آنها ثبت شد. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون تزریق)، تزریق خشک (سوراخ کردن تخم مرغ)، تزریق سرم فیزیولوژی (۱۰۰ میکرولیتر)، تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین (۸ میلی گرم)، تزریق درون تخم مرغی بتائین (۲/۵ میلی گرم) و تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین (۸ میلی گرم ال-کارنیتین و ۲/۵ میلی گرم بتائین) بود. ال-کارنیتین با شماره کاتالوگ ۸۴۰۰۹۲ از شرکت

از تفریخ، با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند و وزن پس از تولد تعیین شد. درصد جوجه درآوری از طریق تقسیم تعداد جوجه‌های تفریخ شده به تعداد تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار و ضرب عدد حاصله در ۱۰۰ محاسبه شد. در روز تولد، از هر تکرار دو جوجه کشتار شد و از گردن خونگیری شدند و سرم خون آن‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی و سرم تا زمان اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های خون (کلسترول، تری‌گلیسرید و پروتئین کل) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وزن اجزای لاشه با ترازوی با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد و وزن نسبی اندام‌ها به وزن زنده جوجه یک روزه گزارش شد. آنالیز پارامترهای خون با استفاده از کیت‌های شرکت پارس‌آزمون (ایران، تهران) و با استفاده از دستگاه اتوانالایزر مدل BS-120 انجام شد. باقیمانده جوجه‌ها به سالن پرورش منتقل و به مدت هفت روز پرورش داده شدند. برای تنظیم جیره‌ها از نرم‌افزار UFFDA استفاده گردید. ترکیب جیره‌های آزمایشی و مواد مغذی مورد نیاز در جدول ۱ ارائه شده است. در طی دوره پرورش شاخص‌های مصرف خوراک، افزایش وزن اندازه‌گیری شد و ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد.

مرک آلمان و بتائین با شماره ۱۰۷-۴۳-۷ و خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگماآلدردیج تهیه شد. تخم‌مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی کاملاً تمیز و ضدعفونی شده و در دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در روز ۱۴ جنینی، با رعایت اصول تزریق، تزریق در مایع آمنیوتیک انجام شد (Ebrahimi et al., 2017). در هنگام تزریق دمای محلول تزریقی ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای هر تیمار انجام شد. قبل از انجام تزریق محل موردنظر با الکل ضدعفونی شد. در هنگام تزریق به درون تخم‌مرغ، در آغاز تخم‌مرغ‌ها با استفاده از نوربینی بررسی شدند. تخم‌مرغ‌های فاقد نطفه یا جنین مرده حذف شدند و محدوده کیسه هوایی در تخم‌مرغ‌های سالم مشخص شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول تزریق به وسیله سرنگ انسولین با زاویه ۴۵ درجه در یک سوم بالای تخم‌مرغ با عمق تزریق ۱۹ میلی‌متر تزریق گردید. جهت استریل کردن محلول تزریق از نور UV استفاده شد. بعد از تزریق محل تزریق با استفاده از چسب مسدود شد. در روز ۱۹ تخم‌مرغ‌ها به سبدهای هجری انتقال داده شدند. سبدهای هجری براساس تیمارها و تکرارها توری بندی شدند به‌طوری‌که از هر تیمار در هر سبد وجود داشت. جوجه‌ها پس

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره‌ها (برحسب درصد)

Feedstuff (%) (%)	جیره آغازین (۱-۱۱ روزگی) Starter diet (1-11 days)
Corn ذرت	55.24
Soybean meal کنجاله سویا	39.28
Soybean oil روغن سویا	1.3
Di-calcium phosphate دی کلسیم فسفات	1.55
Calcium carbonate کربنات کلسیم	1.18
Vitamin supplement مکمل ویتامینی	0.25
Mineral supplement مکمل معدنی	0.25
DL- methionine دی ال متیونین	0.32
Lysine لیزین	0.24
Threonine ترئونین	0.1
NaCl کلرید سدیم	0.29
Total جمع کل	100
ترکیب شیمیایی جیره chemical composition of diets	
Metabolisable energy (MJ/kg) انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم)	11.92
Crude protein (%) پروتئین خام (درصد)	21.8
Calcium (%) کلسیم (درصد)	0.9
Available Phosphorus (%) فسفر قابل دسترس (درصد)	0.45

هر کیلوگرم از مکمل ویتامینی شامل: IU ۳۵۰۰۰۰ ویتامین A، IU ۱۰۰۰۰۰ ویتامین D3، IU ۹۰۰۰ ویتامین E، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین K3، B1، ۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین B9، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین H2، ۳۳۰۰ میلی‌گرم ویتامین B2، ۵۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B3، ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین B5، ۱۵۰۰ میلی‌گرم ویتامین B6، ۷/۵ میلی‌گرم ویتامین B12، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید بود.

هر کیلوگرم از مکمل معدنی شامل: ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۵۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۵۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۵۰۰ میلی‌گرم ید، ۱۰۰ میلی‌گرم سلنیوم بود. Each kilogram of vitamin supplement contains: IU 3500000 vitamin A, IU 1000000 vitamin D3, IU 9000 vitamin E, 1000 mg vitamin K3, 900 mg vitamin B1, 500 mg vitamin B9, 100 mg vitamin H2, 3300 mg vitamin B2, 5000 mg Vitamin B3, 1500 mg Vitamin B5, 1500 mg Vitamin B6, 7.5 mg Vitamin B12, 250,000 mg was Choline Chloride.

Each kilogram of the mineral supplement contained: 50,000 mg of manganese, 25,000 mg of iron, 50,000 mg of zinc, 5,000 mg of copper, 500 mg of iodine, and 100 mg of selenium.

سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین کیفیت cDNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که ویژگی‌های آنها در جدول ۲ آمده است. در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییر آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از یک ژن کنترل داخلی، GAPDH استفاده شد. برای سنجش بیان ژن به روش RT-PCR، کیت شرکت یکتا تجهیز مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی استفاده شده در واکنش Real Time

برای استخراج RNA قطعه کوچکی از بافت کبد و سینه جوجه یک روزه جدا شد و به سرعت درون تانک ازت انتقال داده شد. استخراج RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت کبد و سینه طبق راهنمای دستور کار کیت استخراج شرکت سیناکلون صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) ارزیابی شد. برای سنتز cDNA از مسترمیکس شرکت یکتا تجهیز استفاده شد. cDNA سنتز شده در دمای ۸۰- درجه

شد. داده های به دست آمده با روش لیواک واکاوی اولیه شد (Livak and Schmittgen, 2001). داده های به دست آمده از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و پنج تکرار، با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل شدند (SAS, 2007). مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و سطح معنی داری ۵ درصد انجام شد.

PCR (Rotor Gene 6000 Series Software 1.7) شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله باز شدن رشته ها دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۴۵ بار تکرار، و مرحله چسبیدن آغازگرها و تکثیر دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۶۰ ثانیه، بوده است. در پایان مقایسه بیان ژن با استفاده از برنامه REST و بر پایه میزان CT (شمار چرخه مورد نیاز برای رسیدن به یک سطح آستانه) به دست آمده توسط Real Time PCR نسبت به گروه شاهد (کنترل) انجام

جدول ۲- ویژگی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 2. Characteristics of primers used in this research

ژن Gene	اندازه باند (bp) Product size (bp)	توالی آغازگر (۵' - ۳') Primer sequence	Gene Bank Accession No	شماره ثبت شده در بانک ژن
IGF 1	191	F: CATTCTCTCTACCTTGGC R: TCATCCACTATTCCTTG		M32791
MyoD	156	F: CCGCCGATGACTTCTATG R: GCTCCTCTCTGTGGGTT		NM_204,214
MyF5	106	F: CTTGAGGCGGGCTACTG R: ACCACTGGAACAGGAAGT		NM_0010,30,363
GAPDH	182	F: TGAAGTCGGAGTCAACGGAT R: ACCTCTCTGGAAGATAGTAT		K01458

تخم مرغ تاثیر بر درصد سینه نداشت اما تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین موجب افزایش درصد سینه در جوجه های یک روزه گردید ($P < 0.05$). همچنین تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی و یا ترکیب ال-کارنیتین و بتائین باعث افزایش درصد سینه گردید ($P < 0.05$). علاوه بر این، تزریق خشک و سالین به تخم مرغ تاثیری بر درصد ران نداشت اما تزریق ال-کارنیتین موجب افزایش درصد ران در جوجه های یک روزه گردید ($P < 0.05$). همچنین تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی و یا ترکیب ال-کارنیتین و بتائین با هم باعث افزایش درصد ران گردید ($P < 0.05$).

شکل ۱ تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر بیان ژن در بافت کبد و ماهیچه سینه در جوجه یک روزه را نشان می دهد. در پژوهش کنونی، تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین و ۲/۵ میلی گرم بتائین سبب افزایش بیان نسبی ژن های IGF-1، MyoD و MyF5 در بافت کبد و ماهیچه سینه شده است ($P < 0.05$). تزریق خشک و سالین به تخم مرغ تاثیری بر بیان ژن IGF-1 نداشت اما تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین باعث افزایش بیان نسبی ژن IGF-1 در کبد گردید ($P < 0.05$). علاوه بر این، تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی و ترکیب با هم باعث افزایش بیان نسبی ژن IGF-1 در کبد گردید ($P < 0.05$). تزریق خشک و سالین به تخم های بارور تاثیری بر بیان ژن MyF5 نداشت اما تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین باعث افزایش بیان نسبی ژن MyF5 در ماهیچه سینه گردید ($P < 0.05$). همچنین تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی و ترکیب با هم باعث افزایش بیان نسبی ژن MyF5 در ماهیچه سینه گردید ($P < 0.05$). تزریق خشک و سالین به تخم مرغ های بارور تاثیری بر بیان ژن MyoD در ماهیچه سینه نداشت در حالیکه تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین باعث افزایش بیان نسبی ژن MyoD در ماهیچه سینه گردید ($P < 0.05$) همچنین ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی و ترکیب با هم باعث افزایش بیان نسبی ژن MyoD در ماهیچه سینه گردید ($P < 0.05$) (شکل ۱).

نتایج و بحث

تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری جوجه های گوشتی در جدول ۳ ارائه شده است. تزریق خشک و سالین به تخم های بارور باعث کاهش جوجه درآوری و افزایش تلفات گردید ($P < 0.05$) اما تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین باعث کاهش تلفات و افزایش جوجه درآوری گردید. تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی یا همراه با ۸ میلی گرم ال-کارنیتین نه تنها تاثیری بر بهبود جوجه درآوری نداشت بلکه باعث کاهش جوجه درآوری و افزایش تلفات در تخم های بارور گردید ($P < 0.05$).

