

## بررسی تغییرات هورمونی، پاسخ ایمنی و زمان بازگشت به تولید در مرغان تخمگذار تغذیه شده با جیره تولک حاوی پودر یونجه

احسان شهرامی<sup>۱\*</sup> حسن رکنی<sup>۲</sup>

۱) گروه علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، قزوین، ایران

۲) سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱ مرداد ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۳ آبان ماه ۱۳۹۶)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** استفاده از روش گرسنگی می‌تواند سبب وارد شدن استرس شدید فیزیولوژیک و تأثیرات نامطلوب بر روی عملکرد سیستم ایمنی پرنده شده و عملکرد پس از تولک را تحت تأثیر قرار دهد. هدف: هدف از انجام این تحقیق بررسی تغییرات غلظت هورمون‌های کورتیکو استرون و تیروئید و همچنین پاسخ ایمنی در خلال دوره تولک در مرغان تخمگذار تغذیه شده با جیره تولک حاوی پودر یونجه بود. روش کار: ۱۰۸ قطعه مرغ تخمگذار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۶ تکرار انتخاب شدند. تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش جهت اعمال تولک بری پرنده‌ها به مدت ۱۲ روز شامل: ۱- گروه شاهد تغذیه شده با جیره تخمگذاری (FF) ۲- گروه محروم از غذا (FW) ۳- گروه تغذیه شده با جیره تولک حاوی ۹۰ درصد پودر یونجه به همراه ۱۰٪ جیره تخمگذاری (A۹۰)، بودند. نتایج: نتایج نشان دادند که جمعیت کل سلول‌های سفید خون در گروه FW در مقایسه با سایر گروه‌ها پایین‌تر بود ( $p < 0/05$ ). نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روزهای سوم و ششم تولک در گروه FW بیشترین افزایش را نشان داد ( $p < 0/05$ ). غلظت هورمون کورتیکواسترون در روز سوم تولک در گروه FW بالاتر از گروه A۹۰ بود ( $p < 0/05$ ). غلظت هورمون T۳ در خلال دوره تولک در مرغ‌های تولک رفته در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). غلظت هورمون T۴ در خلال دوره تولک در مرغ‌های تولک رفته در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ( $p < 0/05$ ). زمان بازگشت به تولید و زمان رسیدن به ۵۰ و ۸۰٪ تولید در گروه A۹۰ در مقایسه با گروه FW به طور معنی‌داری کوتاه‌تر بود ( $p < 0/05$ ). نتیجه‌گیری نهایی: پودر یونجه ضمن ایجاد عملکرد مطلوب در تولک‌بری سبب کاهش استرس فیزیولوژیک و عملکرد مناسب‌تر پاسخ ایمنی نسبت به روش گرسنگی، در جریان تولک بری گردید.

واژه‌های کلیدی: پودر یونجه، تولک بری اجباری، کورتیکواسترون، مرغان تخمگذار، هورمون‌های تیروئید

### مقدمه

استرس ناشی از تولک‌بری با گرسنگی و همچنین در راستای احترام به آسایش و حقوق حیوانات روش‌های جایگزین متعددی با این روش پیشنهاد شده‌اند (۲، ۲۲). اکثر این روش‌های تغذیه‌ای بر پایه ایجاد عدم توازن یک یا چند ماده مغذی در جیره تولک از طریق افزایش یا کاهش بیش از حد یک ماده معدنی خاص هستند (۲). اخیراً نیز استفاده از جیره‌های حاوی فیبر بالا به عنوان رژیم‌های غذایی قابل استفاده در برنامه‌های تولک‌بری مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۶، ۱۷، ۹). فیبر رژیم غذایی نمی‌تواند توسط فرآیندهای داخلی حیوان میزبان هضم شود در عوض میکروارگانیسم‌های موجود در انتهای دستگاه گوارش می‌توانند آنرا متابولیزه نمایند. این خوراکی‌ها می‌توانند دستگاه گوارش حیوان را از طریق تغییر در فعالیت‌های میکروبی و نرخ عبور مواد و متابولیت‌ها متحول سازند و سبب بهبود اثرات مفید فیزیولوژیکی و کاهش استرس شوند (۲۵). استفاده از یونجه در تغذیه پرندگان تخمگذار همواره به عنوان یک افزایش دهنده رنگدانه تخم مرغ و نیز به عنوان یک منبع پروتئین مد نظر بوده است. یونجه به واسطه مقدار پایین انرژی قابل متابولیسم و سرعت عبور کند از دستگاه گوارش که سبب ایجاد احساس سیری می‌شود، به عنوان یک رژیم غذایی تولک‌بری، دارای قابلیت بالقوه است. ساپونین موجود در یونجه نیز سبب کاهش مصرف خوراک و وزن بدن می‌گردد (۹).

در گله‌های مرغان تخمگذار تجاری یکی از هزینه‌های اساسی، جایگزینی بولتهات است، از این رو تولید کنندگان تخم مرغ معمولاً جهت دستیابی به دوره‌های مستعد تخمگذاری از روش تولک‌بری اجباری مرغ‌ها استفاده می‌کنند (۲). اکثر تولیدکنندگان از روش حذف کامل خوراک برای تولک‌بری اجباری مرغ‌ها به دلیل اثربخشی بالا و سهولت در اجرای آن استفاده می‌کنند (۲۶). اما تحقیقات اخیر حاکی از اثرات منفی استفاده از محرومیت طولانی مدت غذایی برای تولک‌بری اجباری در پرندگان حکایت دارد (۲۵، ۲۲). گزارش شده که تعداد و جمعیت تفریقی سلول‌های سفید خون در جریان اعمال رژیم‌های مختلف تولک‌بری دستخوش تغییر می‌شود (۱). گزارش شده که مرغان تخمگذار در سیستم قفس که تحت تولک‌بری توسط حذف کامل خوراک قرار گرفتند افزایش معنی‌داری در نسبت هتروفیل به لنفوسیت نشان دادند (۷). همچنین نشان داده شده که تولک‌بری به وسیله حذف خوراک سبب افزایش سطوح کورتیکواسترون خون و اتوزینوفیلیا شده است (۵، ۷). تولک‌بری از طریق حذف خوراک می‌تواند احتمال درگیری با عفونت ناشی از *Salmonella enterica* را در گله مرغ‌های تخمگذار افزایش دهد (۱۱، ۱۳).

