

تأثیر سطوح مختلف اسیدهای آمینه و روش‌های دسترسی به دان بر عملکرد تولیدی و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی

کاظم یوسفی کلاریکلای^۱، حسین مروج^{۲*}، سیدعبداله حسینی^۳ و عباس پاکدل^۴

۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۳. عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات علوم دامی کشور

۴. دانشیار بخش ژنتیک و اصلاح دام گروه علوم دامی، دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۱۵)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی تأثیرات سطوح مختلف آمینو اسید و روش‌های دسترسی به دان بر عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش فاکتوریل با سه روش دسترسی به دان و دو سطح اسید آمینه انجام شد. از ۱۲ روزگی تا پایان دوره پرورش سه روش دسترسی آزاد به دان، محدودیت غذایی با دسترسی متناوب و محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته به دان اعمال شد. جیره‌های آزمایشی شامل دو سطح اسید آمینه لیزین طبق سطح پیشنهادی سویه آرین و سطح ۸ درصد بیشتر از آن بود. هر تیمار شامل شش تکرار و هر تکرار دارای ۲۳ قطعه جوجه گوشتی بود. محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته به دان به طور معنادار ($P < 0/05$) سبب کاهش درصد تلفات و حذفی شد. با اعمال روش‌های خوراک‌دهی متناوب و پیوسته ضریب تبدیل غذایی به طور معنادار ($P < 0/05$) بهبود یافت. با افزایش سطح اسیدهای آمینه درصد لنفوسیت کاهش یافت و درصد هتروفیل و نسبت هتروفیل به لنفوسیت افزایش یافت ($P < 0/05$). نتایج نشان داد که تنظیم جیره‌ها بر اساس سطح توصیه آرین به همراه روش محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته به دان بدون اینکه تأثیر منفی بر عملکرد رشد داشته باشد، سبب تقویت سیستم ایمنی سلولی و نه ایمنی خونی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسید آمینه، جوجه گوشتی، روش دسترسی به دان، سیستم ایمنی، عملکرد.

مقدمه

(۱۸ درصد در مقابل ۹ درصد) و در مقابل وزن نسبی قلب بعد از چهارده روزگی کاهش یافته است. به این معنی که انتخاب برای عضله سینه به معنی کمتر شدن وزن نسبی قلب بوده است (Schmidt *et al.*, 2009). بنابراین شرایط برای بروز تنش قلبی-عروقی افزایش یافته است. در تحقیق Lemme *et al.* (2009)، نشان داده شد افزایش اسیدهای آمینه در سنین اولیه در سویه‌هایی که به مشکلات قلبی-عروقی حساس‌ترند

جوجه‌های گوشتی امروزی با اعمال برنامه‌های اصلاح نژادی از قابلیت سرعت رشد زیاد برخوردار شدند (Lemme *et al.*, 2009; Cobb-Vantress, 2012;) (Svihus *et al.*, 2010)، همچنین رشد نسبی اندام‌های مختلف بدن در سویه‌های امروزی در مقایسه با جوجه‌های پرورشی سال ۱۹۵۰ تغییر یافته است. به عنوان مثال عضله سینه نسبت به وزن زنده دو برابر شده

به واسطه ایجاد گرسنگی باعث بروز تنش در پرنده می‌شود (De Jong *et al.*, 2002; Jong *et al.*, 2002; Hangalapura *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 1990). کاهش ایمنی در پرندگان تحت محدودیت غذایی ممکن است به دلیل اثر تحریک‌کنندگی محدودیت بر ترشح هورمون‌های کورتیکواستروئیدی باشد که مهارکننده‌های قدرتمندی در مقابل تولید آنتی‌بادی‌ها هستند (Dibner & Knight, 1998). به هرحال، برخی محققان بهبود پاسخ‌های ایمنی را با اعمال محدودیت خوراکی در جوجه‌های گوشتی گزارش کردند (Klasinng, 1988; Khajavi *et al.*, 2003). گزارش Jang *et al.* (2009) نشان می‌دهد که اعمال محدودیت غذایی به میزان ۷۰ درصد خوراک مصرفی گروه شاهد جهت حفظ شرایط آسایش پرنده کافی است و ایمنی را افزایش می‌دهد بدون اینکه بر عملکرد رشد تأثیر منفی داشته باشد. به هر حال به وضوح تأیید نشده است که آیا محدودیت خوراک در جوجه‌های گوشتی که اشتیهای حریصانه‌ای دارند پاسخ ایمنی پرنده را به مخاطره می‌اندازد یا نه. بنابراین تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر محدودیت زمانی دسترسی به خوراک و نیز اعمال محدودیت تا پایان دوره پرورش و همچنین تأثیرات متقابل بین سطوح اسیدهای آمینه و محدودیت غذایی بر عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل 3×2 در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار در هر گروه آزمایشی در سالن تحقیقات مجتمع پرورش و اصلاح نژاد مرغ لاین آرین بابل کنار اجرا شد. همه برنامه‌های بهداشتی و مدیریتی بر اساس اصول و مقررات مرکز انجام گرفت. به هر جایگاه (به ابعاد 1×2 متر) ۲۳ قطعه جوجه خروس با وزن 47 ± 1 گرم اختصاص یافت.

