

تأثیر تغذیه درون تخم مرغی بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات و دکستروزین و محرومیت آب و خوراک پس از تفریح بر ذخایر گلیکوژن بدن و ریخت‌شناسی میان روده جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی با استفاده از روش رویه پاسخ

معین قناعت‌پرست رشتی^۱، مجید متقی‌طلب^{۲*} و حامد احمدی^۳

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۵)

چکیده

پاسخ جوجه‌های گوشتی به تغذیه درون تخم مرغی بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات (HMB) و دکستروزین و زمان دسترسی به نخستین خوراک با استفاده از طرح باکس- بنکن و روش رویه پاسخ ارزیابی شد. در روز ۱۸ دوره جوجه‌کشی، ۱۵۰۰ عدد تخم مرغ قابل جوجه‌کشی سویه راس ۳۰۸ به‌طور تصادفی به تیمارهای آزمایشی به‌دست‌آمده از طرح باکس- بنکن، هرکدام شامل چهار تکرار، سه سطح تغذیه درون تخم مرغی HMB (۰، ۰/۵ و ۱ درصد) و دکستروزین (۰، ۲۰ و ۴۰ درصد)، و سه سطح زمان دسترسی به نخستین خوراک (۶، ۲۷ و ۴۸ ساعت) اختصاص داده شدند. تغذیه درون تخم مرغی دکستروزین منجر به کاهش معنی‌دار قابلیت جوجه درآوری شد ($P < 0.05$)، درحالی‌که تغذیه درون تخم مرغی HMB تأثیر معنی‌داری بر قابلیت جوجه درآوری نداشت ($P > 0.05$). در مدل‌های شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده (ژژنوم) و میزان گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی، اجزاء خطی بیشترین (۰/۶۱ تا ۰/۷۹) مشارکت را برای توضیح وجود واریانس در پاسخ جوجه‌های گوشتی داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد، دستیابی به بالاترین شاخص کارایی تولید اروپایی در سن هفت‌روزگی با تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکستروزین (به ترتیب میزان ۰/۵۴ و ۳۹/۰۳ درصد) در مایع آمنیونی تا بیشینه ۲۰/۷۹ ساعت گرسنگی پس از تفریح میسر است.

واژه‌های کلیدی: جوجه درآوری، روش رویه پاسخ، ریخت‌شناسی، شاخص کارایی، مایع آمنیونی.

Effect of *in-ovo* feeding of beta-hydroxy beta-methylbutyrate and dextrin and posthatching water and feed deprivation on body glycogen resources and jejunal morphology of broilers at 7 days of age using response surface methodology

Moein Ghanaatparast-Rashti¹, Majid Mottaghtalab^{2*} and Hamed Ahmadi³

1, 2. Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, PO Box 41635-1314, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture Science, Tarbiat Modares University, PO Box 14115-336, Tehran, Iran

(Received: Jun. 28, 2017 - Accepted: Aug. 27, 2017)

ABSTRACT

This research was conducted to evaluate broiler response to *in-ovo* feeding of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB) and dextrin and the timing of the first feed deprivation using Box-Behnken design and response surface methodology. On day 18 of incubation, 1500 fertile eggs from Ross 308 strain were randomly assigned to experimental treatments of Box-Behnken design, each with 4 replicates, as 3 levels *in-ovo* injection of HMB (0, 0.5 and 1 %) and dextrin (0, 20 and 40 %), and 3 levels of the first water and feed restriction time (6, 27 and 48 hours). The *in-ovo* injection of dextrin led to significant lower hatchability ($P < 0.05$), whereas *in-ovo* injection of HMB had no significant effect on hatchability ($P > 0.05$). In European efficiency factor models, the jejunal villi surface area and glycogen contents of liver and breast muscle at 7 days of age, the linear components showed highest contribution (0.61 to 0.79) of variation in chick responses. The results of this research showed that maximum European efficiency factor at 7 days of age can be achieved by *in-ovo* administration of HMB and dextrin (0.54 and 39.03 percent, respectively) in amnion fluid till maximum 20.79 hours feed deprivation after hatch.

Keywords: Amnion fluid, efficiency factor, histomorphometry, response surface methodology.

* Corresponding author E-mail: m_mottaghi@gstp.ir

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه صنعت پرورش طیور، هنوز دستیابی به همه ظرفیت‌های این صنعت نیاز به بررسی بیشتر دارد (Hamadani et al., 2013). امروزه، دوره رشد جنین همراه با هفته نخست پس از تفریح در جوجه‌های گوشتی نسبت بزرگی (۴۵ درصد) از کل دوره زندگی آن‌ها را تشکیل می‌دهد (Noy & Uni, 2010). در شرایط تجاری صنعت پرورش طیور و شیوه‌های تغذیه‌ای استاندارد رایج، اغلب جوجه‌های تفریح‌شده به مدت ۴۸ ساعت یا بیشتر به خوراک و آب دسترسی ندارند (Decuypere & Janssens, 2004; Juul-Madsen et al., 2004). نزدیک به ۲ تا ۵ درصد جوجه‌های از تخم خارج‌شده در زمان بحرانی پس از تفریح به دلیل محدود بودن ذخایر بدنی تلف‌شده و بسیاری از جوجه‌های باقیمانده رشد کم و بازده پایین مصرف خوراک را نشان می‌دهند (Uni & Ferket, 2004; Willemsen et al., 2010). در حالی که وجود مواد مغذی در دستگاه گوارش طیور می‌تواند رشد پرزهای روده را تحریک کند (Moran, 1985). محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، ارتفاع پرزهای روده کوچک در پرندگانی که به مدت ۲۴ ساعت پس از تفریح به آب و خوراک دسترسی نداشتند، کاهش یافت (Yamauchi et al., 1996). همچنین دسترسی نداشتن به آب و خوراک بی‌درنگ پس از تفریح تأثیر منفی بر ریخت‌شناسی روده دارد (Maiorka et al., 2003). نتایج برخی تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که تأخیر در دسترسی به خوراک منجر به کاهش میزان گلیکوژن کبد و ماهیچه سینه طیور می‌شود (Wang et al., 2014). جوجه با کیفیت خوب به‌عنوان رابطی با اهمیت بین مؤسسه جوجه‌کشی و مزرعه پرورش طیور به شمار می‌آید (Decuypere & Bruggeman, 2007).

ارزیابی چگونگی و میزان تأثیر مواد مغذی بر پاسخ جوجه‌ها، به نوع آزمایش طراحی‌شده و روش‌های ریاضی- آماری مورد استفاده بستگی دارد. در آزمایش‌های تغذیه درون تخم مرغی^۱ که توسط

محققان انجام شده‌اند، به‌طور معمول یک ماده منفرد بررسی و دیگر عامل‌های ثابت در نظر گرفته شده‌اند و از نتایج به‌دست‌آمده توسط آزمایش‌های پیشین برای تهیه ترکیب مناسب استفاده شده است. در واقع در چنین آزمایش‌های تغذیه‌ای، برهمکنش عامل‌های مورد بررسی در نظر گرفته نمی‌شود. لذا طراحی آزمایش‌هایی با استفاده از شیوه‌های نوین ریاضی- آماری به‌منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش و دستیابی به نتایج دقیق‌تر سودمند خواهد بود (Ahmadi & Golian, 2010). روش رویه پاسخ^۲ شامل مجموعه‌ای از روش‌های آماری و ریاضی است که در طراحی آزمایش‌ها، ساخت مدل، تجزیه داده‌ها، ارزیابی تأثیر متغیرهای مؤثر ورودی و یافتن شرایط بهینه بر پایه ورودی‌ها کاربرد دارند (Box et al., 1978). این روش مبتنی بر نوع خاصی از طراحی آزمایش است که در آن اثرگذاری‌های چندین عامل مؤثر بر یک یا چند خروجی بررسی شده و داده‌های به‌دست‌آمده از طراحی آزمایش بر یک مدل چندجمله‌ای توان دوم برازش می‌شود (Ahmadi & Golian, 2011). اگر نیاز به بررسی چندین عامل به‌طور همزمان باشد، روش رویه پاسخ مدلی مناسب است، چون شامل مجموعه‌ای سودمند از شیوه‌های آماری و ریاضی برای بررسی پاسخ‌های به‌دست‌آمده از ترکیب عامل‌ها برای یافتن راه‌حل‌های کارآمد (Myers & Montgomery, 2009)، بهینه کردن اثر متقابل بین عامل‌ها و سطوح آن‌ها و نیز کاهش هزینه‌های تحقیق است (Hu, 1999). طرح باکس- بنکن^۳ طرحی چند متغیره است که در آن چندین عامل به‌صورت همزمان بررسی می‌شود (De Leon et al., 2010). این طرح به‌عنوان طرحی با کارایی بالاتر نسبت به آزمایش‌های فاکتوریل کامل به شمار می‌آید زیرا به‌طور شایان توجهی به شمار تیمارهای کمتر نیاز داشته و به محققان اجازه برآورد و بهینه‌سازی فرآیند را می‌دهد (Liu et al., 2016). در این تحقیق از سه متغیر و سه سطح از هر کدام استفاده شد. در شرایطی که آزمایش فاکتوریل کامل نیازمند ۲۷ تیمار است، طرح باکس- بنکن تنها با ۱۵ تیمار

