

## توانایی یدک شدن آرژنین با گوانیدینواستیک اسید و تعیین نیاز آرژنین مرغ مادرگوشتی در انتهای دوره تولید

لیدا اسمعیلی نیا<sup>۱\*</sup>، مجتبی زاغری<sup>۲</sup> و سید ناصر موسوی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۱۴

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

<sup>۲</sup> استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران

\*مسئول مکاتبه: Email: esmaily.lida@alumni.ut.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** تعیین نیاز مجدد مواد مغذی و ارزش جایگزینی افزودنی‌های تجاری در جیره‌های کاربردی در جهت بهبود عملکرد مرغ مادرگوشتی **هدف:** این تحقیق به منظور ارزیابی مجدد نیاز آرژنین در جیره‌های کاربردی مرغ‌مادرگوشتی و امکان یدک شدن آرژنین توسط گوانیدینواستیک اسید (*GAA*) انجام شد. روش کار: آزمایش با ۳۲۰ قطعه مرغ مادر سوویه راس ۳۰۸ به صورت فاکتوریل، شامل دو سطح *GAA* (صفر و ۰/۱۲ درصد جیره غذایی) و چهار سطح آرژنین افزوده (۰، ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد جیره غذایی) در دوره سنی ۵۴ تا ۶۳ هفتگی انجام شد. نیاز آرژنین با استفاده از تابعیت خطی و غیرخطی برای صفات عملکردی از آرژنین خوراک تعیین شد. **نتایج:** اثر متقابل آرژنین و *GAA* بر قابلیت باروری معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). تابعیت ایمونوگلوبولین *G* و نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین از سطوح افزایشی آرژنین معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). اثر آرژنین افزوده و *GAA* بر سرانه تخم‌مرغ تولیدی و قابل‌جوجه‌کشی کل دوره (مرغ لانه) و وضعیت پوششش پر معنی‌دار نبود ( $P < 0/05$ ). هرچند افزودن آرژنین باعث افزایش فراوانی پرندگان با پوششش کامل پر (امتیاز ۵) شد و بیشترین سرانه تخم‌مرغ تولیدی با افزودن ۰/۳ درصد آرژنین همراه با گوانیدینواستیک‌اسید حاصل شد. با افزایش میزان آرژنین افزوده تا ۰/۶ و ۰/۹ درصد، مدت زمان مصرف جیره روزانه به طور معنی‌دار تا دو برابر افزایش یافت. نیاز آرژنین قابل‌هضم برای سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی، سرانه کل تخم‌مرغ قابل‌جوجه‌کشی، نفوذ اسپرم در لایه‌پری‌ویتلین و ایمونوگلوبولین *G* با احتساب آرژنین جیره پایه به ترتیب ۰/۸۷، ۰/۰۳ و ۱/۳۴ درصد برآورد شد، که بیش از میزان توصیه شده توسط راهنمای پرورش است. با اعمال ۰/۱۲ درصد *GAA*، نیاز آرژنین افزوده برای موارد مزبور به ترتیب ۱/۰۲، ۰/۹۱، ۱/۰۰ و ۱/۲۷ درصد برآورد شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** براساس نتایج این آزمایش، مقدار آرژنین توصیه شده توسط راهنمای پرورش مرغ‌مادرگوشتی سوویه راس ۳۰۸، تکافوی نیاز این پرنده را نمی‌نماید و افزودن *GAA*، جایگزین بخشی از آرژنین برای صفت باروری شد.

واژگان کلیدی: مرغ مادرگوشتی، آرژنین، گوانیدینواستیک‌اسید

## مقدمه

عملکرد گله مرغ مادر گوشتی با افزایش سن به شدت کاهش می‌یابد (زاغری و همکاران ۲۰۱۳). تداوم تجمع چربی در بافت‌ها، اختلال در تنظیم سوخت و ساز چربی، تغییر در سیگنال‌های هورمونی و متابولیت‌های مرتبط با تولیدمثل را در پی دارد. در مطالعه فو و همکاران (۲۰۰۵) با افزودن آرژنین به جیره مرغ مادر و افزایش نسبت آرژنین به لیزین، بیان پروتئین‌های متصل به عوامل تنظیمی استرول<sup>۱</sup> (*SREBPs*)، که باعث تنظیم افزایشی آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز چربی می‌شوند، کاهش یافت. در مطالعه‌ای آرژنین در سطح ۱/۲۶۲ درصد جیره، تولید و وزن تخم‌مرغ را در مرغ مادر گوشتی بهبود بخشید (سیلوا و همکاران ۲۰۱۲) که بیش از میزان پیشنهادی راهنمای پرورش راس ۳۰۸ (۲۰۱۳) است. برآورد احتیاجات مرغ مادر گوشتی در جهت تأمین نیازهای عملکردی و نیز احتیاجات جنین و جوجه‌های به تازگی تفریح شده صورت می‌گیرد. افزودن اسیدهای آمینه مصنوعی به خوراک مستلزم دانش مناسب در زمینه اثرات متابولیک آنها بر تولید، کیفیت، باروری و قابلیت جوجه‌درآوری تخم‌مرغ است. جایگزینی ترکیبات مغذی غنی از پروتئین با اسیدهای آمینه مصنوعی (مانند لیزین، متیونین و ترئونین) امروزه اقتصادی و امکان پذیر است و بررسی‌ها برای سایر ترکیبات موثر ادامه دارد. گوانیدینواسیتیک‌اسید (*GAA*) ترکیبی است که از آرژنین و گلیسین توسط آنزیم آرژنین-گلیسین آمیدینوترانسفراز<sup>۲</sup> سنتز می‌شود. و با دریافت گروه متیل از اس-آدنوزیل متیونین<sup>۳</sup> به کراتین تبدیل می‌شود که در احیای *ATP* نقش دارد. در بسیاری از کشورها ممنوعیت استفاده از فرآورده‌های فرعی با منشأ حیوانی، باعث کمبود کراتین به عنوان یک ماده مغذی نیمه ضروری که تنها در مواد خام با منشأ حیوانی وجود دارد، می‌شود

(رینگل و همکاران ۲۰۰۸). نیاز جنین برای فرایند رشد و خروج از تخم به طور کلی به سنتز *ATP* وابسته است. در صورتیکه جیره مرغ مادر فاقد منابع پروتئین حیوانی و بنابراین فاقد کراتین است. قابلیت تبدیل *GAA* به کراتین با افزایش تراکم کراتین خون و ماهیچه مشاهده شد (لمه و همکاران ۲۰۰۷ *a,b*، میشل و همکاران ۲۰۱۲). موراکامی و همکاران (۲۰۱۳)، مطالعه‌ای با افزودن *GAA* به جیره بلدرچین مادر به عنوان مدل مشابه مرغ مادر گوشتی، بهبود در قابلیت جوجه‌درآوری و باروری تخم‌مرغ‌ها را گزارش نمود. همچنین افزودن ۱۲ درصد *GAA* در جیره جوجه‌های جوان، با جبران نقش آرژنین در ساخت کراتین و عملکرد رشد، آرژنین جیره را یک نمود (دیلگر و همکاران ۲۰۱۳). در این آزمایش اثر افزودن *GAA* و آرژنین در جیره کاربردی بر عملکرد مرغ مادر گوشتی در سن ۵۴ تا ۶۳ هفتگی بررسی و نیاز آرژنین بدون و با اعمال *GAA* در جیره تعیین شد.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۳۲۰ قطعه مرغ مادر سویه راس ۳۰۸ در سن ۵۴ هفتگی از یک گله تجاری براساس تولید تقریباً یکسان انتخاب و در ۳۲ پن در ابعاد ۱/۲۵×۲/۵ متر مربع توزیع شدند و تا سن ۶۳ هفتگی پرورش یافتند. برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی مطابق با راهنمای پرورش راس ۳۰۸ (۲۰۱۳) اجرا شد.