در طی دهه اخیر به واسطه افزایش احتمال ابتلا به عفونت‌ها و افزایش



جدول ۱. ترکیب جیره تخمگذاری. هر کیلوگرم مکمل ویتامینی دارای IU ۸۵۰۰۰۰ ویتامین A، IU ۲۵۰۰۰۰ ویتامین D<sub>3</sub>، IU ۱۱۰۰۰ ویتامین E، mg ۲۲۰۰ ویتامین K<sub>3</sub>، mg ۱۴۷۷ ویتامین B<sub>1</sub>، mg ۴۰۰۰ ویتامین B<sub>2</sub>، mg ۷۸۴۰ ویتامین B<sub>3</sub>، mg ۳۴۶۵۰ ویتامین B<sub>5</sub>، mg ۲۴۶۴ ویتامین B<sub>6</sub>، mg ۱۱۰ ویتامین B<sub>9</sub>، mg ۱۰ ویتامین B<sub>۱۲</sub>، mg ۴۰۰۰۰ کولین کلراید می باشد. هر کیلوگرم مکمل معدنی دارای mg ۷۴۴۰ منگنز، mg ۷۵۰۰۰ آهن، mg ۶۴۶۷۵ روی، mg ۶۰۰۰ مس، mg ۸۶۷ ید و mg ۲۰۰ سلنیوم می باشد.

مواد خوراکی	جیره تخمگذاری
ذرت	۶۷/۶۴
کنجاله سویا	۲۵/۵۷
روغن گیاهی	۲/۰۹
دی کلسیم فسفات	۷/۹۲
کربنات کلسیم	۸/۱
دی ال متیونین	۰/۰۳
نمک	۰/۳۵
مکمل ویتامینی	۰/۲۵
مکمل معدنی	۰/۰۵
آنالیز مواد مغذی	
انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)	۲۸۲۸
پروتئین خام (%)	۱۶/۵
کلسیم (%)	۳/۵
فسفر قابل دسترس (%)	۰/۴۸
سدیم (%)	۰/۱۸
متیونین (%)	۰/۳۳
لیزین (%)	۰/۹
اسید لینولیک (%)	۷/۶۹

تاریکی در روز انجام شد و کلیه گروه‌ها با یک جیره تخمگذاری معمول تغذیه شدند. تولید تخم مرغ پرنده‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی به مدت ۱۲ هفته پس از دوره تولک اندازه گیری و ثبت گردید.

**زمان‌های مختلف تولید:** زمان‌های مختلف تولیدی پرندگان شامل زمان توقف تولید پس از شروع برنامه تولک‌بری (میانگین زمان توقف کامل تولید برای تکرارهای مختلف هر تیمار)، زمان بازگشت به تولید از خاتمه دوره تولک (میانگین زمان شروع به تولید تکرارهای مختلف برای هر تیمار)، زمان رسیدن به ۵۰٪ تولید (میانگین زمان رسیدن به ۵۰٪ تولید برای تکرارهای مختلف هر تیمار) و زمان رسیدن به ۸۰٪ تولید (میانگین زمان رسیدن به ۸۰٪ تولید برای تکرارهای مختلف هر تیمار) برای گروه‌های مختلف آزمایشی انجام شد.

**تجزیه آماری:** در پایان داده‌های حاصله در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد.

## نتایج

نتایج مربوط به تغییرات جمعیت کل سلول‌های سفید خون مرغ‌ها در

## مواد و روش کار

در این آزمایش از ۱۵۰ قطعه مرغ تخمگذار تجاری از سویه های-لاین (W36) در سن ۷۴ هفته‌گی استفاده شد. رکورد تولید تخم مرغ پرنده‌ها پیش از شروع آزمایش در یک دوره ۴ هفته‌ای در قفس‌های انفرادی و با استفاده از یک جیره تخمگذاری معمولی مورد اندازه گیری قرار گرفت. پس از طی این مدت، ۱۰۸ قطعه پرنده سالم با تولید مشابه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۶ تکرار (هر تکرار شامل ۶ پرنده)، انتخاب و جهت ورود به فرآیند تولک بری، به قفس‌های آزمایشی (۲ پرنده در هر قفس) منتقل شدند.

**تولک بری:** تیمارهای تولک بری مورد استفاده در این آزمایش شامل: گروه شاهد (دریافت کننده جیره کامل تخمگذاری)، گروه محروم از غذا (گرسنه) و گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به همراه ۱۰٪ جیره تخمگذاری بودند (جدول ۲). تمامی گروه‌ها در خلال دوره تولک دسترسی آزاد به آب آشامیدنی داشتند. یک هفته پیش از شروع تولک بری، برنامه نوری به ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی در روز تغییر داده شد. پرنده‌ها برای مدت ۱۲ روز تولک برده شدند.

**خون گیری:** خون گیری در ۵ مرحله و در خلال دوره تولک در روزهای صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ به منظور شمارش تفریقی سلول‌های سفید خون شامل تعیین جمعیت کل سلول‌های سفید، درصد لنفوسیت، درصد هتروفیل، درصد مونوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت و همچنین اندازه گیری هورمون‌های تیروئید و کورتیکواسترون انجام شد. خونگیری از سیاهرگ زیر بال از ۶ پرنده از هر تیمار به مقدار ۶ ml به عمل آمد و خون حاصله در دو لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقادی EDTA یکی جهت اندازه گیری غلظت هورمون‌های تیروئید و کورتیکواسترون (۷) و دیگری جهت تعیین درصد جمعیت سلول‌های خونی ریخته شد (۱). پلاسما حاصله از نمونه‌ها پس از سانترفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد. جهت شمارش تفریقی سلول‌های سفید خون نیز پس از تهیه گسترش خونی مناسب از روش رنگ آمیزی گیسما استفاده شد. غلظت هورمون‌های تیروئید (T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub>) و هورمون کورتیکواسترون نیز به روش رادیوایمنواسی (RIA) و با استفاده از کیت REF KTYCT ساخت اسپانیا اندازه گیری شد (۱۴).

**اندازه گیری میزان تحلیل اندامی:** به منظور تعیین میزان تغییرات وزنی اندام‌های مختلف بدن، در پایان روز دوازدهم تولک ۶ پرنده از هر تیمار کشتار شدند و وزن نسبی برای اندام‌های تخمدان، اویداکت، کبد، لوزالمعده و طحال با دقت ۰/۰۱ g اندازه گیری و به صورت درصدی از وزن بدن محاسبه شد.