فاکتورهای آزمایشی شامل دو سطح اسیدهای آمینه و سه روش خوراک‌دهی بود (جدول‌های ۱ و ۲). سطح اسید آمینه لیزین بر اساس توصیه راهنمای پرورش جوجه گوشتی سویه آرین (سطح ۱) و ۸ درصد بیشتر از آن (سطح ۲) تنظیم شد (راهنمای آرین، ۱۳۹۲). سطح ۲ بیشترین سطح اسیدهای آمینه‌ای است که در جدول

سبب افزایش تلفات نهایی می‌شود. این محققان نتیجه گرفتند که به کارگیری سطوح کمتر اسیدهای آمینه در جیره آغازین و رشد عملکرد مشابه با گروه آزمایشی با سطوح بیشتر اسیدهای آمینه در این دوره‌ها ارتباط دارد. Yusefi *et al.* (2010) با اعمال برنامه محدودیت غذایی متناوب در گروه‌های تحت محدودیت به طور معناداری ($P < 0.05$) وزن بیشتری در مقایسه با گروه تغذیه آزاد در سنین ۴۲ و ۴۹ روزگی مشاهده کردند. در آزمایش Yusefi *et al.* (2010) ضریب تبدیل خوراک در گروه‌های با برنامه خوراک‌دهی متناوب به طور معناداری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه تغذیه آزاد کمتر بود.

تنش سبب فعال‌سازی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز و غدد فوق کلیوی می‌شود. با فعالیت این محور آزادسازی هورمون آدرنوکورتیکوسترون افزایش می‌یابد که غدد فوق کلیوی را برای ترشح و آزادسازی کورتیکوسترون به خون تحریک می‌کند (Moberg & Mench, 2000). کورتیکوسترون سبب تغییر متابولیسم پروتئین (افزایش کاتابولیسم پروتئین‌های ساختمانی)، چربی و کاهش سطح جذب مواد مغذی در روده می‌شود (Garriga *et al.*, 2006; Rajkumar *et al.*, 2006). بنابر گزارش ارائه‌شده توسط Klasing *et al.* (2004) در شرایط معمول ۹ درصد از انرژی دریافتی جوجه‌ها صرف پاسخ‌های ایمنی می‌شود که این مقدار در شرایط تنشی افزایش می‌یابد (Feng *et al.*, 2012). در پژوهش Hu *et al.* (2008, 2010) نشان داده شد که استفاده از کورتیکوسترون در جیره، تکثیر سلول پوششی روده را به تأخیر می‌اندازد. در واقع ارتفاع پرز و عمق کریپت در پاسخ به کورتیکوسترون کاهش می‌یابد. همچنین این محققان نشان دادند که استفاده از کورتیکوسترون سبب کاهش سطح گلوکز پلاسما، افزایش قابلیت هضم ظاهری پروتئین و افزایش فعالیت تریپسین و آمیلاز می‌شود. بنابراین توانایی جذب روده کوچک جوجه‌های گوشتی را کاهش می‌دهد و در پی آن عملکرد رشد کاهش می‌یابد. در طول زندگی پرنده، تنش به صورت‌های مختلفی از جمله درجه حرارت‌های محیطی بسیار سرد یا بسیار گرم، بیماری، تهویه نامناسب، سرعت رشد زیاد و ... اتفاق می‌افتد.

برخی تحقیقات نشان داده‌اند که محدودیت غذایی

شامل چهار دوره چهار ساعته عدم دسترسی و یک ساعت دسترسی به دان و یک دوره سه ساعته عدم دسترسی و یک ساعت دسترسی به دان بود (۱۹ ساعت دسترسی و ۵ ساعت عدم دسترسی). از ۲۴ تا ۴۹ روزگی روش محدودیت غذایی با دسترسی متناوب شامل پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک اعمال شد (۱۵ ساعت دسترسی و ۹ ساعت عدم دسترسی). در روش محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته به دان از ۱۲ تا ۲۴ روزگی و از ۲۵ تا ۴۹ روزگی به ترتیب شش و چهار ساعت متوالی دان در دسترس پرندها نبود. جیره‌ها تا ۲۴ روزگی به صورت کرامبل و سپس تا پایان دوره به صورت پلت تهیه شدند. خوراک و آب تا ۸ روزگی با استفاده از سینی دانخوری و آبخوری کله‌قندی در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت و بعد از آن تا پایان دوره از دانخوری آویز و سیستم آبخوری نیپل (چهار عدد در هر تکرار) استفاده شد.

نیازهای غذایی سایر سویه‌ها آمده است و همچنین در پژوهش قبلی نویسنده (Yussefi *et al.*, 2013) تفاوت معناداری با سطح نخست ایجاد کرد. در هر دو سطح لیزین، حداقل نسبت اسیدهای آمینه به لیزین قابل هضم بر اساس توصیه آراین رعایت شد (جدول ۱). برای تعیین میزان اسیدهای آمینه مواد خوراکی نمونه‌ها به شرکت ایونیک دگوسا^۱ ارسال شد. جیره‌ها بر پایه دانه گندم، دانه ذرت و کنجاله سویا و در چهار دوره زمانی ۰-۱۱، ۱۲-۲۴، ۲۵-۳۶ و ۳۷-۴۹ روزگی تنظیم شدند. تا ۱۱ روزگی همه جوجه‌ها آزادانه به خوراک دسترسی داشتند. از ۱۲ روزگی تا پایان دوره پرورش سه روش دسترسی به دان شامل دسترسی آزاد، محدودیت غذایی با دسترسی متناوب و محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته اعمال شد. در روش دسترسی آزاد به دان به استثنای یک ساعت خاموشی در طول شبانه‌روز جوجه‌ها آزادانه به خوراک دسترسی داشتند. روش محدودیت غذایی با دسترسی متناوب به دان از ۱۲ تا ۲۴ روزگی

جدول ۱. سطح انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم)، پروتئین خام (درصد)، لیزین قابل هضم (درصد) و نسبت اسیدهای آمینه به لیزین در جیره‌های آزمایشی سنین مختلف

سن (روز)	۰-۱۰	۱۱-۲۴	۲۵-۳۵	۳۶-۴۹
AMEn ^۱	۲۸۵۰	۲۹۰۰	۳۰۰۰	۳۰۵۰
سطوح اسید آمینه*	۱	۲	۱	۲
لیزین (/%)	۱/۱۵	۱/۲۷	۱/۰۸	۰/۹۴
حداقل نسبت اسیدهای آمینه به لیزین				
متیونین + سیستین	۷۴	۷۶	۷۸	۷۸
ترئونین	۶۵	۶۶	۶۷	۶۷
تریپتوفان	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
آرژنین	۱۰۳	۱۰۴	۱۰۵	۱۰۵
ایزولوسین	۶۷	۶۸	۶۹	۶۹
والین	۷۵	۷۶	۷۷	۷۷

۱. انرژی قابل متابولیسم ظاهری تصحیح شده برای نقطه صفر ابقای ازت / (*): سطح ۱: سطح توصیه شده توسط سویه آراین و سطح ۲: ۸ تا ۱۰ درصد بیشتر از توصیه سویه آراین. سطوح کلسیم، فسفر قابل دسترس و سدیم برای هر دو سطح اسیدهای آمینه یکسان است.