## تیمار آزمایشی

آزمایش شامل ۸ تیمار به صورت فاکتوریل (۲×۴) بود و عوامل شامل ۲ سطح *GAA* (صفر و ۱/۲ گرم در کیلوگرم) و ۴ سطح اسید آمینه آرژنین افزوده (صفر، ۳، ۶ و ۹ گرم در کیلوگرم) بود. به منظور تعیین نیاز اسید آمینه آرژنین از سطح صفر و با توجه به امکانات، حداکثر سطح بدون مسمومیت، اطمینان از دسترسی

<sup>1</sup> Sterol regulatory element binding proteins

<sup>2</sup> Guanidino acetic acid

<sup>3</sup> Arginine-Glycine amidinotransferase

<sup>4</sup> S-adenosylmethionine

## جدول ۱- ترکیب موادخوراکی و مواد مغذی جیره پایه

Table 1- Ingredients and chemical composition of diet	
%	مواد خوراکی Ingredient
50.45	Corn ذرت
16.04	Soya bean meal, 42.6% CP کنجاله سویا
22.11	Wheat گندم
0.68	Corn oil روغن ذرت
1.26	Dicalcium phosphate دی‌کلسیم فسفات
7.45	Mineral oyster shall صدف معدنی
0.31	Common salt نمک
0.25	Mineral premixes <sup>1</sup> مکمل مواد معدنی
0.25	Vitamin premix <sup>1</sup> مکمل ویتامینه
0.14	DL-Met, 99% دی‌ال - متیونین
0.02	L-Lys HCl, 78% ال - لیزین
0.02	L-Thr ال - ترئونین
1.02	Sand <sup>2</sup> ماسه
	Calculated nutrient content مواد مغذی
2800	AME (kcal/kg) انرژی قابل متابولیسم
13.1	CP پروتئین خام
3.2	Calcium کلسیم
0.32	Available phosphorus فسفر قابل دسترس
0.15	Sodium سدیم
0.57	Lys لیزین
0.56	Digestible Lys <sup>3</sup> لیزین قابل هضم
0.37	Met متیونین
0.34	Digestible Met متیونین قابل هضم
0.61	Met + Cys متیونین+سیستین
0.55	Digestible Met + Cys متیونین+سیستین قابل هضم
0.48	Thr ترئونین
0.45	Digestible Thr ترئونین قابل هضم
0.75	Arg آرژنین
0.73	Digestible Arg آرژنین قابل هضم
0.00	Guanidinoacetic acid(GAA) گوانیدینوآستیک اسید

<sup>1</sup>Provides (per kg of diet): vitamin A (retinyl acetate), 12 000 IU; cholecalciferol, 3500 IU; vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate), 100 IU; vitamin K, 5.0 mg; thiamin, 3.0 mg; riboflavin, 12 mg; D-pantothenic acid, 13 mg; niacin, 50 mg; pyridoxine, 6 mg; biotin, 0.66 mg; folic acid, 2 mg; vitamin B12, 0.03 mg; copper (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O), 10 mg; iodine (KI), 2 mg; iron (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), 50 mg; manganese (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), 120 mg; selenium (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), 0.3 mg; Zn (ZnO), 110 mg.

<sup>2</sup>Sand was replaced by the dietary treatment groups.

<sup>3</sup>Values are standardized ileal digestible

طیور به این ترکیب در جیره و کارایی بهتر سطح ۰/۱۲ درصد *GAA* در آزمایشات پیشین (موراکامی و همکاران ۲۰۱۳) استفاده شد. ترکیب مواد خوراکی جیره پایه در جدول ۱، ارائه شده است. جیره بر پایه ذرت و سویا، با مشخصه کمبود در آرژنین بود (جدول ۱). برای تنظیم هشت جیره آزمایشی مقادیر *GAA* و آرژنین جایگزین ماسه در خوراک پایه شد. قبل از تنظیم جیره پایه، میزان مواد مغذی موجود در مواد خوراکی به روش اسپکتروسکوپی مادون قرمز و روش *AOAC* (۲۰۰۶) توسط شرکت ایوانیک دگوسا تعیین شد و بعد از مخلوط نمودن مواد خوراکی میزان اسیدآمینها و *GAA* محتوی تیمارهای آزمایشی توسط شرکت *AlzChem* در آلمان به روش کروماتوگرافی یونی<sup>۱</sup> اندازه‌گیری و گزارش شد (جدول ۱). همچنین مقادیر *GAA* در مطالعه شریده و همکاران (۲۰۱۶) ارائه شد. میزان انرژی روزانه محتوی خوراک در ابتدای هر هفته با استفاده از معادله شماره یک رییز و همکاران (۲۰۱۲)، محاسبه گردید و سپس ۲۰ درصد که معادل تفاوت انرژی مورد نیاز پرورش در قفس و روی بستر است به این میزان انرژی اضافه شد (ساکامورا ۲۰۰۴). به‌طور متوسط میزان جیره روزانه در طول دوره آزمایش ۱۵۵ گرم بود. توزیع خوراک روزانه یکبار و تا یک ساعت بعد از روشنایی صورت می‌گرفت. جهت تأمین *GAA* از ماده تجاری *CreAmino*، محصول شرکت ایوانیک دگوسا با خلوص ۹۶ درصد استفاده شد.

## صفات مورد بررسی

## عملکرد تولید و وضعیت تغذیه

تخم‌مرغ‌ها روزانه جمع‌آوری و به تفکیک تولیدی و قابل جوجه‌کشی (براساس شکل ظاهری) ثبت شد. مدت زمان مصرف جیره روزانه هر واحد آزمایشی در سن ۶۲ هفتگی اندازه‌گیری شد.

