



Research Paper

Evaluation of Different Levels of Marigold (*Calendula officinalis*) Oil Extract on Performance, Immune Response, and Egg Quality Characteristics in Laying Hens

Elham Nasibi¹, Ehsan Salehifar^{*2}, Mojtaba Hosseinpour Mashhadi³

1. Graduate Student of Animal Nutrition, Department of Agriculture Science, Ma. C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran. E-mail: nasibie.elham2014@gmail.com.

2. Department of Agricultural Science, Ma. C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
E-mail: E.salehifar@iau.ac.ir.

3. Department of Agricultural Science, Ma. C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
E-mail: mojtaba_h_m@yahoo.com.

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	The use of natural feed additives as alternatives to antibiotics in poultry nutrition has gained increasing attention. Marigold (<i>Calendula officinalis</i>) is rich in bioactive compounds such as carotenoids, flavonoids, and saponins, which can influence the performance and immunity of birds. This study was conducted to investigate the effects of different levels of marigold oil extract on productive performance, immune response, and egg quality in laying hens. A total of 80 laying hens (Hy-Line, 34 week) were randomly assigned to a completely randomized design with 5 treatments, 4 replicates, and 4 birds per replicate, over an 8-week period. The treatments included: 1) basal diet + 0.2% extract, 2) basal diet + 0.4% extract, 3) basal diet + 0.8% extract, 4) basal diet + commercial pigment, and 5) a control diet (corn-soybean). Performance parameters, egg quality traits (yolk color, yolk weight, shell thickness, Haugh unit), and antibody titers against SRBC were measured. The results showed that treatments containing the extract, particularly at 0.4% and 0.8% levels, significantly improved egg weight, egg mass, and feed conversion ratio compared to the control ($P < 0.05$). Yolk color was significantly increased in the extract treatments; however, the highest score was observed in the commercial pigment treatment ($P < 0.001$). Furthermore, extract treatments led to a significant increase in antibody titers against SRBC ($P < 0.05$). In conclusion, marigold extract, especially at 0.2% levels, can be utilized as an effective natural feed additive to improve performance, strengthen immunity, and enhance egg quality (particularly yolk color) in laying hen nutrition.
Article history: Received: 12 April 2026 Accepted: 13 June 2026 Published online: Spring 2026	
Keywords: Immune system, Laying hens, Marigold extract, Performance, Yolk color.	

Cite this article: Nasibi, E., Salehifar, E. & Hosseinpour Mashhadi, M. (2026). Evaluation of Different Levels of Marigold (*Calendula officinalis*) Oil Extract on Performance, Immune Response, and Egg Quality Characteristics in Laying Hens. *Journal of Livestock Research*, 8 (1), 31-50. DOI:10.22077/jlr.2026.11878.1064

DOI: <https://doi.org/10.22077/jlr.2026.11878.1064>

Publisher: The University of Birjand Press.

Extended Abstract

Introduction

The global ban on antibiotic growth promoters (AGPs) in poultry production has intensified the search for natural, safe, and welfare-compatible alternatives. Phytogetic feed additives, particularly those rich in carotenoids, flavonoids, and saponins, have gained attention due to their antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties. Marigold (*Calendula officinalis*) is one such plant, containing bioactive compounds that can positively influence performance, immune function, and egg quality in laying hens. However, the optimal dietary inclusion level of marigold oil extract and its comprehensive effects on productive performance, immune response, and egg quality traits—particularly yolk pigmentation—remain insufficiently investigated under commercial conditions. Therefore, this study was conducted to evaluate the effects of different levels (0.2%, 0.4%, and 0.8% of the diet, equivalent to 2, 4, and 8 g/kg) of marigold oil extract on productive performance, humoral immune response, and egg quality characteristics in laying hens.

Methods

Research Design and Sample Size: A total of 80 laying hens (Hy-Line W-36 strain, 34 weeks of age, initial body weight 1.6 ± 0.17 kg, initial egg production $92 \pm 2.5\%$) were randomly allocated to a completely randomized design (CRD) with 5 treatments, 4 replicates, and 4 birds per replicate. The experimental period lasted 8 weeks (from 34 to 43 weeks of age). Birds were housed in standard battery cages (40 × 50 cm) under controlled environmental conditions: temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity 55–65%, and a lighting schedule of 16L:8D. Feed and water were provided ad libitum throughout the experiment.

Materials and Dietary Treatments: The five dietary treatments were: (1) basal diet + 0.2% marigold oil extract (2 g/kg), (2) basal diet + 0.4% marigold oil extract (4 g/kg), (3) basal diet + 0.8% marigold oil extract (8 g/kg), (4) basal diet + commercial pigment (positive control; Lucantin®, BASF, Germany), and (5) control diet (corn-soybean basal diet without any additive). All diets were formulated to be isocaloric (2,650 kcal ME/kg) and isonitrogenous (16.6% CP) based on NRC (1994) recommendations. To maintain isocaloric conditions, the vegetable oil content was adjusted proportionally when the oleoresin was added to the diets.