2. Response surface methodology
3. Box-Behnken design

1. In-ovo feeding

شدند و آنهایی که در ۱۰ درصد وزن میانگین قرار داشتند (۳/۱±۶۶/۴ گرم) به صورت تصادفی به ۶۰ گروه با توزیع وزن همسان تقسیم شدند. سپس تخم‌مرغ‌ها در دستگاه تخم‌گیر (Petersime, Zulte, Belgium) با دمای ۳۷/۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۶ درصد قرار گرفتند (Vieira et al., 2005). در روز ۱۵ دوره جوجه‌کشی، همه تخم‌مرغ‌ها نوربینی شده تا تخم‌مرغ‌های ترک‌دار، بدون نطفه یا حاوی جنین مرده، مشخص و حذف شوند (Kornasio et al., 2011). در روز ۱۸ دوره جوجه‌کشی، ۱۵۰۰ عدد تخم‌مرغ حاوی جنین به تیمارهای آزمایشی با سه سطح تغذیه درون تخم‌مرغی HMB (۰، ۰/۵ و ۱ درصد) و دکستروزین (۰، ۲۰ و ۴۰ درصد) و نیز زمان دسترسی به نخستین خوراک (۶، ۲۷ و ۴۸ ساعت) بر پایه طرح باکس - بنکن اختصاص داده شدند. به طور خلاصه، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های سترون (استریل) حاوی HMB و دکستروزین از سوراخی روی قسمت پهن تخم‌مرغ به صورت دستی و با استفاده از سوزن شماره ۲۳ در مایع آمینونی در عمق ۱۷ میلی‌متر تزریق شد (Uni et al., 2005). میزان HMB تزریق‌شده در هر تخم معادل ۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم و برای دکستروزین معادل ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بود. سوراخ ایجادشده روی تخم‌مرغ‌ها بی‌درنگ با استفاده از چسب مایع تجاری پر شد (Vega et al., 2014). آنگاه تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌گیر منتقل و در شرایط استاندارد تجاری (دمای ۳۶/۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد) قرار گرفتند (Vieira et al., 2005).

درصد قابلیت جوجه درآوری بر پایه شمار جوجه‌های خارج‌شده از تخم‌های بارور محاسبه شد. از جوجه‌های خارج‌شده در هر تکرار، ۱۴ جوجه (۷ نر و ۷ ماده) به صورت تصادفی انتخاب، توزین و به مرغداری تجاری منتقل شدند. سپس بر پایه زمان اولیه تغذیه پیش‌بینی‌شده بر پایه تیمارها، آب و خوراک در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جوجه‌ها در ۶۰ پن (به ابعاد ۱۴۰ × ۶۶ سانتی‌متر) به مدت هفت روز پرورش یافتند. هر پن به یک دانخوری سطلی با ظرفیت ۱۵ کیلوگرم و دو آبخوری پستانکی مجهز بود.

قابل انجام است. هدف از این تحقیق استفاده از طرح باکس- بنکن برای بررسی تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی بتا- هیدروکسی بتا- متیل‌بوتیرات^۱ (HMB) و دکستروزین و زمان دسترسی به نخستین خوراک و بهینه‌سازی این متغیرها با استفاده از روش رویه پاسخ برای دستیابی به بهترین پاسخ جوجه‌های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

برای بررسی و ارزیابی تأثیر تغذیه درون تخم‌مرغی بتا- هیدروکسی بتا- متیل‌بوتیرات و دکستروزین و زمان دسترسی به نخستین خوراک بر رشد جوجه‌های گوشتی تا سن هفت‌روزگی از طرح باکس- بنکن با ۱۵ تیمار آزمایشی شامل سه عامل و سه سطح در هر عامل استفاده شد. این طرح فاکتوریل ناقص از ۱۲ نقطه فاکتوریل و سه نقطه مرکزی با چهار تکرار برای همه گروه‌ها تشکیل شده است (Box et al., 1978). طرح باکس- بنکن، طرحی درجه دوم بر پایه طرح فاکتوریل ناقص با سه سطح است که حاوی نقطه مرکزی و نقاط میانی از گوشه‌های یک مکعب فرضی است. این نوع طرح می‌تواند به عنوان سه طرح فاکتوریل ۲^۲ پیوسته به همراه یک نقطه مرکزی به شمار آید. شمار آزمایش‌های مورد نیاز برای گسترش طرح باکس - بنکن با رابطه $N = 2k(k - 1) + C_0$ قابل محاسبه است. در این رابطه، k شمار متغیرها و C_0 شمار نقاط مرکزی است (Ferreira et al., 2007). نقطه مرکزی به طور معمول سه تا پنج بار تکرار می‌شود زیرا درجه آزادی مدل را تعیین کرده (Myers & Montgomery, 2009) و نیز به عنوان نقطه مرجع در منطقه مورد آزمایش عمل می‌کند (De Leon et al., 2010).

در این آزمایش، ۱۸۰۰ عدد تخم‌مرغ بارور قابل جوجه‌کشی از یک گله مرغ مادر گوشتی تجاری (سویه راس ۳۰۸) با سن ۶۵ هفته تهیه و پیش از آغاز دوره جوجه‌کشی به مدت دو روز در شرایط تجاری ذخیره شدند (Oliveira et al., 2015). تخم‌مرغ‌ها وزن

1. Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

بین رفته‌ها به صورت روزانه توزین و ثبت شدند. داده‌های گردآوری شده مربوط به افزایش وزن و میانگین خوراک مصرفی برای محاسبه ضریب تبدیل خوراک استفاده شدند. شاخص کارایی تولید اروپایی از سن ۱ تا هفت روزگی با استفاده از مدل ۱ محاسبه شد (Huff *et al.*, 2013):

$$\text{مدل ۱):} = \text{شاخص کارایی تولید اروپایی} \\ \text{وزن بدن (کیلوگرم)} \times \text{درصد ماندگاری} \times 100 / \text{ضریب تبدیل} \times \text{مدت آزمایش (روز)}$$

در سن هفت روزگی، دو پرنده از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب، توزین و کشتار شدند (Farouk *et al.*, 2014). سپس کبد و ماهیچه سینه هر جوجه جدا، توزین و تا هنگام انجام آزمایش تعیین گلیکوژن در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، از روده کوچک هر جوجه نمونه‌های میان روده ۳ سانتی متر جدا شد و پس از شستشو با محلول نرمال سالین (pH=۷/۲)، در محلول خنثی (۷/۴ تا pH=۷/۲) بافر ۱۰ درصد فرمالدئید قرار گرفتند.

طی هفت روز اول جوجه‌ها در دمای ۳۳ درجه سلسیوس پرورش یافتند. نوردهی ۲۴ ساعته در مدت دو روز اول استفاده و پس از آن ۲۳ ساعت نور و یک ساعت تاریکی تا سن هفت روزگی استفاده شد. شدت نور در دو روز اول، ۲۰ لوکس بود و سپس تا پایان دوره پرورش شدت نور ۵ لوکس استفاده شد. دسترسی به خوراک و آب تازه در دوره آزمایش به صورت آزاد بود. جیره آغازین بر پایه ذرت و کنجاله سویا بر پایه توصیه راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸ (Ross Broilers Manual, 2014) تنظیم (جدول ۱) و تا هفت روزگی به صورت کرامبل استفاده شد. پس از انجام آزمایش بر پایه طرح باکس - بنکن، مجموعه داده‌های به دست آمده بر پایه داده‌های ورودی (تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکستروزین و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح) و خروجی (شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده (ژژنوم) و میزان گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت روزگی) تجزیه آماری شدند. وزن بدن و میزان خوراک مصرفی در سن هفت روزگی و از