<sup>1</sup>Ion-Exchange chromatography

### سنجش باروری و نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین

اثر آرژنین و *GAA* بر باروری و نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین در مطالعه شریده و همکاران (۲۰۱۶)، ارائه گردید. بر این اساس تلقیح مصنوعی تمام مرغ‌های هر واحد آزمایشی با دوز تلقیح ۲۵۰ میکرولیتر (۱۰۶ × ۱۰۰ اسپرم به ازای هر مرغ) در سن ۶۱ هفتگی (در ساعات بعد از ظهر) انجام شد و در بازه ۱۶ روزه (در روزهای دوم، پنجم، هشتم، نهم، دوازدهم، سیزدهم، پانزدهم و شانزدهم پس از تلقیح) تخم‌مرغ‌های جمع‌آوری شده از هر تیمار در دستگاه جوجه‌کشی با دمای ۳۷/۵ و ۲۹ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای دماسنج خشک و مرطوب جوجه‌کشی قرار گرفت و پس از گذشت چهار روز تخم‌مرغ‌ها شکسته شد و میزان باروری با محاسبه درصد تخم‌مرغ‌هایی که بارور شده و جنین آن‌ها رشد کرده بود از تخم‌مرغ‌های قرارداد شده در دستگاه جوجه‌کشی تعیین شد. برای شمارش منافذ ایجاد شده در لایه پری‌ویتلین توسط اسپرم، از هر تکرار دو عدد تخم‌مرغ در روزهای سوم و هفتم بعد از تلقیح مصنوعی انتخاب شد، پس از جداسازی لایه زاینده از روی زرده تخم‌مرغ و رنگ‌آمیزی با رنگ فوشین با روش برامول و همکاران (۱۹۹۵)، تعداد منافذ ایجاد شده توسط اسپرم، شمارش شد. قطر دایره منطقه شمارش از تقسیم تعداد محیط دید با بزرگنمایی ۴۰ × عدسی چشمی محاسبه شد و تعداد منافذ در مساحت ۰/۵ میلی‌متر مربع گزارش شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

اجرای عملیات در نرم‌افزار سیستم تجزیه آماری (*SAS* 9.2)، انجام شد، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از رویه مدل عمومی خطی (*GLM*)<sup>۱</sup> در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل ۲ × ۴ انجام شد. فاکتورها شامل چهار سطح درجه‌بندی شده آرژنین قابل‌هضم با پله‌های افزایش برابر (جیره پایه با ۰/۷۳ درصد آرژنین، جیره

به دلیل اثر آرژنین و مشتقات آن بر پوشش پر (خواجلی و وایدمن ۲۰۱۰)، وضعیت پوشش پر ناحیه پشت مرغ‌های موجود در هریک از واحدهای آزمایشی در سن ۶۳ هفتگی، با پیروی از روش گزارش شده توسط سیکور و همکاران (۲۰۰۴)، در مقیاس یک تا پنج رتبه بندی گردید؛ به طوریکه نمره یک عدم پوشش پر، نمره دو برای پوشش محدود به گردن، نمره سه برای زمانیکه یک خط ممتد عرضی بر روی پشت فاقد پر بود، نمره چهار زمانیکه بخش فاقد پر به مساحت یک سکه در محدوده پشت تا دم بود، و نمره پنج به پوشش تمام پر اختصاص داشت.

### آزمون عیار پادتن علیه پادکن گلوبول قرمز گوسفند (*SRBC*)

به منظور تحریک سیستم ایمنی هومورال مرغ‌ها در سن ۶۱ هفتگی از گلوبول قرمز گوسفند به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. سو‌سپانسیون پنج درصد گلوبول‌های قرمز حل شده در بافر فسفات سیالین تهیه شد. این محلول به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به دو قطعه مرغ از هر واحد آزمایشی در عضله سینه تزریق شد (قریب و همکاران ۲۰۰۸) و هفت روز بعد خونگیری از ورید بال مرغ‌های مذکور انجام شد. برای تعیین عیار پاسخ کل ( $IgG + IgM$ )، از روش هموگلوبیناسیون استفاده شد. در هنگام قرائت نمونه‌ها، لگاریتم در مبنای دو ( $\log_2$ ) عکس آخرین رقتی که در آن هموگلوبیناسیون دیده شد به عنوان عیار پادتنی ثبت شد (بکار و رودباک ۱۹۷۹). برای تعیین *IgG* از *IgM* که اجزا پاسخ *SRBC* هستند با جداسازی پادتن مقاوم به مرکاپتاتانول (با غلظت ۱۴۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر سیالین فسفات) که در حقیقت *IgG* بود و کسر این مقدار از پاسخ کل، آنتی‌بادی حساس به مرکاپتاتانول با خلوص ۱/۵ درصد که معرف *IgM* بود به دست آمد.

<sup>1</sup> Sheep Red Blood Cells

<sup>2</sup> Immunoglobulin M

<sup>3</sup> Immunoglobulin G

<sup>4</sup> General linear model

برای متابولیسم و دفع آرژنین در جیره‌های با سطوح بسیار بالای آرژنین باشد (لیسون و سامرز ۲۰۰۱). در مطالعه خلجی و همکاران (۱۳۹۲)، افزودن همزمان آرژنین، ایزوفلاوان سویا و هیدرکسی پروپیل متیل سلولز با ویسکوزیته بالا به جیره‌های بر پایه ذرت و سویا حاوی سطوح انرژی برابر با سطح انرژی راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸ و ۴۰ درصد بالاتر از این میزان انرژی، در پایان دوره تولید، منجر به افزایش درصد تولید تخم‌مرغ، به ترتیب به میزان ۳۹ و ۱۹ درصد نسبت به گروه شاهد شد. مصرف پروتئین با کیفیت پایین، اثر فوری بر تغذیه پروتئین حیوان ندارد. پروتئین درون‌زاد ناشی از ترشحات گوارشی و سلول‌های موکوسی جدا شده بین یک سوم تا یک دوم پروتئین موجود در مجرای روده‌ای را تشکیل می‌دهد. این جریان زیاد پروتئین درون‌زاد با ترکیب اسید آمینه‌ای تقریباً ثابت، برای خنثی کردن اثرات کوتاه مدت مصرف پروتئین کم ارزش به کار می‌رود. به همین دلیل، از نوسانات زیاد ترکیب اسیدهای آمینه و سطوح آنها در مجرا جلوگیری می‌شود (کفیل‌زاده و همکاران ۲۰۰۳)؛ عدم تفاوت معنی‌دار در سرانه کل تولید تخم‌مرغ در بین گروه‌های با کمترین سطح آرژنین افزوده (سطح کمبود آرژنین) و سطوح بالاتر در این آزمایش به دلیل اولویت بدن در استفاده از آرژنین در مسیرهای مختلف متابولیسمی و تا حدودی به دلیل تأثیر پروتئین درون‌زاد بر ترکیب خوراک بود.