جدول ۲. روش‌های خوراکی در سنین مختلف (روز)

روش	۰-۱۱	۱۲-۲۴	۲۵-۴۹
دسترس آزاد به دان ^۱	دسترس آزاد به دان در طول دوره آزمایش		
محدودیت غذایی متناوب ^۲	دسترس آزاد به دان	۱۹ ساعت محرومیت از دان	۱۵ ساعت محرومیت از دان
محدودیت غذایی پیوسته ^۳	دسترس آزاد به دان	۶ ساعت محرومیت	۴ ساعت محرومیت

۱. یک ساعت خاموشی در هر شبانه‌روز / ۱۹.۲ ساعت محرومیت: چهار دوره چهار ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و یک دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه / ۱۵.۳ ساعت محرومیت: پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک

مبنای ۲ عکس آخر رقتی که در آن هم‌گلویتیناسیون دیده می‌شود، به‌عنوان عیار پادنتی ثبت شد. برای تعیین اندازه‌گیری IgM و IgG که اجزای پاسخ به SRBC هستند با جداسازی آنتی‌بادی مقاوم به مرکاپتاتانول (MER) که در حقیقت IgG هست و کسر این مقدار از پاسخ کل می‌توان آنتی‌بادی حساس به مرکاپتاتانول (MES) را به دست آورد که معرف IgM است (Qureshi & Havenstein, 1994). مدل آماری استفاده‌شده به صورت زیر بود:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + e_{ijk}$$

در این مدل y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین جمعیت، T_i اثر سطوح اسیدهای آمینه، S_j اثر روش‌های دسترسی به دان، TS_{ij} اثر متقابل اسیدهای آمینه و روش‌های دسترسی به دان و e_{ijk} اثر عوامل تصادفی باقی‌مانده هستند.

از رویه GLM نرم‌افزار آماری Centurian Statgraphics XVI, version 16.1.11 (شرکت Stat Point) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

در این آزمایش سطح اسیدهای آمینه بر مقدار تلفات و حذفی تأثیری نداشت. استفاده از روش محدودیت غذایی با دسترسی پیوسته به‌طور معنادار ($P < 0.05$) سبب کاهش درصد تلفات و حذفی (۱۰/۵۱ در مقابل ۱۵/۲۲) شد (جدول ۳). محققان زیادی به مؤثر بودن برنامه‌های محدودیت غذایی در کاهش تلفات جوجه‌های گوشتی اذعان داشتند (Wijten *et al.*, 2010; Demir *et al.*, 2004; Yussefi *et al.*, 2010). بیان داشتند که کاهش فعالیت متابولیکی و در نتیجه کاهش نیاز به اکسیژن ممکن است عاملی برای کاهش تلفات باشد، به‌ویژه زمانی که فعالیت متابولیکی حداکثر است.

بر اساس نتایج آزمایش حاضر (جدول ۳) عدم دسترسی به خوراک بر وزن نهایی بدن جوجه‌ها تأثیر منفی نداشته است. اگرچه افزایش سطح اسیدهای آمینه سبب افزایش وزن بدن شد ولی نحوه محدودیت غذایی بر پاسخ جوجه‌ها به سطوح اسیدهای آمینه مؤثر بود، به‌طوری که وقتی از سطح پایین اسیدهای آمینه در جیره استفاده می‌شد اعمال محدودیت غذایی پیوسته سبب حصول وزن بیشتری شد.

در ۱۱، ۲۴ و ۴۸ روزگی از هر تکرار دو قطعه کشتار شدند و کبد، طحال و بورس فابریسیوس وزن‌کشی شد و اوزان آن‌ها به صورت درصدی از وزن بدن محاسبه شد. در ۴۷ روزگی از هر تکرار دو پرنده انتخاب و با استفاده از سرنگ آغشته به ماده ضد انعقاد، خون‌گیری انجام شد. سپس با یک قطره خون گسترش تهیه و به روش Wrigh's staining (1961) رنگ‌آمیزی شد. شمارش تفریقی هتروفیل و لنفوسیت با استفاده از میکروسکوپ نوری و با درشت‌نمایی ۱۰۰۰ برابر انجام شد. در سه ناحیه هر لام ۱۰۰ گلبول سفید (به تفکیک شمارش هتروفیل و لمفوسیت) شمارش شد. برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در ۴۷ روزگی از هر تکرار دو قطعه جوجه انتخاب و از ورید بال آن‌ها ۲ سی‌سی خون‌گیری شد. نمونه‌های خون داخل لوله‌های هپارینه‌شده جمع‌آوری شد. لوله‌های هپارینه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم‌ها جدا و تا زمان اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی در فریزر (-۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. تیترا آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ویروس بیماری نیوکاسل به روش HI انجام شد (Akhlaghi *et al.*, 2012). همچنین برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند^۱ در روزهای ۲۱ و ۳۷ آزمایش از هر تکرار (واحد آزمایش) سه پرنده انتخاب و ۰/۱ سی‌سی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محلول سوسپانسیون ۱۰ درصد SRBC که سه بار با سرم فیزیولوژیک شستشو داده شده بود، از طریق ورید بال به آن‌ها تزریق شد. به ترتیب در ۲۸ و ۴۵ روزگی از پرندگان مزبور نمونه‌های خون جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون یک روز در دمای اتاق قرار داده شدند تا سرم از خون جدا شود. خون با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جدا گردید و تا زمان تیترا آنتی‌بادی در فریزر (-۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. نمونه‌های سرمی جهت خنثی‌شدن سیستم کمپلمان و عدم تداخل آن با پادتن ضد گلبول قرمز گوسفند ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه گذاشته شد. برای تعیین تیترا پاسخ کل (IgM + IgG) از روش هم‌گلویتیناسیون (Isakov *et al.*, 2005; Ambrose & Donner, 1973) میکروتیترا استفاده شد. در هنگام قرائت نمونه‌ها لگاریتم در