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره آزمایشی

Table 1. Ingredients and nutrients composition of experimental diet

Ingredients (g/kg, as fed basis)	Starter	Calculated analysis***	
Corn	513.50	Metabolisable Energy, kcal/kg	2850
Wheat	50.00	Crude Protein, g/kg	219.19
Soybean Meal, 44% CP	372.71	Digestible Lysine, g/kg	12.77
Soybean Oil	17.68	Digestible Methionine, g/kg	6.02
Dicalcium Phosphate	20.41	Digestible Methionine+Cystine, g/kg	9.03
Calcium Carbonate	9.40	Digestible Threonine, g/kg	8.17
Common Salt	2.06	Calcium, g/kg	9.12
L-Lysine HCl, 78%	3.24	Available Phosphorus, g/kg	4.80
DL-Methionine, 99%	3.08	Sodium, g/kg	1.52
L-Threonine, 98%	1.03	Potassium, g/kg	9.30
Vitamin Premix *	2.50	Chloride, g/kg	2.30
Mineral Premix **	2.50	Labaratory analysis ****	
Sodium Bicarbonate	1.89	Dry Matter, g/kg	884.2
		Gross Energy, kcal/kg	4166
Total	1000	Crude protein (Nitrogen × 6.25), g/kg	216.40

* هر کیلوگرم پیش مخلوط ویتامینی مورد استفاده میزان ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۵۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۴۵ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳ میلی‌گرم ویتامین K₃، ۳ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۹ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۳۰ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۴ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۲ میلی‌گرم ویتامین B₉، ۰/۲ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۰/۱ میلی‌گرم ویتامین H و ۱۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید را به ازای هر کیلوگرم جیره تأمین می‌کرد.

** هر کیلوگرم مکمل کانی مورد استفاده میزان ۵۵ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۶ میلی‌گرم مس، ۱/۳ میلی‌گرم ید و ۰/۳ میلی‌گرم سلنیوم را به ازای هر کیلوگرم جیره تأمین می‌کرد.

*** محاسبات بر پایه جداول ترکیب‌های مواد خوراکی NRC (۱۹۹۴) انجام شده است.

**** مقادیر بر پایه تجزیه سه نمونه از جیره است.

* Vitamin premix provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 10000 IU; vitamin D₃, 5000 IU; vitamin E, 45 IU; vitamin K₃, 3 mg; vitamin B₁, 3 mg; vitamin B₂, 9 mg; vitamin B₃, 10 mg; vitamin B₅, 30 mg; vitamin B₆, 4 mg; vitamin B₉, 2 mg; vitamin B₁₂, 0.02 mg; vitamin H, 0.1 mg and choline chloride, 1000 mg.

** Mineral premix provided the following per kilogram of diet: iron, 55 mg; manganese, 120 mg; zinc, 100 mg; copper, 16 mg; iodine, 1.3 mg and selenium, 0.3 mg.

*** Calculated nutrient contents was based on ingredient composition data from NRC (1994).

**** Values based on analysis of triplicate samples of diet.

پرزها برای قسمت بالا و پایین پرز اندازه‌گیری شد. مساحت پرزها با استفاده از رابطه $(\pi r^2) \times$ (عرض پرز \times طول پرز محاسبه شد (Sakamoto et al., 2000). میانگین به‌دست‌آمده از ده پرز برای هر برش به‌عنوان عدد میانگین برای تجزیه‌های بعدی استفاده شد (Sakamoto et al., 2000).

تجزیه آماری

تأثیر اصلی تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکسترین و اثر متقابل این عامل‌ها بر داده‌های به‌دست‌آمده از درصد قابلیت جوجه درآوری و وزن در روز تفریح با استفاده از میانگین حداقل مربعات رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۳ (SAS Institute, 2011) به‌صورت آزمایش فاکتوریل 2×2 در قالب طرح کامل تصادفی برای مدل ۲ تجزیه شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۵ درصد انجام شد.

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + D_j + (HD)_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{مدل } 2)$$

در مدل ۲، Y_{ijk} میزان هر مشاهده، μ میانگین کل، H_i اثر سطوح تغذیه درون تخم‌مرغی HMB، D_j اثر سطوح تغذیه درون تخم‌مرغی دکسترین، $(HD)_{ij}$ اثر متقابل تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکسترین و e_{ijk} اثر خطای آزمایشی است. رابطه پایه مورد استفاده در روش رویه پاسخ برای صفات مورد بررسی در سن هفت‌روزگی، مدل استاندارد و رایج چندجمله‌ای توان دوم و به شکل مدل ۳ بود (Box et al., 1978):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i,j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{مدل } 3)$$

در مدل ۳، y پاسخ مورد بررسی یا خروجی مدل (شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرز میان روده، میزان گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی)، k شمار متغیرهای ورودی ($k=3$)، x_i و x_j متغیرهای ورودی، β_0 عرض از مبدأ یا ضریب ثابت، β_i ضریب خطی بر متغیر مورد بررسی، β_{ij} ضریب اثر متقابل بر متغیرهای مورد بررسی، β_{ii} ضریب توان دوم بر متغیر مورد بررسی و ε شامل میزان باقیمانده مدل است. مجموعه کل داده‌های آزمایشی که از راه انجام آزمایش بهینه‌سازی طرح باکس-بنکن به دست آمد با استفاده از

میزان گلیکوژن موجود در نمونه‌های بافت کبد و ماهیچه سینه از روش یدی تعیین شد (Dreiling et al., 1987). در آغاز عصاره‌گیری نمونه‌ها با استفاده از اسید پرکلریک ۷ درصد انجام شد. برای این منظور، میزان ۲ گرم نمونه بافت کبد یا ماهیچه سینه پس از توزین و خرد شدن با ۱۰ میلی‌لیتر اسیدپرکلریک ۷ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ تا ۴۵ ثانیه با دستگاه همگن‌ساز (هموژنایزر) یکنواخت و سپس در دور $15000 \times g$ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. لایه رویی خارج و برای اندازه‌گیری گلیکوژن بافت‌ها ذخیره شد. معرف رنگی ید با ترکیب کردن $1/3$ میلی‌لیتر از محلول حاوی $0/26$ گرم ید و $2/6$ گرم یدید پتاسیم در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اشباع‌شده کلرید کلسیم تهیه شد. میزان $2/6$ میلی‌لیتر از معرف رنگی ید به $0/4$ میلی‌لیتر از استانداردهای گلیکوژن و عصاره‌های بافت کبد و ماهیچه سینه اضافه شد. پس از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه، اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۴۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر، Biochrom, Libra S22, UK) انجام و میزان گلیکوژن بر پایه میلی‌گرم در گرم نمونه تعیین و به‌صورت میلی‌گرم در کل بافت کبد و ماهیچه سینه بیان شد.

برای بررسی و ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی روده کوچک، دو برش از هر نمونه میان روده عمود بر محور طولی روده جدا و در پارافین تثبیت شد. برش‌های عرضی به ضخامت ۳ میکرومتر با استفاده از دستگاه میکروتوم دورا (Leica Microsystems, Rijswijk, The Netherlands) تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از هماتوایلین اتوزین روی لام تثبیت شد. عکس‌هایی از نمونه‌های روی لام با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین با حسگر ۳ مگاپیکسل (BEL Photonics®, Milan, Italy) گرفته و شاخص‌های ریخت‌شناسی میان روده با استفاده از نرم‌افزار (BEL Eurisko v. 2.9 software; BEL Engineering srl, Monza, Italy) تعیین شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندازه‌گیری شده شامل طول، عرض و مساحت پرز بود. ده پرز از هر برش بررسی شد (Sakamoto et al., 2000). طول پرز از نوک پرز تا محل تقاطع پرز-کریپت اندازه‌گیری شد. عرض

هیدراتاسیون) باشد (Zhai et al., 2011c). با این حال، تفسیر نتایج پژوهش‌های پیشین در مورد قابلیت جوجه درآوری و وزن جوجه تفریخ شده تا حدودی مغایرت‌هایی دارد. در این تحقیق، تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین تأثیر معنی‌داری بر وزن جوجه‌های تفریخ شده نداشتند ($P > 0.05$). همچنین اثر متقابل معنی‌داری بین تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین بر قابلیت جوجه درآوری و وزن جوجه‌های تفریخ شده مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج این پژوهش در مغایرت با یافته‌های تحقیقی بود که در آن تغذیه درون تخم مرغی ۳۶۰ میلی گرم دکسترین، وزن جوجه‌های تفریخ شده را افزایش داد (Zhai et al., 2011b). به علاوه برخی محققان گزارش کردند، تغذیه درون تخم مرغی ۱/۵ میلی گرم HMB تأثیری بر وزن جوجه تفریخ شده بوقلمون نداشت (Foye et al., 2006).