#### ایمنی هومورال

مطابق جدول ۲، اثر آرژنین، بر تیترا پادتن علیه پادگن گلبول قرمز گوسفند (SRBC) معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین و کمترین مقادیر به ترتیب در سطوح ۰/۶ و صفر آرژنین افزوده و در عدم حضور GAA مشاهده شد. مرغ‌های مادر با عوامل استرس زای بسیاری اعم از استرس گرسنگی، استرس ناشی از تخمگذاری و نیز استرس چاقی مواجه اند و ایمنی آنها دچار اختلال است

پایه + ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ درصد آرژنین) و دو سطح GAA (صفر و ۰/۱۲ درصد) بود و هر گروه آزمایشی به چهار تکرار اختصاص یافت. تجزیه واریانس برای بررسی اثرات اصلی و متقابل آرژنین افزوده و GAA صورت گرفت. برای مقایسه اثرات جزئی به دلیل تعدد منابع تغییر از آزمون میانگین حداقل مربعات (LSM)، استفاده شد. برای بررسی بیشتر اثر سطوح افزایشی آرژنین، تابعیت صفات از سطوح افزایشی آرژنین، از مقایسات روند شامل تابعیت خطی، درجه دو و درجه سه استفاده شد. تعیین نیاز آرژنین، با رویه غیرخطی (NLIN) برای صفات عملکردی شامل سرانه تولید تخم‌مرغ (کل و قابل جوجه‌کشی)، میزان نفوذ اسپرم (باروری) و ایمنی هومورال انجام شد. انتخاب مدل مناسب جهت توصیف تابعیت صفات از آرژنین افزوده بر اساس مقادیر ضرایب تبیین ( $R^2$ ) بالا، سطح معنی‌دار بودن ( $P$ -value) و کمترین میزان میانگین مربعات اشتباه ( $ms_e$ )، صورت گرفت.

#### نتایج و بحث

اثر آرژنین و گوانیدینواسیتیک اسید بر صفات تولیدی، وضعیت تغذیه و ایمنی مرغ مادرگوشی در جدول ۲، ارائه شده است. در ادامه به تفکیک بررسی می‌گردد.

#### تولید و وضعیت تغذیه

مطابق با جدول ۲، اثر منابع تغییر بر صفات سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی و قابل جوجه‌کشی به ازای هر پرنده از ۵۴ تا ۶۳ هفتگی معنی‌دار نبود ( $P < 0.05$ ). با این وجود سایر محققین تولید تخم‌مرغ را به عنوان تابعی از افزودن آرژنین به جیره و افزایش نسبت آرژنین به لیزین بیان نمودند (باسیونی ۲۰۰۹، سیلوا و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعه سیلوا و همکاران (۲۰۱۲)، کاهش تولید تخم‌مرغ در سطوح بالاتر از ۱/۲۶۲ درصد آرژنین گزارش شد، احتمالاً به دلیل عدم تعادل اسیدهای آمینه و انرژی مصرفی برای متابولیسم و همچنین انرژی مورد نیاز

<sup>1</sup> Least square means

<sup>2</sup> None linear

<sup>3</sup> Mean square error

(خلجی و همکاران ۱۳۹۲). در مطالعاتی تأثیر آرژنین بر پاسخ ایمنی با افزودن آرژنین به جیره مشاهده شد (خواج‌علی و وایدمن، ۲۰۱۰).

جدول ۲- تأثیر سطوح افزایشی آرژنین و گوانیدینوآستیک اسید بر صفات تولیدی، تغذیه و تیتر آنتی‌بادی علیه گلبول قرمز

گوسفند در مرغ‌های مادرگوشتی تغذیه شده با سطوح افزایشی آرژنین در جیره پایه با کمبود آرژنین

Table 2- Effect of Arginine and supplemental guanidino acetic acid (GAA) on production, nutrition and antibody titer against SRBC of broiler breeder hens fed graded levels of Arg in an Arg-deficient basal diet

ایمونوگلوبولین G	تیتراعیار پادتن علیه پادگن گلبول قرمز گوسفند	شاخص پوشش پر در سن ۶۳ هفتگی	مدت زمان مصرف جیره روزانه (دقیقه) در سن ۶۲ هفتگی	تعداد سرانه کل تخم‌مرغ قابل جوجه‌کشی تولیدی از ۵۴ تا ۶۳ هفتگی	تعداد سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی از ۵۴ تا ۶۳ هفتگی	تیمار Treatment	آرژنین Arg <sup>1</sup>
IgG <sup>8</sup>	Anti SRBC <sup>7</sup>	FSC <sup>6</sup>	CUT <sup>5</sup> (min)	HHHE <sup>4</sup>	HHTE <sup>3</sup>	GAA <sup>2</sup>	آرژنین Arg <sup>1</sup>
3.60 ± 0.36	5.36 <sup>b</sup> ± 0.40	4.60	71.25 <sup>c</sup>	22.56	27.78	0	0
4.45 ± 0.39	6.00 <sup>ab</sup> ± 0.43	4.63	62.50 <sup>c</sup>	25.18	29.90	0.3	0.3
4.96 ± 0.35	6.88 <sup>a</sup> ± 0.39	4.60	113.38 <sup>b</sup>	22.80	28.20	0.6	0.6
4.21 ± 0.35	5.67 <sup>b</sup> ± 0.39	4.69	194.13 <sup>a</sup>	20.28	24.79	0.9	0.9
		0.13	12.27	2.06	2.32	SEM	اشتباه معیار
4.32 ± 0.26	5.94 ± 0.29	4.69	112.19	22.40	27.25	0	
4.29 ± 0.25	6.01 ± 0.27	4.57	108.44	23.00	28.08	0.12	
		0.09	8.67	1.46	1.64	SEM	اشتباه معیار
3.33 ± 0.51	5.14 ± 0.56	4.49	54.50	24.44	30.90	0	0
3.86 ± 0.51	5.57 ± 0.56	4.71	88.00	20.68	24.65	0.12	0
4.40 ± 0.61	6.00 ± 0.67	4.62	63.75	24.35	28.25	0	0.3
4.50 ± 0.48	6.00 ± 0.53	4.64	61.25	26.02	31.56	0.12	0.3
5.43 ± 0.51	7.00 ± 0.56	4.85	107.50	22.62	27.34	0	0.6
4.50 ± 0.48	6.75 ± 0.53	4.34	119.25	22.98	28.96	0.12	0.6
4.13 ± 0.48	5.63 ± 0.53	4.79	223.00	18.22	22.40	0	0.9
4.29 ± 0.51	5.71 ± 0.56	4.58	165.25	22.33	27.17	0.12	0.9
		0.18	17.35	2.95	3.27	SEM	اشتباه معیار
			<i>p-value</i>				
0.08	<0.05	0.96	<0.0001	0.43	0.48		آرژنین Arg
0.92	0.81	0.38	0.76	0.78	0.72		GAA
0.53	0.91	0.25	0.08	0.60	0.36		GAA×Arg
			<i>p-value</i> (تابعیت صفات از آرژنین افزوده)				Regression
0.11	0.33	0.18	<0.0001	0.17	0.11		خطی linear
0.02	<0.07	0.60	0.002	0.50	0.73		درجه ۲ quadratic
0.26	0.36	0.63	0.56	0.94	0.69		درجه ۳ cubic