جدول ۴ میانگین وزن اولیه تخم مرغ و میانگین وزن جوجه تفریخ شده را نشان می دهد. در این پژوهش، تزریق خشک و سالین تاثیری بر وزن جوجه ها در هنگام تفریخ نداشت، همچنین تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین و ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی یا ترکیب هر دو تاثیری بر وزن جوجه ها در هنگام تفریخ نداشت. تزریق خشک و سالین و تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین و ۲/۵ میلی گرم بتائین به تنهایی یا ترکیب هر دو تاثیر معنی داری بر مصرف خوراک، افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل خوراک در طی هفته اول پرورش نداشت (جدول ۵). جدول ۶ تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر فراسنجه های بیوشیمیایی سرم خون جوجه های گوشتی در یک روزگی را نشان می دهد. تزریق خشک و سالین به تخم های بارور تاثیری بر غلظت تری گلیسیرید و کلسترول نداشت اما تزریق ال-کارنیتین و بتائین به تنهایی یا با هم باعث کاهش غلظت تری گلیسیرید و کلسترول در سرم خون جوجه ها گردید ($P < 0.05$).

تزریق ال-کارنیتین و بتائین به تنهایی و با هم به تخم های بارور تاثیری بر غلظت پروتئین کل در سرم جوجه ها نداشت. تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر خصوصیات لاشه جوجه های گوشتی در یک روزگی در جدول ۷ ارائه شده است. تزریق ال-کارنیتین و بتائین به تخم های بارور تاثیری بر درصد کیسه زرده نداشت. تزریق خشک و سالین به

جدول ۳- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر قابلیت جوجه درآوری (درصد) و مرگ و میر جنین در جوجه گوشتی
Table 3. The effect of in ovo injection of L-carnitine and betaine on hatchability (%) and fetal death in broiler chickens

تیمار	جوجه درآوری از تخم مرغ ستی	جوجه درآوری از تخم مرغ بارور	مرگ و میر جنینی در گامه پایانی
Treatment	Hatching from setter egg	Hatching from fertilized egg	Fetal death in the final stage
بدون تزریق	85.71 ^b	90.94 ^b	9.05 ^d
Non injected control			
تزریق خشک	85.71 ^b	87.42 ^c	12.57 ^c
Dry punch			
تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سالین	84.76 ^b	84.76 ^d	15.23 ^b
Injected 100 µl Salin			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین	95.23 ^a	95.23 ^a	4.76 ^e
Injected 8 mg L-Carnitin			
تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین	80.95 ^c	80.00 ^e	20.00 ^a
Injected 2.5 mg betaine			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین + ۲/۵	80.95 ^c	81.71 ^e	18.28 ^a
Injected 8 mg L-Carnitine+2.5 mg betaine			
خطای استاندارد میانگین	0.8247	0.8988	0.8988
SEM			
خطای احتمال	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P-value			

a و b: حروف غیر همسان در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).a-b: Means within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)جدول ۴- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر وزن جوجه بعد تفریخ در جوجه گوشتی
Table 4. The effect of in ovo injection of L-carnitine and betaine on post-hatch weight in broiler chickens

تیمار	وزن جوجه تفریخ شده (گرم)	وزن اولیه تخم مرغ (گرم)
Treatment	Chick weight (gr)	Egg weight (gr)
بدون تزریق	40.27	57.34
Non injected control		
تزریق خشک	40.16	56.62
Dry punch		
تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سالین	40.45	56.62
Injected 100 µl Salin		
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین	40.80	56.70
Injected 8 mg L-Carnitin		
تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین	41.44	56.65
Injected 2.5 mg betaine		
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین + ۲/۵ میلی گرم بتائین	40.33	57.00
Injected 8 mg L-Carnitine+2.5 mg betaine		
خطای استاندارد میانگین	0.4033	0.3366
SEM		
خطای احتمال	0.2000	0.3764
P-value		

a و b: حروف غیر همسان در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).a-b: Means within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)جدول ۵- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر پارامترهای عملکردی در ۷ روزگی در جوجه گوشتی
Table 5. The effect of in ovo injection of L-carnitine and betaine on performance parameters of 7 days in broiler chickens

تیمار	مصرف خوراک (پرنده/ روز/ گرم)	افزایش وزن (پرنده/ روز/ گرم)	ضریب تبدیل خوراک (گرم/ گرم)
Treatment	Feed intake (bird/day/gr)	Weight gain (bird/day/gr)	Feed conversion ratio (gr/gr)
بدون تزریق	19.62	14.32	1.32
Non injected control			
تزریق خشک	19.54	14.55	1.34
Dry punch			
تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سالین	19.65	14.73	1.33
Injected 100 µl Salin			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین	19.79	14.92	1.32
Injected 8 mg L-Carnitin			
تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین	19.66	15.09	1.30
Injected 2.5 mg betaine			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین + ۲/۵ میلی گرم بتائین	19.52	14.78	1.32
Injected 8 mg L-Carnitine+2.5 mg betaine			
خطای استاندارد میانگین	0.1577	0.3066	0.0267
SEM			
خطای احتمال	0.9169	0.5865	0.6214
P-value			

a و b: حروف غیر همسان در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).a-b: Means within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

جدول ۶- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون جوجه‌های گوشتی یک‌روزه
Table 6. The effect of in ovo injection of L-carnitine and betaine on biochemical blood parameters in broiler chickens