تحقیقات در زمینه تغذیه درون تخم مرغی ترکیب HMB و دکسترین و تأثیر آن بر قابلیت جوجه درآوری و وزن جوجه‌ها در روز تفریخ محدود است و در اغلب آن‌ها مقادیر استفاده شده بسیار متفاوت هستند. با این حال، نتایج تحقیقی نشان داد، تغذیه درون تخم مرغی ۱ میلی گرم از HMB (در ترکیب با کربوهیدرات‌ها) و ۲۵ میلی گرم (به تنهایی) تأثیر معنی‌داری بر صفات یاد شده نداشت (Tako et al., 2004). برخی دیگر از محققان نیز در نتایج بررسی‌های خود تأثیر معنی‌داری بر قابلیت جوجه درآوری و وزن جوجه‌های تفریخ شده در هنگام تغذیه درون تخم مرغی ۶۰ میلی گرم دکسترین و ۲/۴ میلی گرم HMB مشاهده نکردند (Kornasio et al., 2011).

مقادیر پاسخ‌های آزمایش برای عملکرد رشد تا سن هفت‌روزگی، وضعیت ذخایر گلیکوژن بافت کبد، ماهیچه سینه و ریخت‌شناسی میان روده در سن هفت‌روزگی جوجه‌های گوشتی بر پایه نقاط طرح باکس- بنکن و آماره‌ها و داده‌ها در مورد مدل‌های رویه پاسخ به ترتیب در جدول‌های ۳ تا ۵ توصیف شده‌اند. شایستگی برازش مدل رویه پاسخ با میزان R^2 بیان شد که برای شاخص کارایی تولید اروپایی تا سن هفت‌روزگی برابر ۰/۷۶، برای مساحت پرزهای میان روده در سن هفت‌روزگی معادل ۰/۶۸، برای میزان گلیکوژن موجود در

رویه RSREG نرم‌افزار آماری SAS بر رابطه چندجمله‌ای توان دوم برازش داده شد. روش تجزیه ریدج^۱ برای محاسبه پاسخ بهینه صفات اندازه‌گیری شده استفاده شد. از جدول تجزیه واریانس به منظور رتبه‌بندی متغیرها (مواد تزریقی و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریخ) از نظر اهمیت آن‌ها بر خروجی مدل ساخته شده استفاده شد. هرکدام از اجزا (شامل اثر خطی، توان دوم و یا اثر متقابل مربوط به متغیرهای تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریخ) که t - محاسبه شده بیشتری دارند اهمیت بیشتری در خروجی مدل دارند (SAS Institute, 2011).

نتایج و بحث

تأثیر تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین بر قابلیت جوجه درآوری و وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ در جدول ۲ نشان داده شده است. تغذیه درون تخم مرغی دکسترین موجب کاهش معنی‌دار قابلیت جوجه درآوری شد ($P < 0.05$), در حالی که تغذیه درون تخم مرغی HMB تأثیر معنی‌داری بر قابلیت جوجه درآوری نداشت ($P > 0.05$). این نتیجه همسان با نتایج تحقیق‌هایی بود که گزارش کردند، تغذیه درون تخم مرغی ۳۶۰ میلی گرم دکسترین موجب کاهش قابلیت جوجه درآوری شد (Zhai et al., 2011b) ولی تغذیه درون تخم مرغی ۱/۵ میلی گرم HMB تأثیر معنی‌داری بر قابلیت جوجه درآوری نداشت (Foye et al., 2006) اما نتایج این تحقیق با یافته‌های پژوهش‌هایی مغایر بود که در آن‌ها استفاده از ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم دکسترین به صورت تغذیه درون تخم مرغی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت جوجه درآوری نداشت (Zhai et al., 2011a). نتایج تحقیقات پیشین نشان دادند، قابلیت جوجه درآوری با تغذیه درون تخم مرغی محلول‌های با میزان فعالیت اسمزی (اسمولاریته) بین ۰ تا ۲۳۲۰ میلی اسمز تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد (Zhai et al., 2011b). کاهش قابلیت جوجه درآوری در نتیجه تغذیه درون تخم مرغی دکسترین در این تحقیق می‌تواند به دلیل افزایش هیدراته شدن

پایه داده‌های خام آزمایشی برای شاخص کارایی تولید اروپایی تا سن هفت‌روزگی، مساحت پرزهای میان روده، مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی بنابر جدول‌های ۶ و ۷ بیان شده است.

بافت کبد در سن هفت‌روزگی ۰/۷۸ و برای میزان گلیکوژن ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی ۰/۸۵ بود که نشان‌دهنده این است که پاسخ‌ها می‌توانند با مدل‌های به‌دست‌آمده توصیف شوند. رابطه‌های چندجمله‌ای درجه دوم برازش شده بر

جدول ۲. تأثیر تغذیه درون تخم‌مرغی بتا-هیدروکسی بتا-متیل بوتیرات و دکستروز بر قابلیت جوجه درآوری و وزن بدن

جوجه‌های گوشتی در روز تفریح (میانگین \pm خطای معیار میانگین‌ها)

Table 2. Effect of *in-ovo* feeding of beta-hydroxy beta-methylbutyrate and dextrin on hatchability and body weight of hatched broiler chicks (mean \pm SE)

Factor	Hatchability (%)	BWH ^{**} (g)
Dextrin		
0% (n=16)	97.33 ^a \pm 1.182	44.93 \pm 0.283
20% (n=28)	87.87 ^b \pm 0.863	44.78 \pm 0.207
40% (n=16)	82.58 ^c \pm 1.182	44.71 \pm 0.283
HMB ^{***}		
0.0% (n=16)	89.41 \pm 1.182	44.82 \pm 0.283
0.5% (n=28)	88.70 \pm 0.863	45.04 \pm 0.207
1.0% (n=16)	89.67 \pm 1.182	44.55 \pm 0.283
Dextrin \times HMB		
0% \times 0.0% (n=4)	97.15 \pm 2.243	44.28 \pm 0.538
0% \times 0.5% (n=8)	96.73 \pm 1.586	45.03 \pm 0.380
0% \times 1.0% (n=4)	98.11 \pm 2.243	45.47 \pm 0.538
20% \times 0.0% (n=8)	87.37 \pm 1.586	44.85 \pm 0.380
20% \times 0.5% (n=12)	88.16 \pm 1.294	44.89 \pm 0.311
20% \times 1.0% (n=8)	88.10 \pm 1.586	44.60 \pm 0.380
40% \times 0.0% (n=4)	83.72 \pm 2.243	45.33 \pm 0.538
40% \times 0.5% (n=8)	81.22 \pm 1.586	45.20 \pm 0.380
40% \times 1.0% (n=4)	82.79 \pm 2.243	43.58 \pm 0.538
Probability		
Dextrin	0.001	0.852
HMB	0.776	0.376
Dextrin \times HMB	0.906	0.099

a-c در هر ستون میانگین‌های دارای حرف‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).

* خطای معیار میانگین‌ها

** وزن بدن جوجه‌های تفریح‌شده

*** بتا - هیدروکسی بتا - متیل بوتیرات

a-c Means within each section of each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

* Standard error of means

** Body weight of hatched chicks

*** Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

جدول ۳. نقاط طرح باکس- بنکن و مقادیر پاسخ‌های آزمایشی مربوط برای عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی از سن ۱ تا هفت‌روزگی (میانگین \pm انحراف معیار)

Table 3. Box-Behnken design points and corresponding experimental response values for growth performance of broilers from 1 to 7 days of age (mean \pm SD)