1. Sheep Red Blood Cell (SRBC)

جدول ۳. تأثیرات اصلی و متقابل سطوح اسید آمینه و روش دسترسی به دان روی خصوصیات عملکردی جوجه‌های گوشتی در دوره ۴۹ روزه*

اثرهای اصلی فاکتورها	تلفات و حذفی	وزن بدن	مصرف خوراک	ضریب تبدیل غذایی
سطوح اسید آمینه				
توصیه آراین	۱۴/۷۳	۲۹۹۹	۵۹۲۵	۱/۹۷۷
بیشتر از سطح توصیه	۱۴/۲۵	۳۰۶۱	۵۹۶۰	۱/۹۴۸
روش دسترسی به دان				
آزاد ^۱	۱۵/۲۲ ^{ab}	۳۰۳۱	۶۰۴۶ ^a	۱/۹۹۶ ^a
متناوب ^۲	۱۷/۷۵ ^a	۳۰۲۶	۵۸۸۱ ^b	۱/۹۳۸ ^b
پیوسته ^۳	۱۰/۵۱ ^b	۳۰۳۳	۵۹۲۱ ^{ab}	۱/۹۵۳ ^b
اثرات متقابل				
سطوح اسید آمینه				
آزاد	۱۴/۴۹	۲۹۵۸ ^c	۶۰۰۸	۲/۰۳۰ ^a
متناوب	۱۸/۸۴	۲۹۸۸ ^{bc}	۵۸۹۵	۱/۹۷۵ ^{bc}
پیوسته	۱۰/۸۷	۳۰۴۹ ^{ab}	۵۸۷۱	۱/۹۲۵ ^{cd}
آزاد	۱۵/۹۴	۳۱۰۳ ^a	۶۰۸۵	۱/۹۶۳ ^{bc}
متناوب	۱۶/۶۷	۳۰۶۴ ^{ab}	۵۸۲۴	۱/۹۰۲ ^d
پیوسته	۱۰/۱۵	۳۰۱۷ ^{bc}	۵۹۷۱	۱/۹۸۰ ^{ab}
Pooled SEM				
	۲/۹۲۸۶	۲۸/۳	۶۳/۲	۰/۰۱۷
CV (%)				
	۵۰/۷۱	۲/۲	۲/۶	۲/۱
منابع واریانس				
اسید آمینه	۰/۸۴۱۳	۰/۰۱۱	۰/۵۰۰	۰/۰۵۱
روش دسترسی به دان	۰/۰۵۷۲	۰/۹۷۱	۰/۰۱۹	۰/۰۰۷
اثر متقابل	۰/۸۲۴۸	۰/۰۱۴	۰/۳۵۳	۰/۰۰۱

۱. یک ساعت خاموشی در هر شبانه‌روز

۲. ۱۹ ساعت محرومیت: چهار دوره چهار ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و یک دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه.

۳. ۱۵ ساعت محرومیت: پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک

* در هر ستون مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

میزان ۶۰ درصد اشتها تغذیه شده بودند، تفاوت معناداری نداشت. Ravindran *et al.* (2006) نیز گزارش کردند که تنش (افزودن *E. coli* به آب) می‌تواند وزن اندام‌های لنی را کاهش دهد. Houshmand *et al.* (2010) نشان داد که افزایش سطح پروتئین جیره تأثیر معناداری بر وزن طحال ندارد. Hangalapura *et al.* (2005) بیان داشتند که تفاوت‌های ژنتیکی می‌تواند بر پاسخ فیزیولوژیک و ایمونولوژیکی تحت شرایط محدودیت غذایی تأثیرگذار باشد. آن‌ها مشاهده کردند که تحت شرایط محدودیت شدید غذایی وزن نسبی طحال در گروه لاین L (لاین آنتی‌بادی کم) کمتر از گروه لاین H (آنتی‌بادی بیشتر) بود. سطح کورتیکوسترون در گروه لاین L بیشتر از لاین H بود.

افزایش سطح اسیدهای آمینه بر وزن نسبی بورس تأثیری نداشت (جدول ۴). وزن نسبی طحال در ۴۸ روزهگی تحت تأثیر سطح افزایشی اسیدهای آمینه کاهش معنادار یافت ($P < 0.05$). همچنین در این سن عدم دسترسی به دان سبب افزایش معنادار وزن نسبی طحال شد ($P < 0.05$). وزن نسبی بورس در روش‌های محدودیت غذایی با دسترسی متناوب و پیوسته بیشتر از گروه دسترسی آزاد به دان بود، اما تفاوت‌ها معنادار نبود. Katanbaf *et al.* (1989) گزارش کردند که افزایش وزن نسبی اندام‌های لنفاوی به عنوان بهبود پاسخ ایمنی در نظر گرفته می‌شود. Liew *et al.* (2003) گزارش کردند که تولید آنتی‌بادی‌ها و وزن اندام‌های دخیل در ایمنی بین جوجه‌های تغذیه‌شده در حد اشتها و آن‌هایی که به