تیمار	تری گلیسرید (میلی گرم / دسی لیتر)	کلسترول (میلی گرم / دسی لیتر)	پروتئین کل (گرم / دسی لیتر)
Treatment	Triglyceride (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Total protein) g/dl(
بدون تزریق	66.40 ^a	258.00 ^a	2.28
Non injected control			
تزریق خشک	55.00 ^a	244.20 ^a	2.28
Dry punch			
تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سالین	58.80 ^a	234.00 ^a	2.42
Injected 100 µl Salin			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین	61.00 ^a	190.60 ^b	1.96
Injected 8 mg L-Carnitin			
تزریق ۲.۵ میلی گرم بتائین	65.00 ^a	186.00 ^b	1.98
Injected 2.5 mg betaine			
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین + ۲/۵	40.80 ^b	140.00 ^c	1.98
Injected 8 mg L-Carnitine+2.5 mg betaine			
خطای استاندارد میانگین	3.7600	14.7450	0.1749
SEM			
خطای احتمال	0.0009	<0.0001	0.2926
P-value			

a و b: حروف غیر همسان در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

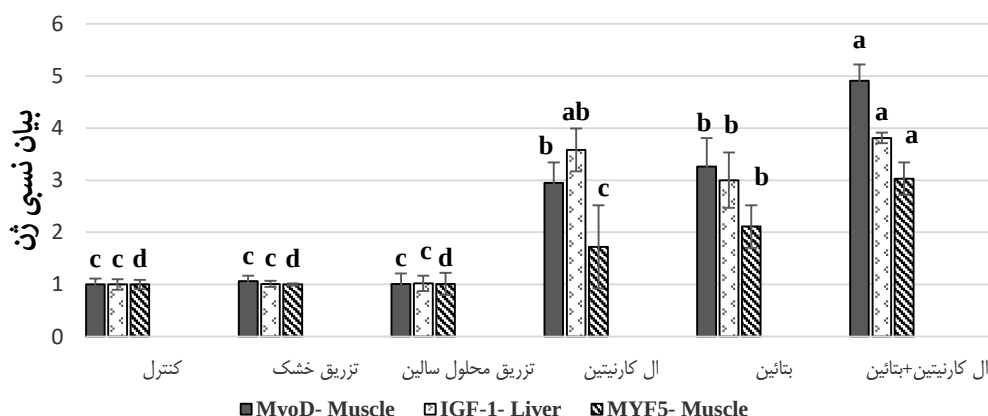
a-b: Means within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

جدول ۷- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر وزن اندام‌های داخلی و ویژگی‌های لاشه (درصد وزن زنده) جوجه‌های گوشتی یک‌روزه

تیمار	وزن بدن هنگام تولد (گرم)	کیسه زرده (درصد از وزن بدن)	جگر (درصد از وزن بدن)	ران (درصد از وزن بدن)	سینه (درصد از وزن بدن)
Treatment	Hatching body weight (gr)	Yolk sac (%)	Liver (%)	Thigh (%)	Breast (%)
بدون تزریق	40.57	9.04	2.62	8.59 ^c	1.78 ^b
Non injected control					
تزریق خشک	40.22	8.78	2.42	8.74 ^c	1.79 ^b
Dry punch					
تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سالین	40.53	9.01	2.32	8.86 ^{bc}	1.78 ^b
Injected 100 µl Salin					
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین	40.62	7.10	2.57	9.36 ^{ab}	2.03 ^a
Injected 8 mg L-Carnitin					
تزریق ۲/۵ میلی گرم بتائین	40.65	6.74	2.60	9.46 ^a	1.95 ^a
Injected 2.5 mg betaine					
تزریق ۸ میلی گرم ال-کارنیتین + ۲/۵	40.62	6.63	2.50	9.54 ^a	1.95 ^a
Injected 8 mg L-Carnitine+2.5 mg betaine					
خطای استاندارد میانگین	0.5963	0.7800	0.1664	0.1709	0.0403
SEM					
خطای احتمال	0.9958	0.0908	0.7611	0.0025	0.0007
P-value					

a و b: حروف غیر همسان در هرستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

a-b: Means within each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)



شکل ۱- تاثیر تزریق درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین بر بیان ژن فاکتورهای تنظیمی ماهیچه (MyoD و MyF5) در بافت ماهیچه سینه و IGF-1 در بافت جگر در جوجه یک‌روزه

Figure 1. The effect of in ovo injection of L-carnitine and betaine on expression genes of Myogenic regulator factors (MyoD, MyF5) in breast muscle and IGF-1 in liver of one day broiler chickens

مرگ و میر جنین در مرحله جوجه درآوری را با کاهش تنش اکسیداتیو کاهش دهد و در نتیجه نرخ جوجه درآوری را افزایش می‌دهد. در این پژوهش با توجه به کاهش مرگ و میر در گامه پایانی در گروه با تزریق ال-کارنیتین و همچنین افزایش نرخ جوجه‌درآوری، احتمال می‌رود ال-کارنیتین با کاهش تنش اکسیداتیو و از بین بردن رادیکال آزاد ناشی از اکسیداسیون چربی، موجب افزایش درصد جوجه‌درآوری شده است. اثر مثبت ال-کارنیتین در کاهش غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول پلاسما ممکن است به دلیل تاثیر ال-کارنیتین بر کاهش فعالیت لیپوپروتئین لیپاز باشد. مطابق با این یافته‌ها، زو و همکاران (Xu et al., 2003) گزارش کردند لیپوپروتئین لیپاز تری‌گلیسرید را به گلیسرول و اسیدهای چرب کاتالیز می‌کند. علاوه بر این با کاهش فعالیت لیپوپروتئین لیپاز، هیدرولیز LDL افزایش می‌یابد. LDL نقش مهمی در تنظیم ذخیره چربی بدن و در نتیجه کاهش چربی زیرجلدی به عهده دارد (Abd El- Azeem et al., 2014; Ghonim, 2016). در همین راستا، بیان شده است تزریق درون تخم‌مرغی ال-کارنیتین در مرحله جنینی غلظت ترکیبات لیپیدی پلاسما را کاهش می‌دهد (Rabie et al., 2015). تزریق ال-کارنیتین موجب افزایش درصد سینه و ران در مقایسه با گروه شاهد گردید. افزایش درصد ماهیچه به دلیل افزایش کارایی اکسیداسیون اسید چرب که ممکن است موجب کاهش وابستگی جنین به مسیر گلوکونئوتیک و ذخیره پروتئین ماهیچه پس از تفریح شود و بدین ترتیب سبب افزایش بازدهی ماهیچه در هنگام رشد شود. افزودن ال-کارنیتین موجب افزایش بازدهی اکسیداسیون اسیدهای چرب و در نتیجه منجر به بهبود استفاده از نیتروژن جیره شود (Keralapurath et al., 2010a).