Treatment no.	No. of Replication	Input factors			Experimental responses at day 7				
		Hungry (hour)	Dextrin (%)	HMB ^{**} (%)	Body weight (g)	Average daily Feed intake (g)	Feed conversion ratio (g/g)	Mortality (%)	European efficiency factor
1	4	6	0	0.5	169.5 \pm 6.85	21.1 \pm 0.80	1.19 \pm 0.032	0.00 \pm 0.00	203.6 \pm 13.21
2	4	6	40	0.5	173.4 \pm 9.14	22.3 \pm 1.30	1.22 \pm 0.021	0.00 \pm 0.00	202.8 \pm 13.97
3	4	48	0	0.5	127.6 \pm 1.70	15.10 \pm 1.05	1.27 \pm 0.052	7.14 \pm 0.00	133.2 \pm 4.17
4	4	48	40	0.5	164.4 \pm 4.54	20.4 \pm 0.41	1.19 \pm 0.023	1.79 \pm 3.57	193.7 \pm 9.86
5	4	27	0	0	149.9 \pm 9.30	17.9 \pm 1.65	1.18 \pm 0.041	3.57 \pm 4.12	175.0 \pm 17.59
6	4	27	0	1	140.9 \pm 14.21	15.6 \pm 2.07	1.15 \pm 0.024	5.36 \pm 3.57	166.3 \pm 17.53
7	4	27	40	0	165.0 \pm 3.52	19.3 \pm 0.26	1.13 \pm 0.031	1.79 \pm 3.57	205.4 \pm 4.20
8	4	27	40	1	158.7 \pm 15.95	18.3 \pm 2.14	1.12 \pm 0.035	1.79 \pm 3.57	199.8 \pm 23.6
9	4	6	20	0	166.0 \pm 7.53	21.0 \pm 0.83	1.21 \pm 0.043	0.00 \pm 0.00	195.9 \pm 15.13
10	4	48	20	0	130.3 \pm 11.63	15.2 \pm 2.25	1.25 \pm 0.027	1.79 \pm 3.57	146.8 \pm 17.21
11	4	6	20	1	177.2 \pm 5.17	22.2 \pm 0.37	1.17 \pm 0.041	1.79 \pm 3.57	212.3 \pm 10.77
12	4	48	20	1	129.7 \pm 6.06	14.7 \pm 0.93	1.21 \pm 0.047	3.57 \pm 4.12	148.1 \pm 4.71
13	12	27	20	0.5	161.8 \pm 6.99	19.5 \pm 1.29	1.17 \pm 0.039	1.79 \pm 3.23	194.5 \pm 14.35

* Standard deviation

* انحراف معیار

**Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

*** بتا - هیدروکسی بتا - متیل بوتیرات

جدول ۴. نقاط طرح باکس- بنکن و مقادیر پاسخ‌های آزمایشی مربوط برای مقادیر گلیکوژن بافت کبد، ماهیچه سینه و فراسنجه‌های ریخت‌شناسی پرزهای میان روده جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی (میانگین \pm انحراف معیار)

Table 4. Box-Behnken design points and corresponding experimental response values for glycogen contents of liver and breast muscle and jejunal villi morphological parameters of broilers at 7 days of age (mean \pm SD*)

Treatment no.	No. of Replication	Input factors			Experimental responses at day 7				
		Hungry (hour)	Dextrin (%)	HMB** (%)	Liver glycogen (mg/total)	Breast muscle glycogen (mg/total)	Villus length (μ m)	Villus width (μ m)	Villus surface area (μ m ²)
1	4	6	0	0.5	36.66 \pm 3.160	71.05 \pm 7.124	1148 \pm 81.6	167 \pm 29.2	606013 \pm 128070.0
2	4	6	40	0.5	42.58 \pm 4.199	81.24 \pm 10.190	1286 \pm 89.6	197 \pm 18.1	794148 \pm 71535.6
3	4	48	0	0.5	20.87 \pm 3.097	18.79 \pm 6.471	827 \pm 101.8	94 \pm 17.0	242639 \pm 39501.5
4	4	48	40	0.5	28.12 \pm 4.501	41.28 \pm 8.882	1055 \pm 88.9	159 \pm 21.2	524950 \pm 78417.4
5	4	27	0	0	31.73 \pm 1.155	48.73 \pm 6.250	985 \pm 96.7	138 \pm 23.6	424080 \pm 63196.4
6	4	27	0	1	33.05 \pm 4.162	48.68 \pm 5.774	1061 \pm 88.0	154 \pm 24.5	516154 \pm 117504.2
7	4	27	40	0	35.30 \pm 2.287	60.61 \pm 9.019	1044 \pm 62.5	177 \pm 21.1	578581 \pm 69662.1
8	4	27	40	1	37.80 \pm 5.359	65.62 \pm 5.363	1173 \pm 94.0	182 \pm 23.9	671822 \pm 126233.9
9	4	6	20	0	39.16 \pm 4.034	61.99 \pm 7.339	1169 \pm 100.5	174 \pm 12.7	640880 \pm 76666.2
10	4	48	20	0	23.69 \pm 3.679	31.77 \pm 6.459	926 \pm 93.6	129 \pm 17.2	378646 \pm 76977.8
11	4	6	20	1	41.62 \pm 2.269	71.66 \pm 5.472	1280 \pm 109.7	189 \pm 26.0	763699 \pm 145309.1
12	4	48	20	1	23.34 \pm 1.078	31.63 \pm 4.896	974 \pm 90.3	133 \pm 23.5	406337 \pm 77143.6
13	12	27	20	0.5	35.33 \pm 3.487	60.97 \pm 6.008	1087 \pm 76.1	170 \pm 28.9	606013 \pm 120613.7

* Standard deviation

* انحراف معیار

**Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

** بتا - هیدروکسی بتا - متیل بوتیرات

جدول ۵. آمارها و داده‌های مربوط به مدل‌های رویه پاسخ برای شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده، مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی

Table 5. Statistics and information on response surface models for European efficiency factor, jejunal villi surface area, glycogen contents of liver and breast muscle of broilers at 7 days of age

Item	Response surface model			
	European efficiency factor	Jejunal villus surface area	Liver glycogen	Breast muscle glycogen
R ²	0.76	0.68	0.78	0.85
Root Mean Square Error	13.14	96110.73	3.34	6.83
Bias	-0.0396	-80.1322	0.0568	0.0193
Type of basis model	Full quadratic (constant, linear, interaction, and squared terms)			
Optimization algorithm	Standard least square			

$$+ (دکسترین \times 0.2357) - (گرسنگی \times 0.3454) - 199/1051 = \text{شاخص کارایی تولید اروپایی تا سن هفت‌روزگی} \\ \times (دکسترین \times 0.004) - (گرسنگی \times دکسترین \times 0.365) + (گرسنگی \times گرسنگی \times 0.250) - (HMB \times 39/9420) \\ - (دکسترین \times HMB \times 30/8767) - (دکسترین \times HMB \times 0.786) + (گرسنگی \times HMB \times 0.3620) - (دکسترین$$

$$\times (دکسترین \times 50) - (گرسنگی \times دکسترین \times 56) + (گرسنگی \times گرسنگی \times 46) - (HMB \times 202897) + (دکسترین \times HMB \times 58374) - (دکسترین \times HMB \times 29) + (گرسنگی \times HMB \times 2265) - (دکسترین$$

$$\times (0.1364) + (گرسنگی \times 0.087) - 36/3555 = \text{میزان گلیکوژن کبد در سن هفت‌روزگی (میلی‌گرم در کل کبد)} \\ \times (0.010) - (گرسنگی \times دکسترین \times 0.008) + (گرسنگی \times گرسنگی \times 0.066) - (HMB \times 4/6372) + (دکسترین \times HMB \times 1/9386) - (دکسترین \times HMB \times 0.294) + (گرسنگی \times HMB \times 0.669) - (دکسترین \times دکسترین$$

$$\times (0.1853) + (گرسنگی \times 0.1076) - 62/5806 = \text{میزان گلیکوژن سینه در سن هفت‌روزگی (میلی‌گرم در کل سینه)} \\ \times (0.015) - (گرسنگی \times دکسترین \times 0.073) + (گرسنگی \times گرسنگی \times 0.165) - (HMB \times 25/1929) + (دکسترین \times HMB \times 17/7875) - (دکسترین \times HMB \times 0.1262) + (گرسنگی \times HMB \times 0.2336) - (دکسترین \times دکسترین$$

جدول ۶. شاخص‌های برآوردشده در مدل‌های چندجمله‌ای توان دوم به روش رویه پاسخ برای شاخص کارایی تولید اروپایی و مساحت پرزهای میان روده جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی

Table 6. Estimated parameters of second-order response surface models for European efficiency factor and jejunal villi surface area of broilers at 7 days of age

Quadratic model Term	European efficiency factor model				Jejunal villus surface area model					
	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data	Estimated parameter from raw data	SE	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data
Intercept	199.1051	10.46	19.04	<0.0001	194.52	575750	51554	11.17	<0.0001	582298
Hungry	-0.3454	0.53	-0.65	0.5198	-24.10	-4955	2627	-1.89	0.0419	-156521
Dextrin	-0.2357	0.49	-0.48	0.6343	15.45	5355	2428	2.21	0.0295	97577
HMB**	39.9420	19.70	2.03	0.0480	0.43	202897	97109	2.09	0.0390	41978
Hungry × Hungry	-0.0250	0.01	-2.95	0.0049	-11.04	-46	42	-1.10	0.2738	-20315
Dextrin × Hungry	0.0365	0.01	4.26	<0.0001	15.24	56	42	1.33	0.1873	23544
Dextrin × Dextrin	-0.0004	0.01	-0.05	0.9631	-0.17	-50	46	-1.09	0.2801	-20046
HMB × Hungry	-0.3620	0.34	-1.06	0.2960	-3.80	-2265	1690	-1.34	0.1830	-23782
HMB × Dextrin	0.0786	0.36	0.22	0.8281	0.79	29	1775	0.02	0.9869	293
HMB × HMB	-30.8767	14.99	-2.06	0.0446	-7.72	-58374	73881	-0.79	0.4312	-14593