جدول ۴. تأثیرات اصلی و متقابل سطوح اسید آمینه و روش دسترسی به دان روی وزن نسبی (گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) کبد، طحال و بورس در سنین ۱۱، ۲۴ و ۴۸ روزگی*

تأثیرات اصلی فاکتورها	کبد			طحال			بورس		
	۴۸	۲۴	۱۱	۴۸	۲۴	۱۱	۴۸	۲۴	۱۱
<u>سطوح اسید آمینه</u>									
توصیه آراین	۲/۳۲۶	۲/۸۵۰	۳/۵۲۰	۰/۱۱۶	۰/۱۰۳	۰/۰۹۲	۰/۱۳۱	۰/۲۴۱	۰/۱۷۲
بیشتر از سطح توصیه	۲/۳۰۵	۲/۸۱۰	۳/۳۱۰	۰/۱۰۱	۰/۱۰۵	۰/۰۹۵	۰/۱۳۸	۰/۲۲۳	۰/۱۷۸
<u>روش دسترسی به دان</u>									
آزاد ^۱	۲/۲۹۱	۲/۸۳۰	-	۰/۰۹۵ ^b	۰/۱۰۳	-	۰/۱۱۸	۰/۲۱۹	-
متناوب ^۲	۲/۲۸۳	۲/۸۱۰	-	۰/۱۲۰ ^a	۰/۱۰۲	-	۰/۱۴۳	۰/۲۳۵	-
پیوسته ^۳	۲/۳۷۲	۲/۸۴۰	-	۰/۱۱۱ ^a	۰/۱۰۷	-	۰/۱۴۲	۰/۲۴۳	-
<u>تأثیرات متقابل</u>									
آزاد	۲/۲۳۸	۲/۸۰۰	-	۰/۰۹۶ ^{bc}	۰/۱۰۸ ^{ab}	-	۰/۱۱۰	۰/۲۲۹	-
متناوب	۲/۳۱۳	۲/۸۸۰	-	۰/۱۴۰ ^a	۰/۰۸۸ ^b	-	۰/۱۴۶	۰/۲۶۱	-
پیوسته	۲/۴۲۷	۲/۸۶۰	-	۰/۱۱۱ ^b	۰/۱۱۳ ^a	-	۰/۱۳۷	۰/۲۳۴	-
آزاد	۲/۳۴۵	۲/۸۶۰	-	۰/۰۹۴ ^c	۰/۰۹۸ ^{ab}	-	۰/۱۲۷	۰/۲۰۹	-
متناوب	۲/۲۵۳	۲/۷۳۰	-	۰/۰۹۹ ^{bc}	۰/۱۱۷ ^a	-	۰/۱۴۰	۰/۲۰۸	-
پیوسته	۲/۳۱۷	۲/۸۲۰	-	۰/۱۱۱ ^{bc}	۰/۱۰۰ ^{ab}	-	۰/۱۴۷	۰/۲۵۲	-
Pooled SEM	۰/۱۱۷	۰/۱۸۵	۰/۱۲۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸	۰/۰۱۴	۰/۰۱۹	۰/۰۲۲	۰/۰۱۸
CV (%)	۱۱/۹	۱۵/۹۰۰	۹/۲۰۰	۱۲/۸۰۰	۱۸/۷۰۰	۳۳/۷۰۰	۳۴/۳۰۰	۲۱/۳۰۰	۲۳/۷۰۰
<u>منابع واریانس</u>									
سطح اسید آمینه	۰/۸۲۳	۰/۷۹۸	۰/۲۵۵	۰/۰۰۶	۰/۷۶۶	۰/۸۹۸	۰/۶۶۴	۰/۳۱۲	۰/۸۰۱
روش دسترسی به دان	۰/۷۰۲	۰/۹۸۰	-	۰/۰۰۱	۰/۸۳۷	-	۰/۳۶۹	۰/۵۲۳	-
اثر متقابل	۰/۶۲۷	۰/۸۶۰	-	۰/۰۰۲	۰/۰۲۶	-	۰/۸۳۴	۰/۲۶۴	-

۱. یک ساعت خاموشی در هر شبانه روز

۲. ۱۹ ساعت محرومیت: چهار دوره چهار ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و یک دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه.

۳. ۱۵ ساعت محرومیت: پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک

* در هر ستون مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

ایجاد نشد اما در سطح لیزین ۱/۱ درصد به طور معناداری کمتر بود. Klasing (1988) اظهار کرد که یک دوره محدودیت غذایی پاسخ سلولی و هومورال پرنده به آنتی ژن سلول های قرمز خونی گوسفند را افزایش می دهد.

اثر سطوح مختلف اسیدهای آمینه بر فراسنجه های مربوط به سیستم ایمنی سلولی (جدول ۶) معنادار بود ($P < 0.05$). افزایش سطح اسیدهای آمینه سبب افزایش درصد هتروفیل و کاهش لنفوسیت شد. همچنین نسبت هتروفیل به لنفوسیت با افزایش سطح اسید آمینه افزایش یافت. استفاده از برنامه محدودیت غذایی بر فراسنجه های ایمنی تأثیر معنادار داشت ($P < 0.05$).