در این پژوهش، افزودن ال-کارنیتین موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن IGF-1 در بافت جگر در جوجه یک‌روزه شده است. این افزایش ممکن است به دلیل تاثیر ال-کارنیتین بر صرفه‌جویی بیشتر متیونین و لیزین برای سنتز پروتئین باشد که موجب افزایش میوژن و هایپرتروفی ماهیچه به دلیل افزایش ترشح IGF-1 و در نتیجه سبب بهبود رشد ماهیچه شود. مطالعات اخیر نشان داده است IGF-1 نقش اساسی در تکثیر و بلوغ سلول‌های ماهواره‌ای، که پیش‌ساز میوفیبریل‌ها هستند، در طی مرحله جنینی ایفا می‌کند (Abdel-Fattah and Shourrap, 2012; Shafey et al., 2010). گزارش شده است MyoD، Myf5 و MRFs بیان ژن خاص در ماهیچه و رشد ماهیچه در هنگام جنینی و بعد از تولد را بر عهده دارند (Bailey et al., 2001). همچنین افزودن ال-کارنیتین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در آب آشامیدنی، بیان ژن‌های MyoD و Myf5 ماهیچه‌ی سینه در جوجه‌های گوشتی را افزایش داد (Abouzed et al., 2019). با توجه به نتایج این آزمایش، احتمال می‌رود رابطه مثبتی بین افزایش بیان ژن‌های IGF-1، MyoD و Myf5 وجود داشته باشد. رشد جوجه‌ها با رشد ماهیچه‌ی اسکلتی در ارتباط است که بوسیله فاکتورهای تنظیم‌کننده میوژنیک تنظیم می‌شود. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد و نمو ماهیچه می‌تواند تاثیر مثبتی بر رشد ماهیچه بعد از تفریح و در پی آن افزایش وزن بدن را

در مراحل پایانی توسعه جنینی منابع مغذی موجود در مایع آمنیوتیک به‌وسیله جنین مورد استفاده قرار می‌گیرد و پس از هضم از طریق روده جنین قبل از خروج از تخم جذب می‌شود. تغذیه جنین با استفاده از مکمل‌های مغذی می‌تواند به تامین احتیاجات جنین در طی دوره جوجه‌کشی به‌خصوص در شرایط کمبود منابع مغذی کمک نماید (Parker et al., 2003). تمامی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد جنین از تخم‌گذاری، فراهم می‌شود. کمبود تغذیه‌ای در زمان تشکیل تخم، می‌تواند پیامدهای مهمی در جنین در حال رشد داشته باشد. بیشتر اجزای تشکیل دهنده جیره غذایی طیور از ذرت و سویا تشکیل شده است که دارای مقدار کم یا فاقد ال-کارنیتین است (Buyse et al., 2001). بنابراین، تخم‌مرغ حاوی مقدار کمی ال-کارنیتین است یا اصلاً ندارد. اگرچه بیوسنتز ال-کارنیتین در زمان رشد جنین افزایش می‌یابد، اما سطوح آن همچنان پایین‌تر از مقدار اندازه‌گیری شده در مرغ‌های بالغ است زیرا فعالیت گاما بوتیرو بتائین هیدروکسیلاز (که آنزیمی حیاتی در کاتالیز گاما بوتیرو بتائین به ال-کارنیتین است)، کم است. به همین دلیل، جنین جوجه ممکن است ظرفیت محدودی برای سنتز زیستی ال-کارنیتین طی انکوباسیون داشته باشد (Rebouche, 1992). به دلیل ظرفیت محدود جوجه‌های جوان برای سنتز ال-کارنیتین، افزودن ال-کارنیتین ممکن است اثرات سودمندی برای جوجه داشته باشد (Leibetseder, 1995). ژای و همکاران (Zhai et al., 2008)، ال-کارنیتین را به عنوان ترکیب بالقوه برای بهبود قابلیت جوجه درآوری و عملکرد رشد در مرغ‌های تخمگذار بیان کردند. در این تحقیق تزریق ال-کارنیتین موجب افزایش درصد جوجه درآوری شد. مطابق با نتایج این آزمایش، محققین بیان کردند (Keralapurath et al., 2010b) اگرچه، تزریق درون تخم‌مرغی بر عملکرد رشد و بازده کشتار در جوجه‌های گوشتی تاثیری نداشت، اما ال-کارنیتین طول انکوباسیون و قابلیت هج را در جوجه‌های گوشتی افزایش داد. غلظت بالای ال-کارنیتین ممکن است موجب تحریک متابولیسم جنینی، افزایش استفاده از چربی زرده و به همین ترتیب افزایش محتوای آب درون تخم‌مرغ شود (Keralapurath et al., 2010a). اثر مثبت ال-کارنیتین بر قابلیت جوجه درآوری را می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داد. بافت جنین جوجه حاوی سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر است. اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر به پراکسیداسیون لیپیدهای ناشی از رادیکال‌های آزاد بسیار حساس است که توسط میتوکندری به علت میزان متابولیسم بالا در جنین‌های با رشد سریع تولید می‌شود. استرس اکسیداتیو تولید رادیکال‌های آزاد را با افزایش نشت الکترونی از سیستم انتقال الکترونی میتوکندری، تحریک می‌کند. تولید بیش از حد رادیکال آزاد منجر به نقص در محیط سلولی می‌شود و متابولیسم در جنین را مختل می‌کند (Agarwal et al., 2005). ال-کارنیتین به عنوان آنتی‌اکسیدان رادیکال‌های آزاد را به دام می‌اندازد و مکمل آن در جیره طیور غلظت ال-کارنیتین را در زرده تخم مرغ افزایش می‌دهد و متابولیسم لیپید زرده جنین را بهبود می‌بخشد (Rabie et al., 2015). بنابراین، وجود ال-کارنیتین در تخم بارور ممکن است