**تحریک نوری و بازگشت به تولید:** در پایان دوره ۱۲ روزه تولک، تحریک نوری با استفاده از یک برنامه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت



جدول ۲. وزناندامها بر اساس درصدی از وزن بدن در انتهای دوره تولک در تیمارهای آزمایشی (%). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخمگذاری، FW: گروه محروم از غذا و A۹۰: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ جیره تخمگذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند ( $p < 0.05$ ).

تیمارها	وزن نسبی تخمدان	وزن نسبی اویداکت	وزن نسبی کبد	وزن نسبی لوزالمعده	وزن نسبی طحال
شاهد	۲/۱ <sup>a</sup>	۷/۸۵ <sup>a</sup>	۲/۹۳ <sup>a</sup>	۰/۲۶ <sup>a</sup>	۰/۱۱
FW	۰/۳۶ <sup>b</sup>	۷/۰۷ <sup>b</sup>	۷/۹۷ <sup>b</sup>	۰/۱۹ <sup>b</sup>	۰/۱۲
A۹۰	۰/۳۸ <sup>b</sup>	۷/۲۲ <sup>b</sup>	۲/۰۵ <sup>b</sup>	۰/۱۸ <sup>b</sup>	۰/۱۲
SEM	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۲۱	۰/۰۲	۰/۰۱
p-value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲	۰/۱۵	۰/۹۹

جدول ۳. زمان‌های مختلف تولید مرغ‌ها در تیمارهای آزمایشی (روز). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخمگذاری، FW: گروه محروم از غذا و A۹۰: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ جیره تخمگذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند ( $p < 0.05$ ).

تیمارها	زمان توقف تولید	زمان بازگشت به تولید	زمان رسیدن به ۵۰٪ تولید	زمان رسیدن به ۸۰٪ تولید
شاهد	-	-	۲۳/۱۷ <sup>a</sup>	-
FW	۴/۸۳	۲۰/۳۳ <sup>a</sup>	۳۷/۱۷ <sup>b</sup>	۵۹/۳۳ <sup>a</sup>
A۹۰	۵/۸۳	۱۷ <sup>b</sup>	۲۶/۸ <sup>c</sup>	۵۵/۶۷ <sup>b</sup>
SEM	۰/۳۷	۰/۵۳	۰/۵۵	۰/۸۳
p-value	۰/۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

نتایج مربوط به تغییرات غلظت هورمون‌های تیروئید خون مرغ‌ها در خلال دوره تولک در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده است. در صبح روز نخست غلظت هورمون T۳ در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p < 0.05$ ) اما در ادامه دوره تولک تغییرات غلظت هورمون T۳ در گروه‌های آزمایشی معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم تولک غلظت هورمون T۳ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های FW و A۹۰ بود ( $p < 0.05$ ) اما بین این دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

غلظت هورمون T۴ در صبح روز نخست در گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ) اما در ادامه دوره تولک تغییرات غلظت هورمون T۴ در گروه‌های آزمایشی معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در روز سوم تولک بالاترین غلظت هورمون T۴ مربوط به گروه FW بود که اختلاف آن فقط با گروه شاهد معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) اما اختلاف معنی‌داری با گروه A۹۰ نداشت. در روزهای ششم و نهم تولک بالاترین غلظت هورمون T۴ مربوط به گروه FW بود که اختلاف معنی‌داری با هر دو گروه آزمایشی دیگر داشت ( $p < 0.05$ ) پایین‌ترین غلظت هورمون T۴ نیز مربوط به گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ). در روز دوازدهم تولک بالاترین غلظت هورمون T۴ مربوط به گروه FW بود که اختلاف آن فقط با گروه شاهد معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) همچنین اختلاف بین گروه شاهد و گروه A۹۰ نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

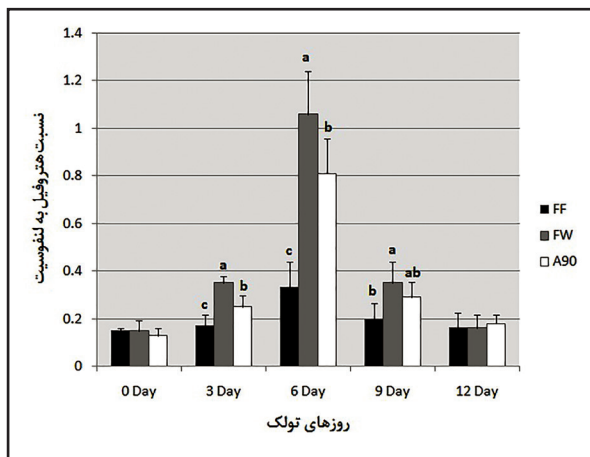
نتایج مربوط به میزان تحلیل اندام‌های داخلی مرغ‌ها در پایان دوره تولک در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین اوزان نسبی تخمدان و اویداکت در انتهای دوره تولک مربوط به گروه FW بود که اختلاف آن فقط با گروه شاهد معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). به مانند تخمدان و اویداکت، کمترین وزن نسبی کبد و لوزالمعده نیز به ترتیب مربوط به گروه‌های FW و A۹۰

خلال دوره تولک در نمودار ۱ نشان داده شده است. جمعیت سلول‌های سفید خون مرغ‌ها در صبح روز نخست تفاوت معنی‌داری نداشت، اما اختلاف آن‌ها در خلال دوره تولک در بین تیمارهای مختلف آزمایش معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در روز سوم تولک بالاترین جمعیت سلول‌های سفید خون مربوط به تیمار شاهد و پایین‌ترین جمعیت سلول‌های سفید مربوط به گروه FW بود ( $p < 0.05$ ). در روز ششم تولک نیز بالاترین جمعیت سلول‌های سفید خون مربوط به گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ). در روزهای نهم و دوازدهم تولک همچنان بالاترین جمعیت سلول‌های سفید خون در گروه شاهد مشاهده شد اما اختلاف آن فقط با گروه FW معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) در روز دوازدهم بین گروه FW و A۹۰ نیز اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