اثر سطوح مختلف اسیدهای آمینه و روش های محدودیت غذایی بر عیار آنتی بادی علیه واکسن نیوکاسل، SRBC کل و ایمونوگلوبولین های M و G معنادار نبود. با این حال پاسخ به SRBC در روش های محدودیت غذایی با دسترسی متناوب و پیوسته از گروه تغذیه آزاد کمتر بود (جدول ۵). Jang et al. (2009) در طول دوره محدودیت غذایی اختلاف معناداری در مقادیر IgG مشاهده نکردند. Houshmand (2010) نشان داد که افزایش سطح پروتئین جیره تأثیر معناداری بر عیار آنتی بادی علیه واکسن نیوکاسل نداشت. Panda et al. (2011) نشان دادند با افزایش سطح لیزین از ۱/۲ درصد به ۱/۴ درصد تفاوت معناداری در عیار آنتی بادی SRBC

جدول ۵. تأثیرات اصلی و متقابل سطوح اسید آمینه و روش دسترسی به دان روی تیترا آنتی‌بادی علیه نیوکاسل و آنتی‌ژن گلوبول قرمز گوسفند (پاسخ به تزریق SRBC)

Ig M		Ig G		SRBC		نیوکاسل	تأثیرات اصلی فاکتورها
۲	۱	۲	۱	۲	۱		
۱/۳۷۱	۱/۶۴۸	۵/۳۷۸	۲/۴۳۶	۶/۶۴۸	۴/۰۶۳	۴/۱۷۰	سطح اسید آمینه
۱/۶۳۴	۱/۷۲۲	۵/۰۶۵	۲/۴۳۵	۶/۶۹۸	۴/۱۵۸	۴/۲۵۰	توصیه آراین
۱/۶۹۴	۱/۷۴۹	۵/۳۴۸	۲/۵۸۳	۷/۰۴۱	۴/۳۳۳	۴/۵۸۰	بیشتر از سطح توصیه
۱/۳۸۳	۱/۶۱۲	۵/۲۲۳	۲/۳۳۳	۶/۶۰۴	۳/۹۴۵	۳/۸۸۰	روش دسترسی به دان
۱/۴۳۰	۱/۶۹۵	۴/۹۴۴	۲/۳۹۲	۶/۳۷۵	۴/۰۵۴	۴/۱۷۰	آزاد ^۱
۱/۴۷۲	۲/۰۰۰	۵/۳۶۲	۲/۵۰۰	۶/۸۳۳	۴/۵۰۰	۴/۷۵۰	متناوب ^۲
۱/۲۵۲	۱/۴۴۵	۵/۱۹۵	۲/۳۳۲	۶/۴۴۵	۳/۷۷۸	۳/۵۰۰	پیوسته ^۳
۱/۳۸۸	۱/۵۰۰	۵/۲۷۷	۲/۴۷۷	۶/۶۶۷	۳/۹۱۲	۴/۲۵۰	تأثیرات متقابل
۱/۹۱۷	۱/۴۹۸	۵/۳۳۳	۲/۶۶۵	۷/۲۴۸	۴/۱۶۷	۴/۴۲۰	آزاد
۱/۵۱۳	۱/۷۷۸	۵/۲۵۰	۲/۳۳۳	۶/۷۶۳	۴/۱۱۲	۴/۲۵۰	توصیه آراین
۱/۴۷۲	۱/۸۹۰	۴/۶۱۲	۲/۳۰۷	۶/۰۸۳	۴/۱۹۷	۴/۰۸۰	بیشتر از سطح
۰/۲۰۱	۰/۲۷۴	۰/۴۰۱	۰/۲۴۹	۰/۴۷۰	۰/۳۱۳	۰/۴۳۸	توصیه پیوسته
۳۲/۲۰۰	۳۸/۴۰۰	۱۸/۵۰۰	۲۴/۹۰۰	۱۶/۵۰۰	۱۸/۲۰۰	۲۳/۶۰۰	Pooled SEM
							CV (%)
							منابع واریانس
							سطح اسید آمینه
							روش دسترسی به دان
							اثر متقابل

* در هر ستون مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

۱. تزریق SRBC در دو مرحله ۲۱ و ۳۷ روزگی و خون‌گیری به ترتیب در ۲۸ و ۴۵ روزگی

۲. یک ساعت خاموشی در هر شبانه‌روز

۳. ۱۹ ساعت محرومیت: چهار دوره چهار ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و یک دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه.

۴. ۱۵ ساعت محرومیت: پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک

جدول ۶. تأثیرات اصلی و متقابل سطوح اسید آمینه و روش دسترسی به دان روی مقادیر فراسنجه‌های مربوط به سیستم ایمنی سلولی

فراسنجه ^۱					تأثیرات اصلی فاکتورها
H/L	L	H.S	RBC	WBC	
۰/۳۹۸	۷۰/۲	۲۷/۴	۲/۵۱۹	۲۷۱۶۰	سطح اسید آمینه
۰/۴۱۷	۶۸/۹	۲۸/۷	۲/۴۸۱	۲۶۳۹۹	توصیه آراین
۰/۴۳۳ ^a	۶۸/۰ ^b	۲۹/۳ ^a	۲/۴۴۸	۲۷۹۹۳	بیشتر از سطح توصیه
۰/۳۹۸ ^b	۷۰/۴ ^a	۲۷/۸ ^b	۲/۵۲۸	۲۶۰۸۶	روش دسترسی به دان
۰/۳۹۱ ^b	۷۰/۳ ^a	۲۷/۲ ^b	۲/۵۲۵	۲۶۲۶۰	آزاد ^۱
۰/۴۴۱	۶۸/۰	۲۹/۲	۲/۳۹۷	۲۸۳۱۷	متناوب ^۲
۰/۳۷۶	۷۱/۵	۲۶/۵	۲/۶۶۲	۲۶۱۸۱	پیوسته ^۳
۰/۳۷۷	۷۱/۰	۲۶/۵	۲/۵۰۰	۲۶۹۸۳	تأثیرات متقابل
۰/۴۲۶	۶۸/۰	۲۹/۳	۲/۵۰۰	۲۷۶۷۰	آزاد
۰/۴۲۰	۶۹/۳	۲۹/۰	۲/۳۹۳	۲۵۹۹۲	متناوب
۰/۴۰۴	۶۹/۵	۲۷/۸	۲/۵۵۰	۲۵۵۳۷	پیوسته
۰/۰۱	۰/۵۶	۰/۶۴	۰/۱۳	۸۹۸	Pooled SEM
۸/۴	۱/۹	۵/۳	۱۲/۴	۸/۱	CV (%)
					منابع واریانس
					سطح اسید آمینه
					روش دسترسی به دان
					اثر متقابل

* در هر ستون مقادیر با حروف متفاوت از نظر آماری تفاوت معناداری دارند ($P < 0.05$).