بررسی مکانیسم اثر بتائین بر رشد ماهیچه سطوح بیان ژن‌های تنظیم کننده میوژنیک اندازه‌گیری شد. MyoD برای تکثیر میوبلاست ضروری است. افزایش بازده ماهیچه ران ممکن است به دلیل افزایش بیان نسبی ژن‌های میوژنیک در جوجه یکروزه باشد. نتایج مشابه در پژوهش سنسی و همکاران (Senesi et al., 2013) نشان داد بتائین می‌تواند تشکیل نئومیوتوب‌ها را با افزایش پروتئین MyoD در مرحله تکثیر سلولی و افزایش MyF5 و MyoG در مرحله تمایز سلولی در موش افزایش دهد. در این آزمایش، تأثیر مثبت تزریق ترکیب ال-کارنیتین و بتائین بر کاهش تری‌گلیسرید و کلسترول سرم خون در جوجه‌ها مشاهده شده است. پارامترهای بیوشیمیایی سرم متابولیسم تغذیه‌ای و وضعیت سلامتی حیوان را نشان می‌دهد. بتائین تجمع لیپید کبدی را از طریق اکسیداسیون اسیدهای چرب، با فعال کردن بیان ژن‌های PPAR α و CPT1 α ، کاهش می‌دهد (Zhan et al., 2006). ال-کارنیتین با کاهش فعالیت لیپوپروتئین لیپاز موجب کاهش غلظت چربی می‌شود. پاسخ جنین به تغذیه جنینی در دوره جنینی تحت تأثیر عواملی نظیر دز تزریقی، گونه، سن و ترکیب جیره گله مادر و زمان تزریق می‌تواند متفاوت باشد. شاید کاهش معنی‌دار غلظت تری‌گلیسرید و کلسترول در این گروه را ترکیب دو دز ال-کارنیتین و بتائین و بازده مثبت آن دانست. ماهیچه اسکلتی ۳۵-۴۵٪ از وزن لاشه را تشکیل می‌دهد، بتائین و ال-کارنیتین می‌تواند ترشح IGF-1 را تحریک کرده و در نتیجه بیان ژن‌های تنظیمی ماهیچه را افزایش داده و در پی آن تکثیر و بلوغ سلول‌های ماهوارهای را در مرحله جنینی بهبود دهد. تغذیه درون تخم مرغی ال-کارنیتین و بتائین می‌تواند بر پارامترهای تولیدی از جمله افزایش اندازه ماهیچه در زمان تفریح اثر مثبت داشته باشد. اثر مثبت افزایش درصد ماهیچه و بیان ژن‌های میوژنیک در تزریق ترکیب ال-کارنیتین و بتائین نیز مشاهده شد. با توجه به افزایش بیان نسبی ژن‌ها در گروه تزریق ال-کارنیتین به همراه بتائین می‌توان احتمال داد ال-کارنیتین و بتائین در راستای همدیگر موجب افزایش بیان ژن IGF-1 و ژن‌های MyoD و MyF5 در بافت ماهیچه‌ای و تمایز فیبرهای ماهیچه‌ای اسکلتی و افزایش اندازه میوتوب شود، در نتیجه عملکرد رشد و بازده ماهیچه را در جوجه‌های گوشتی بهبود بخشد. براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان بیان نمود که تزریق ال-کارنیتین و بتائین به داخل تخم مرغ‌های نطفه‌دار به عنوان مکمل تغذیه‌ای تأثیر مثبتی بر عملکرد رشد دارد و در پی آن سبب بهبود بازده ماهیچه‌ای در جوجه‌های گوشتی می‌شود.