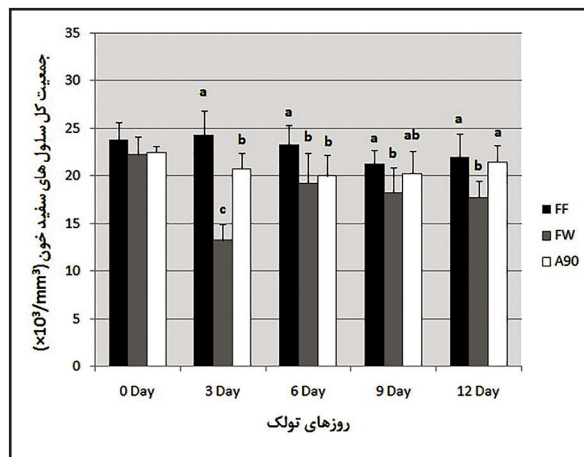
نتایج مربوط به تغییرات نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون مرغ‌ها در خلال دوره تولک در نمودار ۲ نشان داده شده است. نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون مرغ‌ها در صبح روز نخست و نیز در انتهای دوره تولک (روز دوازدهم) تفاوت معنی‌داری نداشت اما اختلاف آن‌ها در روزهای سوم، ششم و نهم تولک در بین تیمارهای مختلف آزمایش معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در روز سوم و ششم تولک بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت خون مربوط به گروه FW و پایین‌ترین غلظت خون مربوط به گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ). در روز نهم تولک نیز بالاترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت مربوط به گروه FW بود که اختلاف آن فقط با گروه شاهد معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

نتایج مربوط به تغییرات غلظت هورمون کورتیکواسترون خون مرغ‌ها در خلال دوره تولک در نمودار ۳ نشان داده شده است. افزایش غلظت هورمون کورتیکواسترون خون در گروه‌های مختلف آزمایشی، فقط در روز سوم تولک معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) و این افزایش در گروه FW محسوس‌تر از سایر گروه‌ها بود.

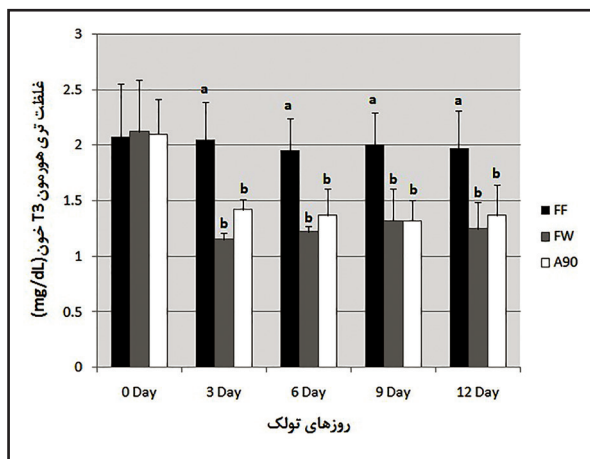




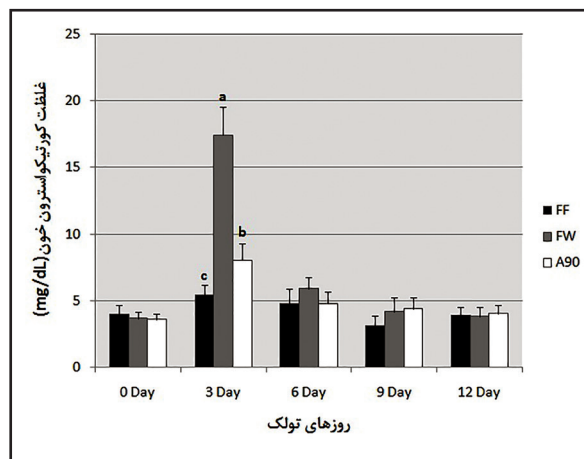
نمودار ۲. تغییرات نسبت هتروفیل به لنفوسیت گروه‌های آزمایشی در خلال دوره تولک. شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخم‌گذاری، FW: گروه محروم از غذا و A90: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ درصد جیره تخم‌گذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.



نمودار ۱. تغییرات جمعیت کل سلول‌های سفید خون گروه‌های آزمایشی در خلال دوره تولک (mm<sup>3</sup>/10<sup>3</sup>xn). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخم‌گذاری، FW: گروه محروم از غذا و A90: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ جیره تخم‌گذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.



نمودار ۴. تغییرات غلظت هورمون T3 خون گروه‌های آزمایشی در خلال دوره تولک (mg/dl). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخم‌گذاری، FW: گروه محروم از غذا و A90: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ درصد جیره تخم‌گذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.



نمودار ۳. تغییرات غلظت کورتیکواسترون خون گروه‌های آزمایشی در خلال دوره تولک (mg/dl). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخم‌گذاری، FW: گروه محروم از غذا و A90: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ درصد جیره تخم‌گذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.

مرغ‌های گروه A90 در مقایسه با گروه FW سریعتر به ۸۰٪ تولید رسیدند ( $p < 0.05$ ). شایان ذکر است که مرغ‌های گروه شاهد در طی ۱۲ هفته دوره آزمایش نتوانستند به تولید ۸۰ درصد برسند.

بود که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ( $p < 0.05$ ). اما اختلاف این گروه‌ها با یکدیگر غیر معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

### بحث

نتایج این آزمایش نشان دادند که تولک بری باعث کاهش جمعیت گلبول‌های سفید خون مرغ‌ها در اوایل این دوره شده است. این کاهش در روز سوم تولک در تیمار FW محسوس‌تر و شدیدتر از سایر تیمارها بود. اما در ادامه دوره تولک این مقادیر به سطوح اولیه نزدیک شدند که به نظر می‌رسد به دلیل سازش پذیری پرندگان با شرایط تولک می‌باشد. این نتیجه با نتیجه آزمایش Mashaly و Alodan در سال ۱۹۹۹ مطابقت داشت که گزارش کرده بودند که مقدار جمعیت گلبول‌های سفید خون در روز دوم

نتایج مربوط به زمان‌های مختلف تولید مرغ‌ها در گروه‌های آزمایشی در جدول ۳ نشان داده شده است. کوتاه‌ترین زمان توقف تولید از آغاز دوره تولک مربوط به گروه FW بود که البته اختلاف معنی‌داری با گروه A90 نداشت ( $p > 0.05$ ). لازم به ذکر است که تولید تخم مرغ در مرغ‌های گروه شاهد به طور کامل متوقف نشد. نتایج این آزمایش نشان دادند که مرغ‌های گروه A90 در مقایسه با مرغ‌های گروه FW به طور معنی‌داری سریع‌تر به تولید بازگشتند ( $p < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان دادند که مرغ‌های گروه شاهد در مقایسه با گروه‌های تولک برده شده در زمان سریعتری به ۵۰٪ تولید رسیدند ( $p < 0.05$ ). در بین گروه‌های تولک برده شده نیز گروه A90 نسبت به گروه FW سریعتر به ۵۰٪ تولید بازگشت ( $p < 0.05$ ). همچنین