۱. WBC: گلوبول سفید خون؛ RBC: گلوبول قرمز خون ($10^6 / \mu l$)؛ HS: درصد هتروفیل؛ L: درصد لنفوسیت؛ M: درصد مونوسیت و H/L: نسبت هتروفیل به لنفوسیت.

۲. یک ساعت خاموشی در هر شبانه‌روز

۳. ۱۹ ساعت محرومیت: چهار دوره چهار ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و یک دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه.

۴. ۱۵ ساعت محرومیت: پنج دوره سه ساعته محرومیت و یک ساعت تغذیه و سپس چهار ساعت متوالی دسترسی آزاد به خوراک

(Kang, 2011; Nicole, 2006; Turkyilmaz, 2008) اگرچه هورمون کورتیکوسترون در این پژوهش اندازه‌گیری نشد ولی با توجه به یافته‌های برخی محققان (Hu et al., 2008) می‌توان کاهش درصد لنفوسیت‌ها و اندازه اندام‌های لنفی را به افزایش این هورمون نسبت داد. به‌طور کلی، برنامه‌های محدودیت غذایی اعمال‌شده در این پژوهش، به‌ویژه تنظیم جیره‌ها بر اساس سطح توصیه آراین به‌همراه روش محدودیت غذایی پیوسته می‌تواند تدبیر مدیریتی خوبی برای تقویت سیستم ایمنی و بهبود عملکرد تولیدی جوجه‌های گوشتی باشد.

سپاسگزاری

از همکاری مدیریت و پرسنل محترم مجتمع مرغ لاین آراین بابل کنار در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

هر دو روش محدودیت غذایی با دسترسی متناوب و پیوسته سبب کاهش درصد هتروفیل و افزایش لنفوسیت و در نتیجه کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت شد. Zulkifli et al. (2003) گزارش کردند که نسبت هتروفیل به لنفوسیت نشان‌دهنده قابل اعتمادی از تنش است. در گزارش Hassanzadeh et al. (2004) کورتیکوسترون سبب افزایش نسبت هتروفیل به لنفوسیت و آزادسازی زودتر لنفوسیت‌ها از مغز قرمز استخوان شد که افزایش درصد لنفوسیت‌های نارس خون را در پی داشت. Maxwell et al. (1991) نشان دادند که محدودیت غذایی باعث افزایش معنادار نسبت هتروفیل به لنفوسیت در ۴۲ روزگی شد. پژوهش‌های دیگر نشان می‌دهد که با اعمال محدودیت غذایی در پرندگان تفاوت معناداری در گلبول‌های سفید، هتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها ایجاد نشد

REFERENCES

1. Yussefi Kelaricolaee, K., Husseini, S. A., Shojaee, H., Eghbalian, A. N. & Yussefi, H. (2010). Study the effect of restricted time of feeding on performance and carcass characteristics of Arian broiler chickens. *Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 89, 22-27. (In Farsi)
2. Yussefi Kelaricolaee, K., Moraveg, H., Husseini, S. A. & Pakdel, A. (2013). Amino acid density and feeding methods on performance and carcass parameters of Arian broiler chickens. *Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 105. (In press) (In Farsi)
3. Arian Broiler Management Guide. (2015). ministry of Agriculture. 5th edition. (In Farsi)
4. Akhlaghi, A., Zamiri, M. J., Jafari Ahangari, Y., Atashi, H., Ansari Pirsaraei, Z., Deldar, H., Eghbalian, A. N., Akhlaghi, A. A., Navidshad, B., Yussefi Kelarikolaei, K. & Hashemi, S. R. (2013). Oral exposure of broiler breeder hens to extra thyroxine modulates early adaptive immune responses in progeny chicks. *Poultry Science*, 92, 1040-1049.
5. Cobb-Vantress. (2012). Broiler growth & Nutrition supplement-Cobb 500, Cobb-Vantress, Siloam Springs, Arkansas.
6. Dibner, J. J., Knight, C. D., Kitchell, M. L., Atwell, C. A., Downs, A. C. & Ivey, E. J. (1998). Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, 7, 425-436.
7. De Jong, I. C., Van Voorst, S., Ehlhardt, D. A. & Blokhuis, H. J. (2002). Effects of restricted feeding on physiological stress parameters in growing broiler breeders. *British Poultry Science*, 43, 157-168.
8. Demir, E., Sarica, S., Sekeroglu, A., Ozean, M. A. & Seker, Y. (2004). Effects of early and late feed restriction or feed withdrawal on growth performance, ascites and blood constituents of broiler chickens. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 54, 152-158.
9. Feng, Y., Yang, X. J., Wang, Y. B., Li, W. L., Liu, Y., Yin, R. Q. & Yao, J. H. (2012). Effects of immune stress on performance parameters, intestinal enzyme activity and mRNA expression of intestinal transporters in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 701-707.
10. Garriga, C., Hunter, R. R., Amat, C., Planas, J. M., Mitchell, M. A. & Moreto, M. (2006). Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290, 195-201.
11. Hangalapura, B. N., Nieuwland, M. G. B., De Vries Reilingh, G., Buyse, J., Van Den Brand, H., Kemp, B. & Parmentier, H. K. (2005). Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*, 84, 1520-1529.
12. Hassanzadeh, M., Bozorgmerifard, M. H., Buyse, J., Bruggeman, V. & Decuypere, E. (2004). Effect of chronic hypoxia during the embryonic development on the physiological functioning and on hatching parameters related to ascites syndrome in broiler chickens. *Avian Pathology*, 33, 558-564.
13. Houshmand, M. (2010). *A comparative study on the efficacy of a commercial prebiotic, probiotic and organic acids in improving the performance of broiler chicken*. Ph.D. thesis, University Putra, Malaysia.
14. Hu, X. F. & Guo, Y. M. (2008). Corticosterone administration alters small intestinal morphology and function of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21, 1773-1778.