موجب شود. غلامی و همکاران (Gholami et al., 2015) گزارش کردند تزریق بتائین وزن تفریح جوجه‌ها را بهبود بخشید. بهبود وزن تفریح جوجه‌ها ممکن است به دلیل خاصیت اسمزی بتائین باشد که موجب حفظ آب سلولی می‌شود (Attia et al., 2005) و تبخیر آب از تخم مرغ را کاهش می‌دهد. در این تحقیق تزریق بتائین نیز موجب افزایش درصد بافت ماهیچه سینه و ران نسبت به گروه شاهد شد. مطابق با این تحقیق، هو و همکاران (Hu et al., 2015) گزارش کردند تزریق بتائین وزن بدن را بهبود بخشید، درحالی‌که هو و همکاران (Hu et al., 2017) بیان کردند تزریق بتائین وزن بدن را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). افزایش وزن بدن بعد تفریح ممکن است سبب بهبود عملکرد بدن جنین جوجه در هنگام تزریق بتائین شود (Gholami et al., 2015). علاوه بر این، بتائین توانایی پیشگیری از دهیدراته شدن (Metzler-Zebeli et al., 2009) و حفظ آب سلولی را بوسیله فعالیت حفاظتی اسمولیتیکی برعهده دارد (Senesi et al., 2013). همچنین بتائین در واکنش‌های متیلاسیون شرکت کرده و از متیلاسیون متیونین به محصولات متابولیکی مضر جلوگیری می‌کند. از فعالیت دیگر بتائین می‌توان تبدیل هموسیستئین به متیونین اشاره کرد که از تجمع مقادیر سمی هموسیستئین پیشگیری می‌کند (Metzler-Zebeli et al., 2009; Maddahian et al., 2017). بتائین ممکن است مسیر سیگنال IGF-1 را در ماهیچه‌ای جوجه‌ها فعال کند. بیان شده است مسیر سیگنالی IGF-1 می‌تواند به عنوان واسطه ذاتی در حالت اتوکراینی و پاراکراینی در ماهیچه‌ای اسکلتی عمل کند و تکثیر و تمایز سلول‌های ماهوارهای را تحریک می‌کند و افزایش بازسازی ماهیچه و تعیین سنتز پروتئین و در نهایت افزایش توده ماهیچه‌ای را برعهده دارد (Saeed et al., 2017). مطالعات قبلی نشان داده است افزودن بتائین غلظت پلاسمایی IGF-1 را در خوک و مرغ تخمگذار افزایش دهد، همچنین افزایش بیان mRNA فاکتور رشد شبه انسولینی در جگر مرغ و سلول میوبلاست در موش نیز گزارش شده است (Huang et al., 2006; Choe et al., 2010; Senesi et al., 2013). مطابق با این یافته‌ها، چن و همکاران (Chen et al., 2018)، بیان کردند افزودن بتائین بیان ژن IGF-1 را در ماهیچه سینه افزایش داد. با توجه به عملکرد رشد و بازده ماهیچه، بتائین به عنوان محرک مثبت به منظور فعال‌سازی مسیر سیگنالی IGF-1 در جهت تحریک رشد ماهیچه شناخته شده است. این نتایج نشان می‌دهد بتائین ممکن است رشد ماهیچه را از طریق افزایش سنتز پروتئین نسبت به تجزیه پروتئین، افزایش دهد. در پژوهش چن و همکاران (Chen et al., 2018)، به منظور

References

- Abd El-Azeem, N. A., Abdo, M. S., Madkour, M., and El-Wardany, I. (2014). Physiological and histological responses of broiler chicks to in ovo injection with folic acid or l-carnitine during embryogenesis. *growth*, 3, 4. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.85231>
- Abdel-Fattah, S., and Shourrap, M. (2012). Physiological effects of in ovo L carnitine and embryonic thermal conditioning on pre and posthatch development of broiler chicks. 3rd Mediterranean Poultry Summit and 6th International Poultry Conference,
- Abouzed, T., Dorghamm, D., Kahilo, K., Elkattawy, A., Nassef, E., and El-Sawy, H. (2019). Impact Of L-Carnitine Supplementation On Growth Of Broiler Chicken Through Determination Of Changes In The

- Expression Of Cat2, Myod And Myf5 Genes. *Slovenian Veterinary Research*, 56(22-Suppl). <https://doi.org/10.26873/SVR-805-2019>
- Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Apicella, J. M., Lee, E. C., Bailey, B. L., Saenz, C., Anderson, J. M., Craig, S. a. S., Kraemer, W. J., Volek, J. S., and Maresh, C. M. (2013). Betaine supplementation enhances anabolic endocrine and Akt signaling in response to acute bouts of exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 113(3), 793-802. <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2492-8>
- Araújo, I. C. S., Leandro, N. S. M., Mesquita, M. A., Café, M. B., Mello, H. H. C., and Gonzales, E. (2016). Effect of Incubator Type and Broiler Breeder Age on Hatchability and Chick Quality. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0146>
- Arslan, C. (2006). L-carnitine and its use as a feed additive in poultry feeding a review. *Revue de médecine vétérinaire*, 157(3), 134.
- Attia, Y., Hassan, R., Shehata, M., and Abd-El-Hady, S. B. (2005). Growth, carcass quality and serum constituents of slow growing chicks as affected by betaine addition to diets containing 2. Different levels of methionine. *Int. J. Poult. Sci*, 4(11), 856-865. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.856.865>
- Buyse, J., Janssens, G., and Decuyper, E. (2001). The effects of dietary L-carnitine supplementation on the performance, organ weights and circulating hormone and metabolite concentrations of broiler chickens reared under a normal or low temperature schedule. *British Poultry Science*, 42(2), 230-241. <https://doi.org/10.1080/00071660120048492>
- Chen, R., Zhuang, S., Chen, Y., Cheng, Y., Wen, C., and Zhou, Y. (2018). Betaine improves the growth performance and muscle growth of partridge shank broiler chickens via altering myogenic gene expression and insulin-like growth factor-1 signaling pathway. *Poultry science*, 97(12), 4297-4305. <https://doi.org/10.3382/ps/pey303>
- Choe, H., Li, H., Park, J., Kang, C., and Ryu, K. S. (2010). Effects of dietary betaine on the secretion of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 and-3 in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), 379-384. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.70653>
- Ebrahimi, M., Janmohammadi, H., Kia, H. D., Moghaddam, G., Rajabi, Z., Rafat, S. A., and Javanmard, A. (2017). The effect of L-lysine in ovo feeding on body weight characteristics and small intestine morphology in a day-old Ross broiler chicks. *Revue de médecine vétérinaire*, 168(4-6), 116-124.
- Eklund, M., Bauer, E., Wamatu, J., and Mosenthin, R. (2005). Potential nutritional and physiological functions of betaine in livestock. *Nutrition research reviews*, 18(1), 31-48. <https://doi.org/10.1079/nrr200493>
- Gholami, J., Qotbi, A. A., Seidavi, A., Meluzzi, A., Tavaniello, S., and Maiorano, G. (2015). Effects of in ovo administration of betaine and choline on hatchability results, growth and carcass characteristics and immune response of broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, 14(2), 3694. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3694>
- Ghonim, A. I. (2016). Effect Of In-Ovo Injection With L-Carnitine On Hatchability And Posthatching Performance Of Growing Ducklings Under Summer Conditions In Egypt. *Egyptian Poultry Science Journal*, 36(3), 695-709. <https://dx.doi.org/10.21608/epsj.2016.168801>
- Hu, Y., Sun, Q., Li, X., Wang, M., Cai, D., Li, X., and Zhao, R. (2015). In Ovo injection of betaine affects hepatic cholesterol metabolism through epigenetic gene regulation in newly hatched chicks. *PLoS one*, 10(4), e0122643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122643>
- Hu, Y., Sun, Q., Liu, J., Jia, Y., Cai, D., Idriss, A. A., Omer, N. A., and Zhao, R. (2017). In ovo injection of betaine alleviates corticosterone-induced fatty liver in chickens through epigenetic modifications. *Scientific reports*, 7(1), 40251. <https://doi.org/10.1038/srep40251>
- Huang, Q.-C., Xu, Z.-R., Han, X.-Y., and Li, W.-F. (2006). Changes in hormones, growth factor and lipid metabolism in finishing pigs fed betaine. *Livestock Science*, 105(1-3), 78-85. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.livsci.2006.04.031>
- Keralapurath, M., Corzo, A., Pulikanti, R., Zhai, W., and Peebles, E. (2010a). Effects of in ovo injection of L-carnitine on hatchability and subsequent broiler performance and slaughter yield. *Poultry science*, 89(7), 1497-1501. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00551>
- Keralapurath, M., Keirs, R., Corzo, A., Bennett, L., Pulikanti, R., and Peebles, E. (2010b). Effects of in ovo injection of l-carnitine on subsequent broiler chick tissue nutrient profiles. *Poultry science*, 89(2), 335-341. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00333>
- Leibetseder, J. (1995). Studies of L-Carnitine effects in poultry. *Archiv für Tierernährung*, 48(1-2), 97-108. <https://doi.org/10.1080/17450399509381832>
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maddahian, A., Morovat, M., Dadvar, P., and Bafti, M. S. (2017). Effect of feed restriction with or without betaine supplementation on immune response, blood cation-anion balance, body temperature and bone characteristics of broiler chickens under heat stress. *Journal of Livestock Science*, 8, 179-186.