* Standard error of means

* خطای معیار میانگین‌ها

** Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

** بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات

جدول ۷. شاخص‌های برآوردشده در مدل‌های چندجمله‌ای توان دوم به روش رویه پاسخ برای مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی

Table 7. Estimated parameters of second-order response surface models for glycogen contents of liver and breast muscle of broilers at 7 days of age

Quadratic model Term	Liver glycogen model				Breast muscle glycogen model					
	Estimated parameter from raw data	SE*	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data	Estimated parameter from raw data	SE	t-value	P-value	Estimated parameter from coded data
Intercept	36.3555	1.7937	20.27	<0.0001	35.3331	62.5806	3.6645	17.08	<0.0001	60.9737
Hungry	-0.0087	0.0914	-0.10	0.9243	-8.0008	-0.1076	0.1867	-0.58	0.5655	-20.3074
Dextrin	0.1364	0.0845	1.62	0.1091	2.6880	0.1853	0.1726	1.07	0.2853	7.6876
HMB**	4.6372	3.3786	1.37	0.1727	0.7414	25.1929	6.9025	3.65	0.0004	1.8118
Hungry × Hungry	-0.0066	0.0015	-4.51	<0.0001	-2.8964	-0.0165	0.0029	-5.53	<0.0001	-7.2613
Dextrin × Hungry	0.0008	0.0015	0.54	0.5920	0.3318	0.0073	0.0030	2.44	0.0163	3.0768
Dextrin × Dextrin	-0.0010	0.0016	-0.59	0.5545	-0.3810	-0.0015	0.0033	-0.47	0.6387	-0.6181
HMB × Hungry	-0.0669	0.0588	-1.14	0.2581	-0.7019	-0.2336	0.1201	-1.94	0.0544	-2.4525
HMB × Dextrin	0.0294	0.0617	0.48	0.6343	0.2945	0.1262	0.1263	1.00	0.3192	1.2623
HMB × HMB	-1.9386	2.5708	-0.75	0.4524	-0.4846	-17.7875	5.2515	-3.39	0.0010	-4.4469

* Standard error of means

* خطای معیار میانگین‌ها

** Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

** بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات

و خوراک پس از تفریح محدود است. با این حال محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، استفاده از HMB به صورت تزریق در مایع آمینونی تخم بوقلمون، بر میزان گلیکوژن بافت کبد در سن هفت‌روزگی تأثیری نداشت اما موجب افزایش میزان گلیکوژن ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی شد (Foye *et al.*, 2006). به نظر می‌رسد که HMB موجب آزادسازی انسولین شده که به نوبه خود منجر به افزایش باز جذب گلوکز تولیدشده توسط کبد و تشکیل گلیکوژن در ماهیچه‌ها می‌شود. بنابراین می‌تواند ذخایر گلیکوژنی را به ماهیچه منتقل کند (Foye *et al.*, 2006). همچنین بیان شده است که تغذیه درون تخم‌مرغی محلول حاوی ۲۰ درصد دکسترین به همراه ۳ درصد مالتوز، موجب افزایش

شاخص‌های برآوردشده برای مدل‌های شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده و ذخایر گلیکوژن ماهیچه سینه جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی نشان دادند، تغذیه درون تخم‌مرغی HMB و دکسترین و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح بر صفات یادشده مؤثر بوده و در مورد ذخایر گلیکوژن بافت کبد، تنها اثر درجه دوم گرسنگی تأثیر داشت. محققان پیشین در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، تأخیر در دسترسی به نخستین آب و خوراک پس از تفریح تأثیر منفی بر شاخص‌های ریخت‌شناسی روده و ذخایر انرژی بدن جوجه دارد (Maiorka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014). تحقیقات در مورد ارزیابی اثر متقابل تغذیه درون تخم‌مرغی و دسترسی نداشتن به آب

تغذیه درون تخم مرغی کربوهیدرات‌ها و HMB از راه افزایش اندازه پرزها، نمو روده را بهبود می‌بخشد (Tako *et al.*, 2004).

برآوردهای ضرایب رگرسیون و مقادیر t در جدول‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند. ضرایب برآورد شده برای مدل شاخص کارایی تولید اروپایی در سن هفت‌روزگی و مقادیر قدر مطلق t مربوطه پیشنهاد می‌کنند که در میان متغیرهای مورد بررسی و اثر متقابل آن‌ها، اثر متقابل زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح و تغذیه درون تخم مرغی دکستین بیشترین تأثیر را دارد ($|t\text{-value}| = ۴/۲۶$). همچنین ضرایب‌های برآورد شده برای مدل مساحت پرزهای میان روده در سن هفت‌روزگی و مقادیر قدر مطلق t مربوطه نشان می‌دهند، تغذیه درون تخم مرغی دکستین بیشترین تأثیر را داشت ($|t\text{-value}| = ۲/۲۱$). ضرایب‌های برآورد شده برای مدل مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی و مقادیر قدر مطلق t مربوطه پیشنهاد می‌کنند که در میان متغیرهای مورد بررسی و اثر متقابل آن‌ها، توان دوم زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح بیشترین تأثیر را داشت (به ترتیب $|t\text{-value}|$ برابر با ۴/۵۱ و ۵/۵۳ برای مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه) و پس از آن‌ها، بیشترین تأثیر بر مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت‌روزگی به ترتیب مربوط به تغذیه درون تخم مرغی HMB ($|t\text{-value}| = ۳/۶۵$) و دکستین ($|t\text{-value}| = ۱/۶۲$) بود.

شاخص گلیکوژن بافتی در سن هفت‌روزگی شد (Foye *et al.*, 2006). سطح مناسب سوخت‌وساز گلوکز در مرحله پایانی جنینی از راه به دست آمدن گلوکز از گلیکوژن کبد و گلوکونئوسیس آلبومین موجود در آمینون و ماهیچه، حفظ می‌شود (Uni *et al.*, 2005). آلبومین و گلیکوژن ناکافی موجب افزایش گلوکونئوسیس پروتئین موجود در ماهیچه شده و منجر به محدود شدن رشد جنین در مرحله‌های انتهایی و کاهش رشد جوجه‌های تفریح شده می‌شود (Vieira & Moran, 1999). بنابراین، کربوهیدرات‌هایی مانند دکستین (کربوهیدرات هضم شده) به دلیل اهمیت آن برای رشد جنین در مرحله‌های انتهایی پیش از خروج از پوسته تخم و نمو آن پس از تفریح، ترکیب خوراکی مهمی در تغذیه درون تخم مرغی به شمار می‌آید (Uni *et al.*, 2005). همچنین محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند که تغذیه درون تخم مرغی کربوهیدرات‌ها موجب افزایش میزان گلیکوژن بافت کبد در جوجه‌های تفریح شده می‌شود (Zhai *et al.*, 2011a). ترکیب HMB که یک متابولیت اسیدآمینه لوسین است، نقش مهمی در سوخت‌وساز پروتئین در ماهیچه و جلوگیری از تجزیه پروتئین (پروتئولیز) بیش از حد ماهیچه دارد (Slater & Jenkins, 2000). همچنین نتایج پژوهش‌های پیشین نشان دادند، تغذیه درون تخم مرغی HMB موجب بهبود ذخایر گلیکوژن و کاهش استفاده از پروتئین ماهیچه برای گلوکونئوسیس طی مرحله‌های انتهایی جنینی و رشد پس از تفریح می‌شود (Uni *et al.*, 2005). برخی دیگر از محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند،

جدول ۸. تجزیه واریانس نتایج به دست آمده از مدل‌های روبه پاسخ برای شاخص کارایی تولید اروپایی و مساحت پرزهای میان روده جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی

Table 8. ANOVA of results from response surface models for European efficiency factor and jejunal villi surface area of broilers at 7 days of age

Source of variation	df	European efficiency factor model			Surface area model		
		Sum of squares	R ²	P-value	Sum of squares	R ²	P-value
Linear	3	26230	0.61	<0.0001	2.2900671E+12	0.66	<0.0001
Quadratic	3	2521.5	0.06	0.0118	26437730089	0.01	0.4567
Cross-product (interaction)	3	4006.8	0.09	0.0009	35839445254	0.01	0.3187
Total model (regression)	9	32759	0.76	<0.0001	2.3523442E+12	0.68	<0.0001
Lack of fit	3	1087.5		0.1535	27067095962		0.4475
Pure error	47 (107)*	9279.8			1.0814045E+12		
Total error	50 (110)	10367			1.1084716E+12		

* درجه آزادی خطای خالص و خطای کل برای مدل شاخص کارایی تولید اروپایی در سن هفت‌روزگی به ترتیب ۴۷ و ۵۰ و برای مدل مساحت پرزهای میان روده در سن هفت‌روزگی به ترتیب ۱۰۷ و ۱۱۰ بود.