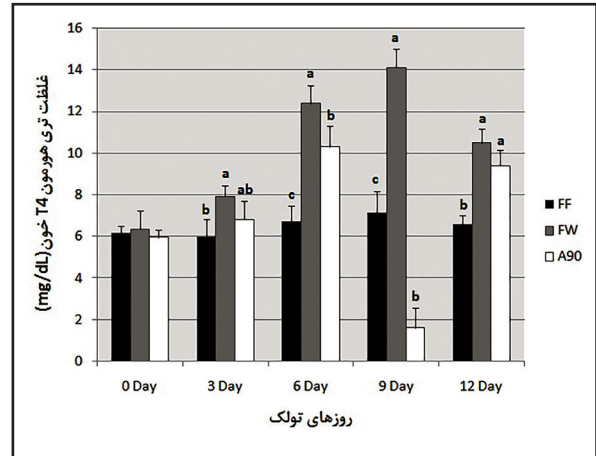


گزارش نمودند. در آزمایش McReynolds و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز افزایش در هتروفیل‌ها همراه با کاهش در سلول‌های تک هسته‌ای خون در پرندگان گرسنه در مقایسه با مرغ‌های غیر تولک و مرغ‌های تولک برده شده به روش تغذیه با پودر یونجه در خلال دوره تولک گزارش گردید. در این آزمایش نیز بیشترین افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مرغ‌های گرسنه نشان دهنده استرس زیادتر در این گروه در مقایسه با گروه تغذیه شده با پودر یونجه است که این مسئله می‌تواند با دریافت خوراک توسط این گروه مرتبط باشد. کاهش تدریجی نسبت هتروفیل به لنفوسیت در اواخر دوره تولک در مرغ‌ها نیز می‌تواند به دلیل سازش پذیری پرندگان با شرایط استرس زای محیطی باشد.

کورتیکو استرون یک هورمون گلوکوکورتیکوئید (تولید کننده گلوکز از منابع داخلی بدن، عمدتاً از پروتئین‌ها) است. افزایش میزان کورتیکو استرون در ارتباط با اثرات متابولیکی آن در جهت فراهم ساختن گلوکز و انرژی مورد نیاز بدن تحت شرایط خاص مثل گرسنگی و اوج تولید رخ می‌دهد (۷). از این رو میزان غلظت کورتیکو استرون پلاسما به عنوان یک شاخص سنجش میزان استرس در پرندگان شناخته شده است. افزایش میزان غلظت کورتیکو استرون پلاسما در سومین روز تولک در مرغ‌های گرسنه در این آزمایش می‌تواند به خوبی بیانگر تحمل میزان بالایی از استرس در این پرندگان در مقایسه با سایر گروه‌ها باشد. کاهش سطح کورتیکو استرون خون مرغ‌ها در ادامه دوره تولک و نزدیک شدن به سطوح اولیه آن می‌تواند به در نتیجه سازش پذیری پرندگان با شرایط ایجاد کننده استرس باشد.

نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش Braw-tal و همکاران در سال ۲۰۰۴ مطابقت داشت. این محققین غلظت کورتیکو استرون پلاسما در روز دوم تولک در مرغ‌های گرسنه را نسبت به گروه‌های تغذیه‌ای به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر گزارش نمودند، اما در ادامه دوره تولک، غلظت کورتیکو استرون در تمامی گروه‌ها کاهش یافت و به سطوح اولیه بازگشت. Erol و Onbasilar در سال ۲۰۰۷ سطوح بالاتر کورتیکو استرون پلاسما را در روز دهم تولک در مرغ‌های گرسنه در مقایسه با مرغ‌های تولک برده شده به روش تغذیه با دانه کامل جو و روش استفاده از سطوح بالای اکسید روی در جیره گزارش نمودند. پیش از این محققین نیز افزایش سطوح کورتیکو استرون پلاسما در مرغ‌های تولک برده شده به روش گرسنگی توسط گزارش شده است (۷).

هم نسبت هتروفیل به لنفوسیت و هم غلظت هورمون کورتیکو استرون به عنوان شاخص‌های سنجش استرس در پرندگان در نظر گرفته می‌شوند اما بر اساس نتایج به دست آمده از این آزمایش، به نظر می‌رسد که شاخص کورتیکو استرون در مقایسه با نسبت هتروفیل به لنفوسیت سریعتر عکس العمل نشان می‌دهد. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که تغییر در نسبت انواع جمعیت سلول‌های سفید خون در پاسخ به تغییر غلظت کورتیکو استرون



نمودار ۵. تغییرات غلظت هورمون T4 خون گروه‌های آزمایشی در خلال دوره تولک (mg/dl). شاهد: گروه دریافت کننده جیره تخمگذاری، FW: گروه محروم از غذا و A90: گروه دریافت کننده ۹۰٪ پودر یونجه به اضافه ۱۰٪ جیره تخمگذاری. میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند

تولک در مرغ‌های گرسنه به طور معنی‌داری پایین‌تر از مرغ‌های تولک برده شده توسط روش‌های دیگر (جیره حاوی اکسید روی و روش یک روز در میان) و مرغ‌های غیر تولک بود. این مسئله نشان دهنده آنست که تولک بری می‌تواند منجر به ممانعت از پاسخ ایمنی شود (۱). استرس ناشی از گرسنگی سبب افزایش سطح کورتیکو استرون می‌شود (۳۰). تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش سطوح کورتیکو استرون می‌تواند منجر به کاهش یا سرکوب پاسخ ایمنی شود (۱۵، ۱۲). همان گونه که در ادامه نتایج این آزمایش مشاهده خواهد شد، افزایش چشمگیر سطح کورتیکو استرون در تیمار FW در روز سوم تولک می‌تواند کاهش جمعیت سلول‌های سفید خون تیمار گرسنه در روز سوم را توجیه نماید.