15. Hu, X. F., Guo, Y. M., Huang, B. Y., Zhang, L. B., Bun, S., Liu, D., Long, F. Y., Li, J. H., Yang, X. & Jiao, P. (2010). Effect of corticosterone administration on small intestinal weight and expression of small intestinal nutrient transporter mRNA of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 175-181.
16. Houshmand, M. (2010). *A comparative study on the efficacy of a commercial prebiotic, probiotic and organic acids in improving the performance of broiler chicken*. Ph.D thesis. University Putra, Malaysia.
17. Jang, I. S., Kang, S. Y., Ko, Y. H., Moon, Y. S. & Sohn, S. H. (2009). Effect of qualitative and quantitative feed restriction on growth performance and immune function in broiler chickens. *Asian - Australasian journal of animal sciences*, 22, 388-395.
18. Kang, M. S., Kwon, Y. K., Jung, B. Y., Kim, A., Lee, K. M., An, B. K., Song, E. A., Kwon, J. H. & Chung, G. S. (2011). Differential identification of Salmonella enteric serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. *Veterinary Microbiology*, 147, 181-185.
19. Katanbaf, M. N., Dunnington, E. A. & Siegel, P. B. (1989). Restricted feeding in early and late-feathering chickens. 1. Growth and physiological responses. *Poultry Science*, 68, 344-351.
20. Khajavi, M., Rahimi, S., Hassan, Z. M., Kamali, M. A. & Mousavi, T. (2003). Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. *British Poultry Science*, 4, 490-497.
21. Klasing, K. C. (1988). Influence of acute feed deprivation or excess feed intake on immunocompetence of broiler chicks. *Poultry Science*, 67, 626-634.
22. Klasing, K. C. (2004). The costs of immunity. *Acta Zoologica Sinica*, 50, 961-969.
23. Lemme, A., Elwert, C. & Casanovas, P. (2009). Optimal dietary amino acid supply in Cobb 500 broilers under European feeding conditions. *Evonik Degussa (Amino news)*, Vol. 13, No. 01.
24. Liew, P. K., Zulkifli, I., Hair-Bejo, M., Omar, A. R. & Israf, D. A. (2003). Effects of early age feed restriction and heat conditioning on heat shock protein 70 expression, resistance to infectious bursal disease, and growth in male broiler chickens subjected to heat stress. *Poultry Science*, 82, 1879-1885.
25. Maxwell, M. H., Robertson, G. W., Anderson, I. A., Dick, L. A. & Lynch, M. (1991). Haematology and histopathology of seven-week-old broilers after early food restriction. *Research in Veterinary Science*, 50, 290-297.
26. Moberg, G. A. & Mench, J. A. (2000). *The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare*. CAB International Publishing.
27. Nicol, C. J., Brown, S. N., Glen, E., Pope, S. J., Short, F. J., Warriss, P. D., Zimmerman, P. H. & Wilkins, L. J. (2006). Effects of stocking density flock size and management on the welfare of laying hens in single-tier aviaries. *British Poultry Science*, 47, 135-146.
28. Panda, A. K., Rama Rao, S. V., Raju, M. V. L. N., Lavanya, G., Pradeep Kumar Reddy, E., and Shyam Sunder, G. (2011). Early growth response of broilers to dietary lysine at fixed ratio to crude protein and essential amino acids. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 1623-1628.
29. QuickChick (2006): Version 1.0 – Software on amino acid recommendation for broilers. Evonik Degussa GmbH, Health & Nutrition, Animal Nutrition Services, Hanau.
30. Rajkumar, U., Reddy, M. R., Rama Rao, S. V., Radhika, K. & Shanmugam, M. (2011). Evaluation of growth, carcass, immune response and stress parameters in naked neck chicken and their normal siblings under tropical winter and summer temperatures. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 509-516.
31. Ravindran, V. (2006). *Broiler nutrition in New Zealand-challenges and strategies*. Available at: www.feedinfo.com
32. Schmidt, C. J., Persia, M. E., Feierstein, E., Kingham, B. & Saylor, W. W. (2009). Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1950s. *Poultry Science*, 88, 2610-2619.
33. Svihus, B., Sacranie, A. Denstadli, V. & Choct, M. (2010). Nutrient utilization and functionality of the anterior digestive tract caused by intermittent feeding and inclusion of whole wheat in diets for broiler chickens. *Poultry Science*, 89, 2617-2625.
34. Svihus, B., Sacranie, A. Denstadli, V. & Choct, M. (2010). Nutrient utilization and functionality of the anterior digestive tract caused by intermittent feeding and inclusion of whole wheat in diets for broiler chickens. *Poultry Science*, 89, 2617-2625.
35. Turkyilmaz, M. K. (2008). Effect of stocking density on stress reaction in broiler chickens during summer. *Turkish Journal of Veterinary in Animal Science*, 32, 31-36.
36. Wijten, P. J. A., Hangoor, E., Sparla, J. K. W. M. & Verstegen, M. W. A. (2010). Dietary amino acid levels and feed restriction affect small intestinal development, mortality, and weight gain of male broilers. *Poultry Science*, 89, 1424-1439.
37. Wijten, P. J. A., Hangoor, E., Perdok, H. & Sparla, J. K. W. M. (2008). The effect of early life feed restriction on performance and mortality of male broilers. *Book of abstracts of the XXIII World's Poultry Congress*, Brisbane, Australia, June 30 - July 4, p. 234-234.
38. Zulkifli, I., Liew, P. K., Israf, D. A., Omar, A. R. & Hair-Bejo, M. (2003). Effect of early age feed restriction and heat conditioning on heterophil/lymphocyte ratios, heat shock protein 70 expression and body temperature of heat-stressed broiler chickens. *Journal of Thermal Biology*, 28, 217-222.