* The df of pure and total errors for European efficiency factor model at 7 days of age was 47 and 50, respectively, and for jejunal villi surface area model at 7 days of age was 107 and 110, respectively.

جدول ۹. تجزیه واریانس نتایج به دست آمده از مدل های رویه پاسخ برای مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه جوجه های گوشتی در سن هفت روزگی

Table 9. ANOVA of results from response surface models for glycogen contents of liver and breast muscle of broilers at 7 days of age

Source of variation	df	Liver glycogen model			Breast muscle glycogen model		
		Sum of squares	R ²	P-value	Sum of squares	R ²	P-value
Linear	3	4594.4	0.74	<0.0001	30386.0	0.79	<0.0001
Quadratic	3	250.4	0.03	0.0003	2008.1	0.05	<0.0001
Cross-product (interaction)	3	22.1	0.01	0.6144	546.4	0.01	0.0163
Total model (regression)	9	4866.9	0.78	<0.0001	32940.0	0.85	<0.0001
Lack of fit	3	38.7		0.3698	518.3		0.0152
Pure error	107	1303.1			5082.1		
Total error	110	1341.8			5600.5		

کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده و مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت روزگی در جدول ۱۰ نشان داده شده است. تجزیه بیشینه ریج نشان داد، بیشترین شاخص کارایی تولید اروپایی و مساحت پرزهای میان روده در سن هفت روزگی هنگامی به دست می آید که به ترتیب ساعت دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح ۲۰/۷۹ و ۱۱/۲۳ ساعت و مقادیر تغذیه درون تخم مرغی برای دکستین به ترتیب ۰/۶۵ و ۳۹/۰۳ درصد و HMB به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۶۵ درصد باشد. همچنین بیشترین مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت روزگی هنگامی به دست می آید که ساعت دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح در حدود ۱۰ ساعت و مقادیر تغذیه درون تخم مرغی برای دکستین و HMB به ترتیب در حدود ۳۰/۴۹ و ۰/۶۳ درصد باشند. همچنین بر پایه نتایج این تحقیق، مقادیر شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده و مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه در سن هفت روزگی در نقاط بهینه به ترتیب ۲۱۱/۰۴، ۷۴۸۲۰۱ میکرومتر مربع، ۴۱/۴۳ میلی گرم در کل بافت کبد و ۷۶/۰۸ میلی گرم در کل ماهیچه سینه بود.

میزان مشارکت انواع اثرگذاری خطی، توان دوم و متقابل مربوط به متغیرهای ورودی در برازش نهایی مدل (بر پایه R²) در جدول های ۸ و ۹ نشان داده شده است. در همه مدل ها اجزای خطی بیشترین مشارکت (۰/۶۴ تا ۰/۷۹) را برای توصیف واریانس موجود در پاسخ جوجه های گوشتی داشتند. از آزمون های فرضیه می توان برای پی بردن به اهمیت تأثیر به دست آمده از متغیرها و ضریب ها استفاده کرد، اما با توجه به اینکه مقادیر عدم برازش^۱ برای مدل میزان گلیکوژن ماهیچه سینه در سن هفت روزگی معنی دار است (P<۰/۰۵)، نشان می دهد، به شیوه های مدل سازی پیچیده تر و یا متغیرهای آزمایشی بیشتری برای رسیدن به مدل قوی تر و نتایج دقیق تر به منظور رسیدن به نتیجه گیری بهتر و کلی تر در مورد صفت یاد شده، نیاز است (Box et al., 1978; SAS Institute, 2011). معنی دار نبودن مقادیر عدم برازش برای مدل های شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده و میزان گلیکوژن بافت کبد در سن هفت روزگی (P>۰/۰۵) نشان می دهند، داده های مشاهده شده در توافق خوبی با مدل خود هستند. نتایج بهینه سازی مدل های رویه پاسخ برای دستیابی به بیشترین شاخص

جدول ۱۰. نتایج بهینه سازی مدل های رویه پاسخ با هدف دستیابی به بیشترین شاخص کارایی تولید اروپایی، مساحت پرزهای میان روده و مقادیر گلیکوژن بافت کبد و ماهیچه سینه جوجه های گوشتی در سن هفت روزگی

Table 10. The results of response surface model optimization to achieve maximum European efficiency factor, jejunal villi surface area and glycogen contents of liver and breast muscle of broilers at 7 days of age

Item	Input variable			Predicted output variable at optimal point
	Hungry (hour)	Dextrin (%)	HMB* (%)	
European efficiency factor	20.79	39.03	0.54	Maximum = 211.04
Villi surface area (μm ²)	11.23	27.78	0.65	Maximum = 748201
Liver glycogen (mg/total liver)	9.99	30.24	0.64	Maximum = 41.43
Breast muscle glycogen (mg/total liver)	9.92	30.54	0.62	Maximum = 76.08

*Beta-hydroxy beta-methylbutyrate

* بتا- هیدروکسی بتا- متیل بوتیرات

آزمایش به منظور تشخیص عامل‌ها یا متغیرهای مهم امری رایج است و آزمایش‌ها را به هدف بهبود عملکرد پاسخ، پیگیری می‌کند. بنابراین، دانش کل نظام آزمایش را افزایش می‌دهد. بر این پایه، روش رویه پاسخ یک روش ریاضی و آماری مهم برای بهینه‌سازی اثر متقابل عامل‌ها و سطوح آن‌ها و کاهش هزینه‌های تولید و تحقیق است (Myers & Montgomery, 2009).

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق، تأثیر تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح بر عملکرد رشد، ذخایر گلیکوژنی کبد و ماهیچه سینه و ریخت‌شناسی میان روده جوجه‌های گوشتی در سن هفت‌روزگی بررسی و بهینه‌سازی آن با روش رویه پاسخ انجام شد. تغذیه درون تخم مرغی دکسترین موجب کاهش قابلیت جوجه درآوری شده در حالی که تغذیه درون تخم مرغی HMB قابلیت جوجه درآوری را تحت تأثیر قرار نداد. طرح باکس- بنکن به منظور انجام آزمایش‌های رشد با کمترین تیمارهای ممکن و روش رویه پاسخ، می‌توانند برای توصیف رابطه بین تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح به منظور دستیابی به بهترین شاخص تولید کارایی اروپایی بهینه در سن هفت‌روزگی استفاده شوند. نتایج این تحقیق نشان داد، دستیابی به بالاترین شاخص کارایی تولید اروپایی در سن هفت‌روزگی با تغذیه درون تخم مرغی HMB و دکسترین (به ترتیب ۰/۵۴ و ۳۹/۰۳ درصد) در مایع آمینونی تا بیشینه حدود ۲۰ ساعت و ۴۵ دقیقه گرسنگی پس از تفریح میسر است.