Extract Preparation: The marigold oil extract was prepared by macerating dried marigold flowers in hexane (1:5 w/v ratio) at 30°C for 15 minutes. The resulting oleoresin was concentrated and stabilized with 0.1–0.3% ethoxyquin to prevent xanthophyll degradation. The concentrated oleoresin had a relatively lower carotenoid concentration (approximately 2.5% total carotenoids) compared to commercial standardized extracts; therefore, inclusion levels of 0.2%, 0.4%, and 0.8% (2, 4, and 8 g/kg) were selected based on a preliminary dose-response trial.

Productive performance: Feed intake (FI), egg production (EP), egg weight (EW), egg mass (EM), and feed conversion ratio (FCR), were recorded daily and calculated weekly.

Immune Response: At week 6 of the experiment, two birds per replicate were selected for immune response assessment. Each bird received an intramuscular injection of 0.25 mL of 9% sheep red blood cell (SRBC) suspension. Blood samples were collected 7 days after primary and secondary injections, and serum antibody titers against SRBC were measured using the hemagglutination method (Van der Zijpp & Leenstra, 1980).

Egg quality: At weeks 4 and 8 (phases 1 and 2), three eggs per replicate were randomly collected and analyzed within 24 hours. Parameters measured included: egg weight, yolk weight, albumen weight, shell weight, yolk color (using the Roche Yolk Color Fan, scale 1–15), Haugh unit (calculated using the formula $HU = 100 \log [AH + 7.57 - 1.7 EW^{0.37}]$; Haugh, 1937), shell thickness (measured at three points using a digital micrometer), and shell strength (measured using an Instron universal testing machine at a constant speed of 20 mm/min until the breaking point; Roberts, 2004). All egg quality measurements were performed according to standard methods (Silversides & Villeneuve, 1994; Karadas et al., 2006).

Statistical Analysis: Data were analyzed using the GLM procedure of SAS (version 9.4). Means were compared using Duncan's multiple range test at a significance level of $P < 0.05$. All data are presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

Results

The results showed that dietary supplementation with marigold oil extract significantly improved productive performance parameters. Over the entire 8-week period, all three extract levels (0.2%, 0.4%, and 0.8%) significantly increased egg weight, egg mass, and improved feed conversion ratio compared to the control and commercial pigment treatments ($P < 0.05$). The highest egg weight (62.09 g) was observed in the 0.4% extract treatment, while the 0.2% and 0.8% treatments showed intermediate values. Egg mass followed a similar pattern, with all extract groups significantly higher than the control and pigment groups ($P < 0.05$). Feed conversion ratio was significantly improved in all extract treatments (1.85–1.88) compared to the control (1.93) and pigment (1.92) groups ($P < 0.0001$). Notably, feed intake was significantly higher in the 0.8% extract group (109.29 g/d) compared to all other treatments ($P < 0.0001$), indicating lower feed efficiency at this level.

Regarding egg quality, yolk color improvement was time- and dose-dependent. In phase 1, none of the extract treatments significantly increased yolk color compared to the control; only the commercial pigment showed superior pigmentation ($P < 0.001$). In phase 2, however, the 0.2% and 0.4% extract treatments significantly improved yolk color (6.50 and 6.87, respectively) compared to the control (6.25; $P < 0.05$). The 0.8% extract treatment showed the lowest yolk color (5.37), even lower than the control, indicating an inverse dose-response pattern at higher levels. Haugh unit, an indicator of albumen quality, was significantly improved in the 0.2% extract and commercial pigment treatments (70.83 and 71.12, respectively) compared to the control (63.85; $P < 0.05$). Shell thickness was significantly increased in all extract treatments (0.390–0.398 mm) compared to the control (0.345 mm) and pigment (0.350 mm) groups in phase 2 ($P < 0.05$). Yolk weight showed a significant increase in the 0.2% extract treatment in phase 1 (17.58 g) compared to the control (17.07 g), although this effect was not consistent in phase 2. Humoral immune response, measured as antibody titers against SRBC, was significantly enhanced in all extract-supplemented groups compared to the control and commercial pigment groups ($P = 0.0126$). The highest antibody titer (5.50 log₂) was observed in the 0.8% extract treatment, followed by 0.4% (5.25) and 0.2% (5.00), while

the control and pigment groups showed significantly lower titers (4.25–4.50). This indicates that marigold extract, particularly at higher levels, stimulates humoral immune function in laying hens.

Conclusion

The findings of this study demonstrate that dietary supplementation with marigold oil extract, particularly at 0.2% (2 g/kg), can significantly improve productive performance (egg weight, egg mass, and feed conversion ratio), egg quality (yolk color, Haugh unit, and shell thickness), and humoral immune response in laying hens. The dose-response pattern for yolk color was non-linear and inverse: the 0.2% extract treatment consistently provided the best balance of performance and quality, while the 0.8% level increased feed intake without proportional improvements in performance and even reduced yolk pigmentation.

Practical Implications: The 0.2% level is recommended as the optimal inclusion level for improving overall performance, egg quality, and immune function in laying hen diets, offering a cost-effective and welfare-compatible alternative to commercial pigments and antibiotic growth promoters in intensive poultry production systems.