نتایج این آزمایش نشان دادند که تولک بری سبب افزایش تدریجی نسبت هتروفیل به لنفوسیت در اوایل و اواسط دوره تولک در مرغ‌های تولک برده شده گردید، که این میزان افزایش در مرغ‌های گرسنه محسوس‌تر از گروه تغذیه شده با یونجه بود. اوج میزان افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در روز ششم تولک مشاهده شد. نسبت هتروفیل به لنفوسیت در خون پرندگان به عنوان شاخص استرس فیزیولوژیک در نظر گرفته می‌شود و افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت بیانگر بروز استرس در پرند است (۱۸). در آزمایش Davis و همکاران در سال ۲۰۰۰ افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در خلال دوره تولک در مرغ‌های تولک برده شده توسط ۱۴ روز گرسنگی، در مقایسه با قبل و بعد از دوره تولک گزارش شده است. Mashaly و Alodan در سال ۱۹۹۹ افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت در مرغان ۸۰ هفته که توسط روش گرسنگی و روش تغذیه با سطوح بالای اکسید روی در جیره، تولک برده شده بودند را گزارش نمودند. Dunkley و همکاران در سال ۲۰۰۷ اوج افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت را در روز نهم تولک در مرغ‌های گرسنه نسبت به مرغ‌های تولک برده شده به روش تغذیه با پودر یونجه و مرغ‌های غیر تولک را



توانستند سبب تحلیل تخمدان شوند. در آزمایش Landers و همکاران در سال ۲۰۰۷ تفاوت معنی داری در وزن نسبی تخمدان و اویداکت بین مرغ‌های تولک برده شده به روش تغذیه با ۱۰۰٪ پودر یونجه و روش گرسنگی به مدت ۹ روز مشاهده نشد. اما اختلاف این گروه‌ها با گروه شاهد معنی دار بود. همچنین Donalson و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز تفاوت معنی داری در وزن نسبی تخمدان و اویداکت در مرغ‌های تولک برده شده به روش تغذیه با سطوح ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد پودر یونجه در جیره تخمگذاری با روش گرسنگی به مدت ۹ روز مشاهده نمودند اما اختلاف همه این گروه‌ها با مرغ‌های غیر تولک معنی دار بود.

تحلیل کبد در خلال دوره تولک مربوط به از دست رفتن ذخایر چربی و پروتئین‌های کبد است. نتیجه حاصل از این آزمایش در مورد وزن نسبی کبد و لوزالمعده با نتیجه آزمایش Landers و همکاران در سال ۲۰۰۷ در استفاده از پودر یونجه به عنوان جیره تولک، مشابهت داشت. در آزمایش Donalson و همکاران در سال ۲۰۰۵ تفاوت غیر معنی دار در وزن نسبی کبد در مرغ‌های تولک برده شده توسط روش گرسنگی و روش تغذیه با ۱۰۰٪ پودر یونجه گزارش گردید. اما تفاوت گروه‌های تولک برده شده توسط سطوح پایین‌تر پودر یونجه در جیره تخمگذاری (سطوح ۷۰ و ۸۰٪) با گروه‌های مذکور معنی دار بود. همچنین Park و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز تفاوت درصد وزنی کبد در روش گرسنگی ۹ روزه با روش استفاده از جیره تولک حاوی ۱۰۰۰۰ mg عنصر روی در شکل استات روی را غیر معنی دار اما با جیره حاوی همین مقدار پروپیونات روی معنی دار گزارش نمودند.

در خصوص زمان توقف تولید نتایج این آزمایش با نتیجه آزمایش Donalson و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطابقت داشت. این محققین توقف سریع‌تر تولید در مرغ‌های محروم غذا در مقایسه با مرغ‌های تولک برده شده توسط سطوح مختلف پودر یونجه در جیره تولک، را گزارش نمودند. بازگشت دیرتر گروه FW به تولید نیز، احتمالاً مربوط به از دست دادن ذخایر بدنی بیشتر در اثر گرسنگی و همچنین متحمل شدن استرس فیزیکی بیشتر ناشی از آن در خلال دوره تولک در این گروه از مرغ‌ها بود. نتیجه این آزمایش با نتایج Landers و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Biggs و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت داشت. در مقابل Donalson و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز تفاوت معنی داری در زمان بازگشت به تولید در مرغ‌های تولک برده شده به روش گرسنگی و روش استفاده از سطوح مختلف پودر یونجه در جیره تولک، مشاهده نمودند. دلیل ذکر شده برای تأخیر در شروع تولید در مرغ‌های گروه FW در مقایسه با گروه A۹۰ می‌تواند برای تأخیر زمان رسیدن به ۵۰ و ۸۰٪ تولید نیز صادق باشد، که این مسئله سبب بهبود عملکرد اقتصادی پرندگان در گروه A۹۰ در مقایسه با گروه محروم از غذا گردید. Mashaly و Alodan در سال ۱۹۹۹ زمان کوتاه‌تر رسیدن به پیک تولید در مرغ‌های تولک برده شده توسط روش تغذیه با جیره تولک حاوی عنصر روی در مقایسه با روش کالیفر نیایی را گزارش نمودند.

صورت می‌گیرد. دریافت خوراک در تیمار حاوی پودر یونجه و همچنین اثرات پری بیوتیکی فیبر موجود در یونجه می‌تواند توجیه کننده میزان استرس کمتر در این گروه باشد.