<sup>a,b,c</sup>Lsmeans within each column without common superscript are significantly different (P<0.05)

<sup>1</sup>Arginine, <sup>2</sup> Guanidinoacetic Acid, <sup>3</sup> Hen Housed Total Egg (week 54-63), <sup>4</sup> Hen Housed Hatching Egg (week 54-63),

<sup>5</sup>Clean Up Time (week 62), <sup>6</sup>Feather score(week 63), <sup>7</sup> Antibody titer against Sheep Red Blood Cells, <sup>8</sup>

Immunoglobulin G

**باروری و نفوذ اسپرم**

مطابق مطالعه شریده و همکاران (۲۰۱۶)، اثر متقابل آرژنین و *GAA* بر باروری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). افزودن *GAA* در سطح صفر آرژنین باعث ۲۴ درصد افزایش نفوذ اسپرم شد. باروری بهینه در ارتباط با کیفیت اسپرماتوزوآ است که می‌تواند از *ATP* موجود در مایع سمینال دستگاه تناسلی در مسیر رسیدن به تخمک استفاده کند و لایه پری‌ویتلین موجود در صفحه زایا را هیدرولیز نماید (مورا کامی و همکاران ۲۰۱۳). مایع دستگاه تولیدمثلی حیوانات حاوی مقادیر بالایی از کراتین و کراتین فسفات است و می‌تواند به طور مستقیم با اثر بر تحرک فلاژلا، متابولیسم اسپرماتوزوآ را بهبود دهد. در مطالعه مورا کامی و همکاران (۲۰۱۳)، کراتین و *GAA* تخم‌مرغ با افزودن *GAA* به جیره بلدرچین مادر، افزایش یافت و رابطه مستقیم بین قابلیت جوجه‌درآوری و محتوای کراتین تخم‌مرغ گزارش شد.

**تعیین نیاز آرژنین**

جدول ۳ و ۴، معادلات تعیین نیاز آرژنین برای صفات عملکردی شامل سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی، سرانه کل تخم‌مرغ قابل جوجه‌کشی، نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین و *IgG* در گروه‌های با جیره فاقد و حاوی *GAA* را نشان می‌دهد. شکل ۱، نمودارهای تابعیت این صفات از آرژنین افزوده در گروه‌های با جیره حاوی ۰/۱۲ درصد *GAA* و فاقد آن را نشان می‌دهد. در گروه‌های فاقد *GAA* سطوح آرژنین افزوده مورد نیاز برای سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی، قابل جوجه‌کشی، نفوذ اسپرم و ایمنی هومورال به ترتیب ۰/۱۲ درصد ( $P\text{-value}=0.24, R^2=0.20$ ), ۰/۱۴ درصد ( $P\text{-value}=0.27, R^2=0.18$ ) و ۰/۱۱ درصد ( $P\text{-value}=0.02, R^2=0.31$ ) برآورد شد.

**جدول ۳- برآورد نیاز آرژنین افزوده مرغ مادرگوشتی با**

**خوراک فاقد *GAA***

**Table3- Estimated Arginine requirement of broiler breeder without *GAA***

معادله مدل	Equation	$R^2$	<i>p-value</i>	<i>ms<sub>e</sub></i>
سرانه تولید تخم‌مرغ <i>HHTE</i> $Y = 31.37 - 4.65 \times (Z_1) - 11.30 \times (Z_2)$		0.20	0.24	43.05
سرانه تولید تخم‌مرغ قابل جوجه‌کشی <i>HHHE</i> $Y = -11.98x^2 + 3.99x + 24.38$		0.18	0.27	35.30
نفوذ اسپرم (هفتمین روز پس از تلقیح) <i>Sperm penetration</i> (day 7) $Y = 1.72 - 1.10 \times (Z_1) - 0.03 \times (Z_2)$		0.31	0.002	0.05
ایمنی ( <i>IgG</i> ) $Y = 5.44 - 3.33 \times (Z_1) - 4.49 \times (Z_2)$		0.33	0.008	1.23

*Y*, عملکرد؛ *x*, سطح آرژنین افزوده (درصد خوراک)؛  $Z_1, (R-x)$ ؛  $Z_2, (x-R)$ ؛ *R*, سطح نیاز آرژنین افزوده (درصد خوراک)؛  $R^2$ , ضریب تبیین؛ *P-value*, سطح معنی‌داری معادله مدل؛ و *ms<sub>e</sub>* میانگین مربعات اشتباه

*Y*, performance; *x*, Added Arg level(%feed);  $Z_1, (R-x)$ ;  $Z_2, (x-R)$ ; *R*, estimated added Arg demand (%feed);  $R^2$ , Coefficient of Determination; *P-value*, The significance level of model equation; *ms<sub>e</sub>*, Mean Square Error;

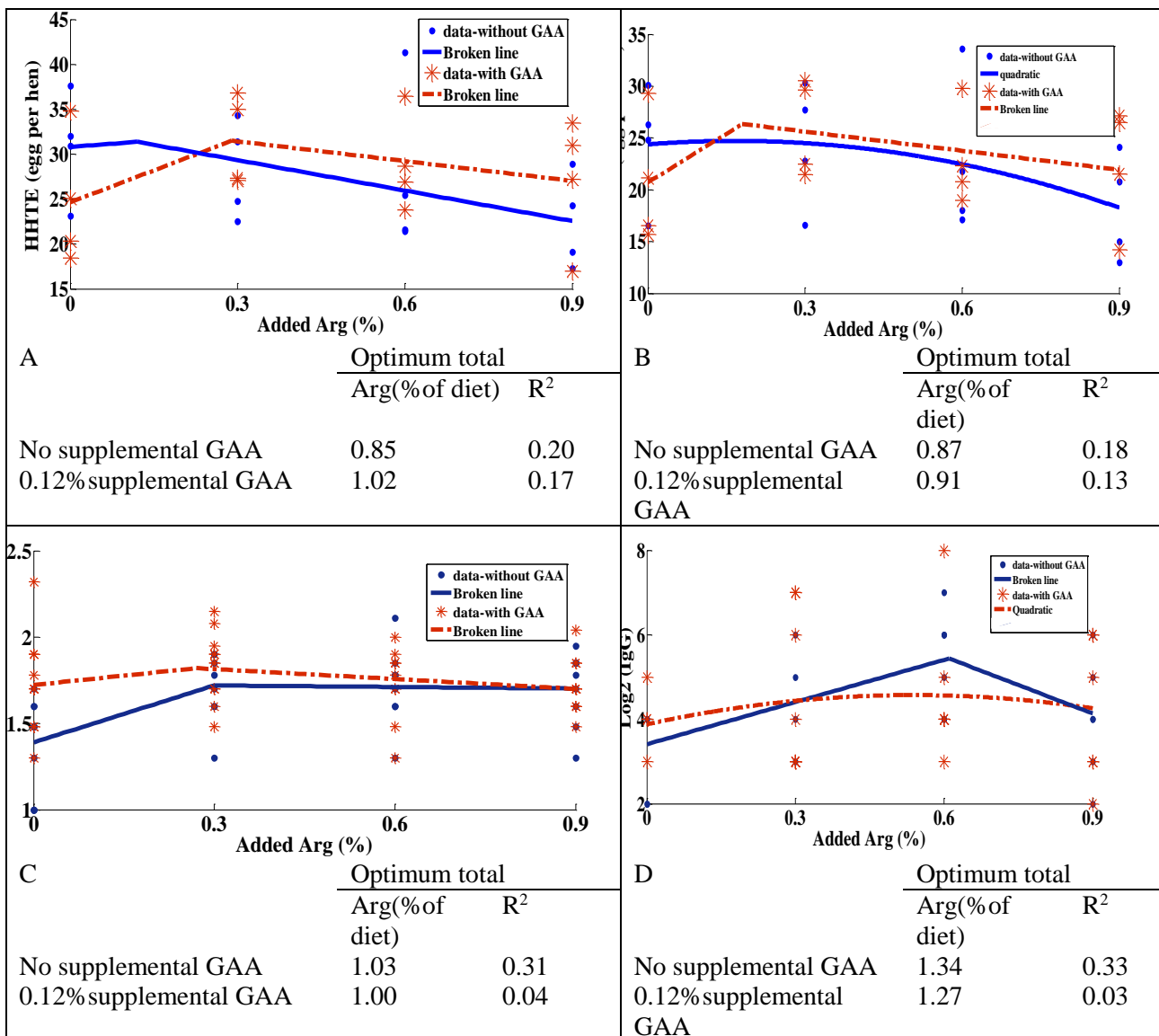
**جدول ۴- برآورد نیاز آرژنین افزوده مرغ مادرگوشتی با**