- Metzler-Zebeli, B., Eklund, M., and Mosenthin, R. (2009). Impact of osmoregulatory and methyl donor functions of betaine on intestinal health and performance in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 65(3), 419-442. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000300>
- Moradi, H., Mohammadi, S. C. A., Sharifi, S. D., Hosseinzadeh, S., Seyed, J. E., and Salehi, A. (2021). Ursolic Acid Improve Skeletal Muscle Hypertrophy by Increasing of PAX7, Myod and Myogenin Expression and Satellite Cells Proliferation in Native Broiler Chickens. *Research on Animal Production* 11(30), 11-19. (In Persian)
- Parker, M. H., Seale, P., and Rudnicki, M. A. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 497-507. <https://doi.org/10.1038/nrg1109>
- Rabie, M., Ismail, F., and Ahmed, A. (2015). Effect of in ovo injection of L-carnitine at different incubational ages on egg hatchability in broiler breeders and post-hatch performance. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 10, 875-884. <https://doi.org/10.3923/ajava.2015.875.884>
- Rebouche, C. J. (1992). Carnitine function and requirements during the life cycle. *The FASEB Journal*, 6(15), 3379-3386. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.15.1464372>
- Rezaeian, Y., Ansari Pirsaraei, Z., Biparva, P., and Deldar, H. (2022). Effect of in Ovo Injection of Optimized Nano-Scale Zero-Valent Iron on Embryonic Growth and Quality of Broiler Chicks (ROSS 308 Strains). *Research On Animal Production*, 13(36), 96-103. (In Persian)
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*, 3(11), 1009-1013. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1009>
- Saeed, M., Babazadeh, D., Naveed, M., Arain, M. A., Hassan, F. U., and Chao, S. (2017). Reconsidering betaine as a natural anti-heat stress agent in poultry industry: a review. *Tropical animal health and production*, 49, 1329-1338. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1355-z>
- SAS, User Guide. (2007). SAS Inst. Inc., Cary, NC. *Version 9.1 ed.*
- Senesi, P., Luzi, L., Montesano, A., Mazzocchi, N., and Terruzzi, I. (2013). Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation. *Journal of translational medicine*, 11(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-174>
- Shafey, T., Al-Batshan, H., Al-Owaimer, A., and Al-Samawei, K. (2010). Effects of in ovo administration of L-carnitine on hatchability performance, glycogen status and insulin-like growth factor-1 of broiler chickens. *British Poultry Science*, 51(1), 122-131. <https://doi.org/10.1080/00071660903271190>
- Velleman, S. (2007). Muscle development in the embryo and hatchling. *Poultry science*, 86(5), 1050-1054. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1050>
- Xu, Z., Wang, M., Mao, H., Zhan, X., and Hu, C. (2003). Effects of L-carnitine on growth performance, carcass composition, and metabolism of lipids in male broilers. *Poultry science*, 82(3), 408-413. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.408>
- Zhai, W., Neuman, S., Latour, M., and Hester, P. (2008). The effect of in ovo injection of L-carnitine on hatchability of white leghorns. *Poultry science*, 87(3), 569-572. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00348>
- Zhan, X., Li, J., Xu, Z., and Zhao, R. (2006). Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *British Poultry Science*, 47(5), 576-580. <https://doi.org/10.1080/00071660600963438>