نتایج این آزمایش نشان دادند که غلظت هورمون T۳ در خلال دوره تولک در گروه‌های FW و A۹۰، که به طور کامل تولک رفته‌اند، کاهش و در مقابل غلظت هورمون T۴ در خلال این دوره در این دو گروه افزایش یافت. نتایج این آزمایش با نتایج Davis و همکاران در سال ۲۰۰۰ و Khalaji و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشت. در آزمایش Davis و همکاران در سال ۲۰۰۰ کاهش معنی دار غلظت هورمون T۳ و افزایش معنی دار در غلظت هورمون T۴ در خلال تولک در مرغ‌های تولک برده شده به روش گرسنگی در مقایسه با دوره‌های پیش و پس از تولک را گزارش شده است. همچنین Khalaji و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز کاهش هورمون T۳ و افزایش هورمون T۴ را در خلال دوره تولک (در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸) در مرغ‌های تولک برده شده توسط رژیم‌های مختلف تولک گزارش نمودند. افزایش هورمون T۴ احتمالاً یک فاکتور فیزیولوژیکی مهم برای آغاز پرریزی در پرندگان است. زیرا تجویز خارجی این هورمون سبب تحریک پرریزی و تحلیل اندام‌های تولید مثلی در مرغان تخمگذار گزارش شده است (۲۸، ۲۹). به علاوه دوره پس از تولک زمان رشد مجدد و جوان شدن اندام‌های تولید مثلی و پرهاست. بنابراین افزایش هورمون T۴ می‌تواند با اثرات متابولیکی مورد نیاز برای رشد مجدد اندام‌ها در ارتباط باشد (۸). مطالعه Thaxton و Brake در سال ۱۹۷۹ نشان داد که هورمون تیروکسین (T۴) نقش مهمی در آغاز تولک بری مرغ‌ها ایفا می‌نماید. این محققین مشاهده نمودند که غلظت T۴ پلاسما در اواسط دوره محرومیت از غذا و به موازات تحلیل تخمدان، به طور معنی داری افزایش یافت و سپس با اتمام دوره گرسنگی و تغذیه مجدد مرغ‌ها غلظت این هورمون با شیب تندی افت نمود. در مقابل غلظت T۳ پلاسما در طی دوره گرسنگی تغییر چندانی نکرد اما با شروع تغذیه مجدد غلظت آن افزایش یافت. در آزمایش Scanes و همکاران در سال ۱۹۷۹ حداکثر غلظت T۴ در پلاسمای بوقلمون‌ها را در خلال دوره پرریزی گزارش گردید و مشاهده شد که غلظت T۳ در بوقلمون‌ها با دریافت غذا افزایش یافت. افزایش سطح هورمون T۴ در خلال تولک روی طبیعی ماده کلاغ‌های سیاه نیز گزارش شده است (۲۳). نتایج مشابهی در این خصوص در بوقلمون‌ها نیز به دست آمده است (۲۴).

تحلیل تخمدان و اویداکت در خلال دوره تولک در نتیجه کاهش هورمون‌های جنسی به ویژه استروژن اتفاق می‌افتد. از آنجائیکه یکی از پارامترهای اصلی در تعیین موفقیت در تولک روی کامل پرندگان، تحلیل تخمدان و اویداکت است لذا با مقایسه میزان تحلیل تخمدان و اویداکت در گروه ۱۲ روز گرسنه با روش استفاده از پودر یونجه در جیره تولک، به این نتیجه می‌رسیم که این روش به همان خوبی روش مرسوم گرسنگی



## References

- Alodan, M.A., Mashaly, M.M. (1999) Effects of induced molting in laying hens on production and immune parameters. *Poult Sci.* 78: 171-179.
- Berry, W.D. (2003) The physiology of induced molting. *Poult Sci.* 82: 971-980.
- Biggs, P.E., Persia, M.E., Koelkebeck, K.W., Parsons, C.M. (2004) Further evaluation of non-feed removal methods for molting programs. *Poult Sci.* 83: 745-752.
- Brake, J., Thaxton, P. (1979) Physiological changes in caged layers during a forced molt. 2. Gross changes in organs. *Poult Sci.* 58: 707-716.
- Brake, J., Baker, M., Morgan, G.W., Thaxton, P. (1982) Physiological changes in caged layers during a forced molt. 4. leucocytes and packed cell volume. *Poult Sci.* 61: 790-795.
- Braw-tal, R., Yossefi, S., Pen, S., Shinder, D., Bar, A. (2004) Hormonal changes associated with ageing and induced moulting of domestic hens. *Br Poult Sci.* 45: 815-822.
- Davis, G.S., Anderson, K.E., Carrol, A.S. (2000) The effect of long-term caging and molt of single comb white leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. *Poult Sci.* 79: 514-518.
- Davis, A.J., Lordelo, M.M., Dale, N. (2002) The use of cottonseed meal with or without added soapstock in laying hens diets. *J Appl Poult Res.* 11: 127-133.
- Donalson, L.M., Kim, W.K., Herrera, P., Woodward, C.L., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2005) Utilizing different ratios of alfalfa and layer ration for molt induction and performance in commercial laying hens. *Poult Sci.* 84: 362-369.
- Dunkley, C.S., McReynolds, J.L., Dunkley, K.D., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2007) Molting in salmonella enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles.III. Blood plasma metabolite response. *Poult Sci.* 86: 2492-2501.
- Durant, J.A., Corrier, D.E., Byrd, J.A., Stanker, L.H., Ricke, S.C. (1999) Feed deprivation affects crop environment and modulates Salmonella Enteritidis colonization and invasion of leghorn hens. *Appl Environ Microbiol.* 65: 1919-1923.
- Holt, P.S. (1992) Effects of induced molting on immune responses of hens. *Br Poult Sci.* 33: 165-175.
- Holt, P.S., (2003) Molting and Salmonella enterica serovar Enteritidis infection: the problem and some solutions. *Poult Sci.* 82: 1008-1010.
- Khalaji, F., Karimi, S., Akhari, M.R. (2008) Physiological response and postmolt performance of laying hens molted by non-feed removal methods. *Am J Anim Vet Sci.* 3: 13-17.
- Kogut, M.H., Genovese, K.J., Stanker, L.H. (1999) Effect of induced molting on heterophil function in White Leghorn hens. *Avian Dis.* 43: 538-548.
- Landers, K.L., Woodward, C.L., Li, X., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2005) Alfalfa as a single dietary source for molt induction in laying hens. *Bioresour Technol.* 96: 565-570.
- Landers, K.L., Moore, R.W., Dunkley, C.S., Herrera, P., Kim, W.K., Landers, D.A., Howard, Z.R., McReynolds, J.L., Byrd, J.A., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2007) Immunological cell and serum metabolite response of 60-week-old commercial laying hens to an alfalfa meal molt diet. *Bioresour Technol.* 99: 604-608.
- Maxwell, M.H., Robertson, G.W. (1998) The avian basophilic leukocyte: a review. *World Poult Sci.* 51: 307-325.
- McReynolds, J.L., Genovese, K.L., Swaggerty, C.L., Bryrd, J.A., Rilke, S.C., Nisbet, D.J., Kogut, M.H. (2009) Alfalfa as a nutritive modulator in maintaining the innate immune response

نتیجه‌گیری: در نهایت نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از پودر یونجه در تولک‌بری مرغ‌های تخمگذار تجاری تأثیرات مطلوبی در کاهش استرس فیزیولوژیک ناشی از روش مرسوم گرسنگی در تولک‌بری و همچنین عملکرد دوره پس از تولک پرندگان داشت.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از ریاست وقت (جناب آقای مهندس ترینیا) و کارکنان محترم مرکز آموزش جهاد کشاورزی استان قزوین که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش مبذول فرمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.