**خوراک حاوی *GAA***

**Table4- Estimated Arginine requirement of broiler breeder with *GAA***

معادله مدل	Equation	$R^2$	<i>p-value</i>	<i>ms<sub>e</sub></i>
سرانه تولید تخم‌مرغ <i>HHTE</i> $Y = 31.5 - 23.63 \times (Z_1) - 7.33 \times (Z_2)$		0.17	0.29	37.13
سرانه تولید تخم‌مرغ قابل جوجه‌کشی <i>HHHE</i> $Y = 26.35 - 31.37 \times (Z_1) - 6.15 \times (Z_2)$		0.13	0.39	27.72
نفوذ اسپرم (هفتمین روز پس از تلقیح) <i>Sperm penetration</i> (day 7) $Y = 1.82 - 0.36 \times (Z_1) - 0.19 \times (Z_2)$		0.04	0.46	0.05
ایمنی ( <i>IgG</i> ) $Y = -2.38x^2 + 2.57x + 3.88$		0.03	0.65	2.24

*Y*, performance; *x*, Added Arg level(%feed);  $Z_1, (R-x)$ ;  $Z_2, (x-R)$ ; *R*, estimated added Arg demand (%feed);  $R^2$ , Coefficient of Determination; *P-value*, The significance level of model equation; *ms<sub>e</sub>*, Mean Square Error;



شکل ۱- تابعیت صفات عملکردی شامل (A) سرانه کل تخم‌مرغ تولیدی، (B) سرانه تخم مرغ قابل جوجه‌کشی، (C) نفوذ اسپرم در لایه پری ویتلین در هفتمین روز تلقیح مصنوعی به عنوان نرخ باروری و (D) ایمونوگلوبولین G به عنوان ایمنی از آرژنین افزوده (% خوراک) و برآورد نیاز آرژنین افزوده با مدل‌های خط شکسته و درجه دو

**Figure 1- Regression models fitted to Hen Housed Total Eggs(A), Hen Housed Hatched Eggs(B), Sperm penetration in the perivitelline layer as fertility rate(C) and Immunoglobulin G(IgG) as immune responses(D) data of birds fed graded levels of Arg in an Arg-deficient basal diet in the absence and presence of GAA to estimate added Arginine requirement**

نقطه و ستاره به ترتیب نشان‌دهنده داده‌های پرندگان با گروه‌های خوراک فاقد و حاوی ۰/۱۲٪ گوانیدینوآستیک اسید است. (Added Arg) ، سرانه تولید تخم‌مرغ کل (به ازای هر مرغ) HHHE ، سرانه تولید تخم‌مرغ قابل جوجه‌کشی (به ازای هر مرغ) SP ، نفوذ اسپرم در لایه پری ویتلین؛ IgG ، تیترا ایمونوگلوبولین G)؛

Dot and star symbols represent data from birds receiving 0 and 0.12% supplemental GAA, respectively

The fitted responses (Y) vs. supplemental added Arg concentration (X in % of diet) were broken line and quadratic (table 3 and 4). The optimal supplemental added Arg concentration for HHTE, HHHE, LogSP+1 and Log<sub>2</sub> IgG were 0.12, 0.14, 0.3 and 0.61% of the diet in the absence and 0.29, 0.18, 0.27 and 0.54% in the presence of GAA, respectively. Optimal Arg concentrations shown in each panel represent the total Arg concentration, which accounts for the analyzed dietary Arg contained in the practical basal diet Arg (0.73% Arg).



خواجه‌علی و وایدمن (۲۰۱۰)، با ارائه شواهدی از نقش نیتریک اکساید (*NO*) در پیشگیری از ابتلا به سندرم فشار بالای ریوی (*PHS*)، بیان نمودند که احتیاجات *NRC* (۱۹۹۴)، نمی‌تواند با سخگوی حداکثر ر شد، یا سخ ایمنی و پیشگیری از *PHS* در طیور پرورش یافته تحت شرایط محیطی با پتانسیل ابتلا به *PHS* باشد. به طور مشابه در آزمایش حاضر نیز نیاز آرژنین برای حداکثر تیترا آنتی‌بادی ۰/۵۸ درصد بیش از نیاز آرژنین برای تولید تخم‌مرغ است. کاهش آرژنین مورد نیاز برای حداکثر نفوذ اسپرم به لایه پری‌ویتلین با افزودن *GAA* به خوراک، بیانگر قابلیت *GAA* در تعدیل نیاز آرژنین خوراک برای حفظ باروری است.

#### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این آزمایش احتیاجات آرژنین بیش از سطح توصیه شده توسط راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸ است. *GAA*، جایگزین مؤثر آرژنین برای بیشینه تولید در جیره پایه با مشخصه کمبود در آرژنین و نسبت پایین آرژنین به لیزین نبود. در حالیکه افزودن *GAA* به جیره با مشخصه کمبود آرژنین، باروری را تا ۴۳/۷۵ درصد افزایش داد و عملکردی معادل سطح ۰/۳۴ درصد آرژنین افزوده در جیره فاقد *GAA* داشت.

#### قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی شرکت ایوانیک دگوسا انجام شد. از مدیریت و کارشناسان فنی آن شرکت تقدیر و تشکر می‌گردد. همچنین از مدیریت و کارشناسان شرکت آرتا جوجه اردبیل به خاطر تأمین مرغ‌های مادر سپاسگزاری می‌شود.

در جیره حاوی *GAA*، سطوح آرژنین مورد نیاز برای صفات مذکور به ترتیب ۰/۲۹ درصد ( $R^2=0/17$ )،  $P$ -value = ۰/۲۹، ۰/۱۸ درصد ( $R^2=0/13$ )،  $P$ -value = ۰/۳۹، ۰/۲۷ درصد ( $R^2=0/04$ )،  $P$ -value = ۰/۴۶ و ۰/۵۴ درصد ( $R^2=0/03$ )،  $P$ -value = ۰/۶۵ برآورد شد. با افزودن مقادیر برآورد شده به آرژنین جیره پایه، نیاز آرژنین برای این صفات به ترتیب در سطح ۰/۸۵، ۰/۸۷، ۰/۰۲ و ۱/۳۴ درصد در جیره فاقد *GAA* و ۱/۰۲، ۰/۹۱، ۰/۰۰ و ۱/۲۷ درصد در جیره حاوی *GAA*، تعیین شد؛ که مغایر با نیاز توصیه شده توسط راهنمای پرورشی سویه راس ۳۰۸ (۲۰۱۳) برابر با ۰/۷۷ درصد برای انتهای دوره پرورش است. همچنین نیاز این پرنده در مرحله اول پرورش، ۰/۷۹ درصد پیشنهاد شده است، در حالیکه در مطالعه سیلوا و همکاران (۲۰۱۲)، سطح آرژنین بهینه براساس تابعیت درجه دو، ۱/۲۶۲ درصد گزارش شد که بیش از ۱/۵ برابر نیاز توصیه شده است. همبستگی مثبت و بالا بین نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین و سایر شاخص‌های باروری گزارش شده است (گمولکا و کاپکاسکا ۲۰۰۵). افزودن آرژنین باعث افزایش خطی باروری و نفوذ اسپرم در لایه پری‌ویتلین در سومین روز پس از تلقیح مصنوعی شد؛ از این رو تعیین نیاز برای صفت باروری براساس نفوذ اسپرم در هفتمین روز پس از تلقیح صورت گرفت (شکل ۱، بخش C). افزودن *GAA* در سطح کمبود آرژنین (جیره پایه) باعث نفوذ اسپرم معادل پاسخ در سطح ۰/۳۴ درصد آرژنین افزوده با جیره فاقد *GAA* شد، نشان‌دهنده قابلیت *GAA* در یدک کردن آرژنین جیره برای صفت باروری است. دامنه احتیاجات آرژنین طیور تحت تأثیر وضعیت جیره، دما، تراکم گله و تنش بیماری‌ها به شدت متغیر است.

#### منابع مورد استفاده

- AOAC, 2006. Official Methods of Analysis, 18<sup>th</sup> ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.  
Basiouni GF, 2009. The effect of feeding an extra amounts of arginine to Local. Saudi Hens on luteinizing hormone secretion. Journal of Biological Sciences 9(6):617-620.

- Becker LJ and Rudback JA, 1979. Altered antibody responses in mice treated with toxins for macrophages. *Journal of the Reticuloendothelial Society*. 25:443-454
- Bramwell RK, Marks HL and Howarth B, 1995. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. *Poultry science* 74 1875-1883.
- Dilger RN, Bryant-Angeloni K, Payne RL, Lemme A, and Parsons CM, 2013. Dietary guanidinoacetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. *Poultry science* 92:171-177
- Fu WJ, Haynes TE, Kohli R, Hu J, Shi W and Spencer TE, 2005. Dietary l-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Nutrition* 135: 714- 21.
- Gharib HBA, Desoky AA, El-Menawey MA, Abbas AO, Hendricks GL and Mashaly MM, 2008. The role of photoperiod and melatonin on alleviation of the negative impact of heat stress on broilers. *International Journal of Poultry science* 7(8):749-756.
- Gumułka M and Kapkowska E, 2005. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. *Animal Reproduction Science* 90: 135-148
- Kafilzadeh F, Hojabri F, Sarwar A and Hajjarian H, 2010. *Biology of domestic animal breeding*, Razi University Kermanshah
- Khajali F and Wideman RF, 2010. Dietary arginine: metabolic, environmental, immunological and physiological interrelationships. *World's Poultry Science Journal*, Vol 66.
- Khalaji S, Zaghari M, Ganjkanlou M and Ghaziani F, 2013 Evaluating the effects of using high viscosity Hydroxypropylmethylcellulose, Soy Isoflavone and Arginine to reduce the effects of obesity in broiler breed. *Journal of Veterinary Research*. 68, 3: 1-5
- Leeson S and Summers JD, 2001. *Nutrition of the chicken*. 4th ed. Guelph University Books-608pages.
- Lemme A, Ringel J, Rostagno HS and Redshaw MS, 2007a. Supplemental guanidinoacetic acid improved feed conversion, weight gain, and breast meat yield in male and female broilers. Pp.1-4. in Proc. XVI Eur. Symp. On Poultry Nutrition, Strasbourg, France.
- Lemme A, Ringel J, Sterk A and Young JF, 2007b. Supplemental guanidinoacetic acid affects energy metabolism of broilers. Pp. 339-342 in Proc. XVI Eur. Symp. On Poultry Nutrition, Strasbourg, France.
- Michiels J, Maertens L and Buyse J, 2012. Supplemental guanidinoacetic acid to broiler diets: effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism. *Poultry Science* 91:402-412.
- Murakami AE, Rodrigueiro RJB, Santos TC, Ospina-Rojas IC and Radmacher M ,2013.: 19<sup>th</sup> European Symposium on Poultry Nutrition, Potsdam, Germany and internal report Evonik Brazil.
- Reyes MC, Salas C and Coon CN, 2012. Metabolizable Energy Requirements for Broiler Breeder in Different Environmental Temperatures, *International Journal of Poultry Science* 11 (7): 453-461
- Ringel J, Lemme A, Araujo LF, 2008. The effect of supplemental guanidine acetic acid in Brazilian type broiler diets at summer conditions *Poultry science*. 87(Suppl.1): 154.
- Ross 308 Parent stock, 2013. *Nutrition Specifications*.
- SAS Institute, 2002. *SAS User's Guide*, Version 9 Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Sharide H, Esmailnia L, Zaghari M, Zandi M, Akhlaghi A and Lotfi L, 2016. Effect of feeding guanidinoacetic acid and L-arginine on the fertility rate and sperm penetration in the perivitelline layer of aged broiler breeder hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100: 316-322.
- Sikur VR, Robinson FE, Korver D R, Renema RA and Zuidhof M J, 2004. Effects of nutrient density on growth and carcass traits in fast- and slow-feathering female turkeys. *Poultry science* 83:1507-1517.
- Silva LMGS, Murakami AE, Fernandes JIM, Dalla Rosa D and Urganian JF, 2012. Effects of dietary arginine supplementation on broiler breeder egg production and hatchability. *Brazilian Journal of Poultry Science*.
- Zaghari M, Sedaghat V and Shivazad M, 2013. Effect of vitamin E on reproductive performance of heavy broiler breeder hens. *The Journal of Applied Poultry Research* 22: 808-813.