در بیشتر تحقیقات، مدت و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح به خوبی تعریف نشده است (Lamot *et al.*, 2014). در اغلب پژوهش‌های پیشین، به اثر متقابل بین تغذیه درون تخم مرغی و زمان دسترسی به نخستین خوراک پس از تفریح کمتر توجه شده است و در بیشتر موارد، مواد مختلفی به صورت منفرد استفاده شده‌اند (Kornasio *et al.*, 2011; Foye *et al.*, 2004; Tako *et al.*, 2006). بر پایه نتایج تحقیقات پیشین مشخص شده است که هر چه شمار عامل‌ها افزایش می‌یابد، شمار ترکیب‌های تیماری نیز بیشتر می‌شود که برای طرح فاکتوریل کامل به صورت نمایی است (De Leon *et al.*, 2010). در چنین شرایطی کارایی نسبی برای طرح باکس- بنکن بیشترین و برای آزمایش فاکتوریل کامل، کمترین است و نشان می‌دهد هنگامی که شمار عامل‌های مورد بررسی افزایش می‌یابد، شکافی عمیق در کارایی آزمایش‌های فاکتوریل کامل به وجود می‌آید (Ferreira *et al.*, 2007). همچنین، در مورد آزمایش‌های دارای سه عامل، طرح باکس- بنکن برتری‌هایی در رابطه با استفاده از شمار داده کمتر مورد نیاز دارد. با این حال اگر شمار عامل‌ها ۴ یا بیشتر شود این برتری از بین خواهد رفت (Box *et al.*, 1978). مقایسه طرح باکس- بنکن و طرح‌های رویه پاسخ دیگر همچون طرح مرکب مرکزی^۱ و فاکتوریل کامل برای سه عامل، نشان داد، جایی که کارایی طرح آزمایشی بر پایه شمار ضریب‌ها در مدل برآورد شده تقسیم بر شمار آزمایش‌ها تعریف می‌شود، طرح باکس- بنکن کمی از طرح مرکب مرکزی کارآمدتر بوده اما کارایی بسیار بالاتری در مقایسه با آزمایش فاکتوریل کامل دارد (Ferreira *et al.*, 2007). در روش رویه پاسخ، بررسی

REFERENCES

- Ahmadi, H. & Golian, A. (2010). The integration of broiler chicken threonine responses data into neural network models. *Poultry Science*, 89, 2535-2541.
- Ahmadi, H. & Golian, A. (2011). Response surface and neural network models for performance of broiler chicks fed diets varying in digestible protein and critical amino acids from 11 to 17 days of age. *Poultry Science*, 90, 2085-2096.
- Bello, A., Zhai, W., Gerard, P. D. & 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.

4. Box, G. E. P., Hunter, W. G. & Hunter, J. S. (1978). *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. (2nd ed.). John Wiley and Sons Publication. New York, USA, (pp. 437-538).
5. De Leon, A. C., Kidd, M. T. & Corzo, A. (2010). Box-Behnken Design: alternative multivariate design in broiler nutrition research. *Worlds Poultry Science Journal*, 66, 699-706.
6. Decuypere, E. & Bruggeman, V. (2007). The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. *Poultry Science*, 86, 1037-1042.
7. Decuypere, E. Tona, K., Bruggeman, V. & Bamelis, F. (2001). The day-old chick: a crucial hinge between breeders and broilers. *Worlds Poultry Science Journal*, 57, 127-138.
8. Dreiling, C. E., Brown, D. E., Casale, L. & Kelly, L. (1987). Muscle glycogen: Comparison of iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. *Meat Science*, 20, 167-177.
9. Farouk, M. M., Al-Mazeedi, H. M., Sabow, A. B., Bekhit, A. E. D., Adeyemi, K. D., Sazili, A. Q. & Ghani, A. (2014). Halal and kosher slaughter methods and meat quality: A review. *Meat Science*, 98, 505-51.
10. Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M. & Neto, B. B. (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, 1158, 2-14.
11. Foye, O. T., Uni, Z. & Ferket, P. R. (2006). Effect of *in-ovo* feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science*, 85, 1185-1192.
12. Hamadani, H., Alam Khan, A., Banday, M. T. & Hamadani, A. (2013). Early chick feeding and *in-ovo* nutrition two managemental strategies to combat the effects of delayed feeding. *International Journal of Modern Plant and Animal Sciences*, 1, 123-141.
13. Hu, R. (1999). *Food Product Design: A Computer-Aided Statistical Approach* (1st ed.). CRC Press. Washington, USA, (pp. 23-45).
14. Huff, G. R., Huff, W. E., Jalukar, S., Oppy, J., Rath, N. C. & Packialakshmi, B. (2013). The effects of yeast feed supplementation on turkey performance and pathogen colonization in a transport stress/*Escherichia coli* challenge. *Poultry Science*, 92, 655-662.
15. Juul-Madsen, H. R., Su, G. & Sorensen, P. (2004). Influence of early or late start of first feeding on growth and immune phenotype of broilers. *British Poultry Science*, 45, 210-222.
16. Kadam, M. M., Berekatain, M. R., Bhanja, S. & Iji, P. A. (2013). Prospects of *in-ovo* feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3654-3661.
17. Kornasio, R., Halevy, O., Kedar, O. & Uni, Z. (2011). Effect of *in-ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poultry Science*, 90, 1467-1477.
18. Lamot, D. M., Van De Linde, I. B., Molenaar, R., Van Der Pol, C. W., Wijtten, P. J. A., Kemp, B. & Van Den Brand, H. (2014). Effects of moment of hatch and feed access on chicken development. *Poultry Science*, 93, 1-11.
19. Liu, S. Y., Sydenham, C. J. & Selle, P. H. (2016). Feed access to, and inclusions of fishmeal and corn starch in, sorghum-based broiler diets influence growth performance and nutrient utilization as assessed by the Box-Behnken response surface design. *Animal Feed Science and Technology*, 220, 46-56.
20. Maiorka, A., Santin, E., Dahlke, F., Boleli, I. C., Furlan, R. L. & Macari, M. (2003). Posthatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 12, 483-492.
21. Moran, E. T. (1985). Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. *Journal of Nutrition*, 115, 665-674.
22. Myers, R. H. & Montgomery, D. C. (2009). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (3rd ed.). John Wiley and Sons Publication, New York, USA, (pp. 19-39).
23. National Research Council (1994). *Nutrient Requirements of Poultry* (9th Revised ed.). National Academy Press, Washington, DC.
24. Noy, Y. & Uni, Z. (2010). Early nutritional strategies. *World's Poultry Science Journal*, 66, 639-646.
25. Oliveira, T. F. B., Bertechini, A. G., Bricka, R. M., Kim, E. J., Gerard, P. D. & Peebles, E. D. (2015). Effects of *in-ovo* injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poultry Science*, 94, 2488-2494.
26. Ross. (2014). *Ross 308 Broiler Nutrition Specifications*. (1st ed.). Ross Broiler Ltd., Scotland, UK. (pp. 6)
27. Sakamoto, K., Hirose, H., Onizuka, A., Hayashi, M., Futamura, N., Kawamura, Y. & Ezaki T. (2000). Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *Journal of Surgical Research*, 94, 99-106.

28. SAS Institute (2011). SAS Statistics User's Guide. Version 9.3 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
29. Slater, G. J. & Jenkins, D. (2000). β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) supplementation and the promotion of muscle growth and strength. *Sports Medicine*, 30, 105-116.
30. Tako, E., Ferket, P. R. & Uni, Z. (2004). Effects of *in-ovo* feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poultry Science*, 83, 2023-2028.
31. Uni, Z. & Ferket, P. R. (2004). Methods for early nutrition and their potential. *World's Poultry Science Journal*, 60, 101-111.
32. Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E. & Kedar, O. (2005). *In-ovo* feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84, 764-770.
33. Vega, R. S., Remoral, D. M. S., Lontoc, C. A. A., Octura, J. E. R., Iranzo, M. F. M. & Capitan, S. S. (2014). Effects of beta-benzene hexachloride *in-ovo* on the embryonic growth and development of domestic mallard ducks (*Anas platyrhynchos domesticus* L.). *Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2, 1-6.
34. Vieira, S. L. & Moran, E. T. (1999). Effects of egg of origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. *Worlds Poultry Science Journal*, 55, 125-142.
35. Vieira, S. L., Almeida, J. G., Lima, A. R., Conde, O. R. A. & Olmos, A. R. (2005). Hatching distribution of eggs varying in weight and breeder age. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 7, 73-78.
36. Wang, Y., Li, Y., Willems, E., Willemsen, H., Franssens, L., Koppenol, A. & Everaert, N. (2014). Spread of hatch and delayed feed access affect post hatch performance of female broiler chicks up to day 5. *Animal*, 8, 610-616.
37. Willemsen, H., Debonne, M., Swennen, Q., Everaert, N., Careghi, C., Han, H. & Decuypere, E. (2010). Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *Worlds Poultry Science Journal*, 66, 177-188.
38. Yamauchi, K., Kamisoyama, H. & Isshiki, Y. (1996). Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in white Leghorn hens. *British Poultry Science*, 37, 909-921.
39. Zhai, W., Bennett, L. W., Gerard, P. D., Pulikanti, R. & Peebles, E. D. (2011a). Effects of *in-ovo* injection of carbohydrates on somatic characteristics and liver nutrient profiles of broiler embryos and hatchlings. *Poultry Science*, 90, 2681-2688.
40. Zhai, W., Gerard, P. D., Pulikanti, R. & Peebles, E. D. (2011b). Effects of *in-ovo* injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. *Poultry Science*, 90, 2134-2143.
41. Zhai, W., Rowe, D. E. & Peebles, E. D. (2011c). Effects of commercial *in-ovo* injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. *Poultry Science*, 90, 1295-1301.