- during the molting process. *J Appl Poult Res.* 18: 410-417.
20. Moore, R.W., Park, S.Y., Kubena, L.F., Byrd, J.A., McReynolds, J.L., Burnham, M.R., Hume, M.E., Birkhold, S.G., Nisbet, D.J., Rickett, S.C. (2004) comparison of zinc acetate and propionate addition on gastrointestinal tract fermentation and susceptibility of laying hens to salmonella enteritidis during forced molt. *Poult Sci.* 83: 1276-1286.
  21. Onbasilar, E.E., Erol, H. (2007) Effects of different forced molting methods on postmolt production, corticosterone levels, and immune response to sheep red blood cells in laying hens. *J Appl Poult Res.* 16: 529-536.
  22. Park, S.Y., Birkhold, S.G., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. (2004) Effects of high zinc diets using zinc propionate on molt induction, organs, and postmolt egg production and quality in laying hens. *Poult Sci.* 83: 24-33.
  23. Pethes, G., Szelenyi, Z., Pecenzely, P. (1982) Changes in the plasma concentrations of thyroid hormones and sexual steroids during forced molt of male and female domestic chickens. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 30: 193-201.
  24. Queen, W.H., Christensen, V.L., May, J.D. (1997) Supplemental thyroid hormones and molting in turkey breeder hens. *Poult Sci.* 76: 887-893.
  25. Ricke, S. (2003) The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella Enteritidis* colonization in molting hens. *Poult Sci.* 82: 1003-1007.
  26. Ruzsler, P., Novak, C. (2006) Feeding hens during alternating a.m. and p.m. time blocks to induce zero egg production during the molt. *J Appl Poult Res.* 15: 525-530.
  27. Scanes, C.G., Sharp, P.J., Harvey, S., Godden, P.M.M., Chadwick, A., Newcomer, W.S. (1979) Variations in plasma prolactin, thyroid hormones, gonadal steroids, and growth hormone in turkeys during the induction of egg laying and molt by different photoperiods. *Br Poult Sci.* 20: 143-148.
  28. Sekimoto, K., Suzuki, I.M., Takikawa, H., Hoshino, N., Totsuka, K. (1987) Thyroxine-induced molting and gonadal function of laying hens. *Poult Sci.* 66: 752-756.
  29. Verheyen, G., Decuypere, E., Kuhn, E.R., Fontaine, G., De Groote, G. (1983) Arrêt de la ponte par induction chez la poult. Effet de différentes méthodes sur certains paramètres de production et sur les concentrations en hormones thyroïdiennes, en prolactine, en Ca, P, Na et en protéines dans le sérum sanguin. *Eur Rev Agric Econ.* 36: 1535-1559.
  30. Webster, A.B. (2003) Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poult Sci.* 82: 992-1002.
  31. Wenk, C. (2001) The role of dietary fiber in the digestive physiology of the pig. *Anim Feed Sci Technol.* 90: 21-33.





## Hormonal changes, immunological response and date of reentry in laying hens fed alfalfa molt diet

Shahrami, E.<sup>1\*</sup>, Rokni, H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Qazvin Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Qazvin, Iran

<sup>2</sup>Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

(Received 23 July 2017, Accepted 25 October 2017)

### Abstract:

**BACKGROUND:** The use of feed withdrawal method for molt induction can cause physiological stress and negatively affect the immunological response of hens. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to survey of hormonal changes and immunological response in hens fed alfalfa molt diet during the molt period. **METHODS:** In this experiment 108 Hy-line (W36) laying hens aged 74 weeks in a completely randomized design with 3 treatments and 6 replicates were used. The treatments used for 12 days molt period included: 1- control group fed with layer ration (FF), 2- feed withdrawal group (FW), 3- group fed with 90% alfalfa and 10% layer ration (A90). Performance of birds was monitored for 12 weeks after the end of the molting period. **RESULTS:** Total circulating leukocytes were generally lower in FW hens group compared with the other groups during the initial stage of molt ( $p < 0.05$ ). On day 3 and 6 of molt, heterophil to lymphocyte ratio was increased in molted hens and FW hens had higher levels than other groups. On day 3 of molt, plasma corticosterone was generally increased in molted hens and FW hens had a higher level than A90 hens ( $p < 0.05$ ). Plasma T3 was significantly decreased in molted hens than nonmolted hens during the molt period ( $p < 0.05$ ). Plasma T4 was significantly increased in molted hens than nonmolted hens during the molt period ( $p < 0.05$ ). On day 6 and 9 of molt, concentrations of T4 were higher in FW hens than in the A90 hens ( $p < 0.05$ ). Date of reentry and days return to 50% and 80% egg production were significantly lower in A90 groups than in the FW groups ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** The results showed that, A90 diet can limit physiological stress and improve the performance of immunological response that accompanies feed withdrawal method during an induced molt.

**Keyword:** Alfalfa, corticosterone, forced molting, laying hens, thyroid hormones

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Layer ration. Vitamin premix: A, 8500000 IU; D, 2500000 IU; E, 11000 IU; K3, 2200 mg; B1, 1477 mg; B2, 4000 mg; B3, 7840 mg; B5, 34650 mg; B6, 2464 mg; B9, 110 mg; B12, 10 mg; cholin chloride, 400000 mg. Mineral premix: Mn, 74400 mg; Fe, 75000 mg; Zn, 64675 mg; Cu, 6000 mg; I, 867 mg; Se, 200 mg.

**Table 2.** Organ weights based on body weight percentage in treatments at the end of molt (%). FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Different dates of production in treatments (day). FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Graph 1.** Population of total leukocytes in treatments during the molt period. FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Graph 2.** Heterophil to lymphocyte ratio in treatments during the molt period. FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Graph 3.** Concentration of corticosterone in treatments during the molt period. FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Graph 4.** Concentration of T3 hormone in treatments during the molt period. FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).

**Graph 5.** Concentration of T4 hormone in treatments during the molt period. FF: control, FW: feed withdrawal, A90: 90% alfalfa + 10% layer ration. Means with different letters in the same row differ ( $p < 0.05$ ).



\*Corresponding author's email: e.shahrami@gmail.com, Tel: 028-33227240, Fax: 028-33227240