## Capacity of guanidoacetic acid to spare dietary arginine and determination of arginine requirement of broiler breeder at the final phase of egg production

L Esmaili nia<sup>1\*</sup>, M Zaghari<sup>2</sup> and S N Mousavi<sup>3</sup>

Received: April 6, 2016 Accepted: April 3, 2017

<sup>1</sup>MSc, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

<sup>2</sup>Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Animal Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

\*Corresponding author: esmaily.lida@alumni.ut.ac.ir

**Introduction:** Researches on the effects of dietary Arginine (Arg) and Guanidoacetic acid (GAA) indicated that requirements for Arg in poultry diets vary significantly depending on feed composition, disease challenges and environmental conditions (Khajali and Wideman, 2010). Reproductive performance and fertility of broiler breeder flock are decreased sharply with ageing (Zaghari et al. 2013). It is suggested that the age-related decrease in fertility is more pronounced in females, in which the efficiency of sperm storage tubules decreases (Gomulka and Kapkowska, 2005). Silva et al. (2012) reported that dietary inclusion of Arg improved egg weight and egg production in broiler breeder hens. It has been reported that GAA supplementation improved hatchability and total fertility of eggs (Murakami et al. 2014). GAA may be beneficial in poultry diets because it may be able to spare Arg; this is an important point considering Arg is the fifth limiting AA in corn-soybean diets for poultry (Dilger et al 2013). This study was conducted to evaluate arginine requirement of broiler breeder hens in practical diet and investigating of the spare effect of GAA for Arg, as well.

**Material and methods:** A total of 320 Ross 308 broiler breeder hens in a factorial arrangements were assigned to eight treatments (two concentrations of GAA (0 and 0.12%) × four concentrations of L-Arginine (0, 0.3, 0.6, and 0.9%)) with four replicates during 54 to 63 wk. of age. The hens received a practical diet containing 2800 kcal ME/kg and 13% CP. Basal diets were formulated to be singly deficient in Arg (73%). From 54 to 63 weeks of age. The number of produced eggs was recorded daily. At the end of experiment, the following parameters were studied: feed clean up time, feather score, IgG and antibodies against SRBC as immune responses. When the hens were 62 weeks old, the time taken by the hens to consume all the feed was measured. At 63 weeks old, feather coverage of the back of each hen was scored on a scale of 1 to 5, following modification to the system reported by Sikur et al. (2004). At 61 week of age, 2 birds, from each treatment group, were injected, intramuscularly, with 0.2 mL of 5% SRBC suspension prepared in 0.9% physiological saline. One week following the injection, the antibody production against SRBC was measured using microhemagglutination technique. Blood samples were collected from each treatment group. Antibody values were expressed as log<sub>2</sub> of the reciprocal dilution where the last agglutination was observed (Gharib et al, 2008). To evaluate the fertility, the hens were inseminated with 250µl [100 × 10<sup>6</sup> sperm/hen; diluted in a modified Beltsville extender without lecithin and glycerol] of the pooled semen at 61 and 62 weeks of age. The eggs were collected during 2 through 8 day following each insemination. The eggs were incubated for further analysis of fertility. Sperm penetration holes in the inner perivitelline layer overlying the germinal disc were enumerated on days 3 and 7 following each insemination (Sharide et al. 2015) as fertility. Arg requirement was determined by using broken line model, linear and non-linear regressions according to performance and dietary Arg concentration.

**Results and discussion:** Effects of added Arg and GAA on the total hen housed egg production, hen housed hatching egg production and feather coverage was not significant (P<0.05) (Table 2). Although the most hen housed total egg production was resulted in 0.3% added Arg supplemented with GAA and addition of Arg increased frequency of birds with full back feather coverage (feather

score of 5). Feed clean up time was significantly become longer about two times, in 0.6% and 0.9% of added Arg. The results showed that the interaction of Arg and GAA was significant on fertility (Sharide et al. 2015). GAA may be important for poultry nutrition not only as a replacement for dietary Arg, an essential nutrient, but also to support overall energy homeostasis of the bird (Dilger et al. 2013). The efficacy of GAA as a creatine precursor has been shown in broilers (Michiels et al. 2012), It has been reported that GAA was successfully absorbed by gastrointestinal tract of avian and there is a carry-over on the fluid of the reproductive tract; supplementation with GAA may be important to provide additional levels of creatine in the female reproductive tract, enabling the maintenance of the viability of a greater number of spermatozoa until they are used to perform fertilization, considering that birds may store spermatozoa after mating for long periods of time in the tubular gland of the uterovaginal junction and that creatine may improve the stability of cellular membranes (Murakami et al. 2014). Increasing dietary level of Arg resulted significant effect on anti SRBC. Dietary Arg levels and GAA did not affect ( $P > 0.05$ ) on IgG production, although the regression of IgG was quadratic ( $P < 0.05$ ) according to the increase in dietary Arg levels. The requirement of Arg during immunological responses has been widely studied because Arg is the substrate from which nitric oxide (NO) is generated. Nitric oxide also is a modulator of certain immune functions. It has been reported that Arg levels sufficient to support maximal performance rates are not adequate (Khajali and Wideman. 2010). Arg requirement for egg production, fertility and immunity were determined for breeders; four equations were developed from the feeding experiment to predict Arg needs for breeders in the absence (Table 3) and presence of 0.12% GAA (Table 4). The Broken line and quadratic responses allowed parameters to vary by supplemental Arg and GAA levels. When GAA was added to the Arg-deficient diet, there were improvements in both fertility and immunity (Fig 1). Digestible Arg required for hen housed total egg production, hen housed hatching egg production, sperm penetration and IgG in the absence of GAA, estimated 0.85, 0.87, 1.03 and 1.27%, respectively and in the presence of 0.12% GAA estimated 1.02, 0.91, 1.00 and 1.34%, respectively. Fitted regression of hen housed egg production, which was estimated Arg requirement, is in agreement with other observations of recent work (Silva et al. 2012).

**Conclusion:** The results of this study revealed that, recommendation of Ross 308 management guide for Arg requirement is underestimated. This work suggested that GAA could increase performance of birds fed Arg-adequate corn-soybean meal diets. GAA spared part of Arg function for fertility.

**Keywords:** arginine - broiler breeder - guanidinoacetic acid - requirement