Unresolved Issues and Future Research: Although behavioral parameters were not directly measured, the improved physiological status observed could potentially translate into reduced stress-related behaviors. Long-term studies across multiple laying cycles, dose-response trials for optimal inclusion levels, and molecular mechanisms underlying the observed synergistic effects warrant further investigation.

Keywords: Marigold extract, laying hens, performance, immune response, egg quality, yolk color.

Author Contributions

[Conceptualization: Ehsan Salehifar; Methodology: Ehsan Salehifar, Elham Nasibi; Data analysis: Mojtaba Hoseinpour Mashhadi; Writing – original draft: Elham Nasibi; Writing – review & editing: Ehsan Salehifar]

Data Availability Statement

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

Ethical consideration

All experimental procedures were conducted in accordance with standard apicultural practices and ethical guidelines for invertebrate research.

AI Tools

The authors confirm that artificial intelligence has not been used in generating this manuscript, except for linguistic, stylistic, and grammatical corrections.

بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر عملکرد، پاسخ سیستم ایمنی و خصوصیات کیفی تخم مرغ در مرغ های تخم گذار

الهام نصیبی^۱، احسان صالحی فر^۲، مجتبی حسین پور مشهدی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه مهندسی کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. رایانامه: nasibie.elham2014@gmail.com

۲. استادیار تغذیه طیور، گروه علوم دامی، گروه مهندسی کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. نویسنده مسئول رایانامه: E.salehifar@iau.ac.ir

۳. دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه مهندسی کشاورزی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. رایانامه: mojtaba_h_m@yahoo.com

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

زمینه و هدف: امروزه استفاده از افزودنی های طبیعی به جای آنتی بیوتیک ها در تغذیه طیور مورد توجه است. گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) سرشار از ترکیبات زیست فعال مانند کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین ها است که می توانند بر عملکرد و ایمنی پرندگان تأثیرگذار باشند. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره روغنی گل همیشه بهار بر عملکرد تولیدی، پاسخ ایمنی و کیفیت تخم مرغ در مرغ های تخم گذار انجام شد. **روش پژوهش:** تعداد ۸۰ قطعه مرغ تخم گذار (سن ۳۴ هفته ای، سویه هایلاین W36) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۴ پرند در هر تکرار به مدت ۸ هفته آزمایش شدند. تیمارها شامل: (۱) جیره پایه + ۰/۲ درصد عصاره، (۲) جیره پایه + ۰/۴ درصد عصاره، (۳) جیره پایه + ۰/۸ درصد عصاره، (۴) جیره پایه + رنگدانه تجاری و (۵) جیره شاهد (ذرت-سویا) بودند. شاخص های عملکردی، کیفیت تخم مرغ (رنگ زرده، وزن زرده، ضخامت پوسته، واحد هاو) و تیتر آنتی بادی علیه SRBC اندازه گیری شدند. **یافته ها:** تیمارهای حاوی عصاره به ویژه در سطوح ۰/۴ و ۰/۸ درصد، وزن تخم مرغ، توده تخم مرغ و ضریب تبدیل غذایی را به طور معنی داری نسبت به شاهد بهبود دادند ($P < 0.05$) رنگ زرده در تیمارهای عصاره به طور معنی داری افزایش یافت، هرچند بالاترین امتیاز مربوط به تیمار رنگدانه تجاری بود ($P < 0.001$) همچنین تیمارهای عصاره باعث افزایش معنی دار تیتر آنتی بادی علیه SRBC شدند ($P < 0.05$). **نتیجه گیری کلی:** عصاره گل همیشه بهار، به ویژه در سطح ۰/۲ درصد، می تواند به عنوان یک افزودنی طبیعی مؤثر در بهبود عملکرد، تقویت ایمنی و ارتقاء کیفیت تخم مرغ (به ویژه رنگ زرده) در تغذیه مرغ های تخم گذار استفاده شود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۳

تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۵

واژگان کلیدی:

رنگ زرده، سیستم ایمنی، عملکرد، گل همیشه بهار، مرغ تخم گذار

استناد: نصیبی، الهام؛ صالحی فر، احسان و حسین پور مشهدی، مجتبی (۱۴۰۵). بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر عملکرد، پاسخ سیستم ایمنی و خصوصیات کیفی تخم مرغ در مرغ های تخم گذار. مجله تحقیقات دام و طیور، دوره ۸، شماره ۱، ۵۰-۳۱. DOI:10.22077/jlr.2026.11878.1064

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه بیرجند

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از افزودنی‌های طبیعی به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده است. نگرانی‌های روزافزون مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باقیمانده‌های دارویی در فرآورده‌های دامی و همچنین تمایل مصرف‌کنندگان به محصولات ارگانیک و عاری از مواد شیمیایی، سبب شده است که پژوهشگران به‌طور جدی به گیاهان دارویی و ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها به‌عنوان گزینه‌هایی مؤثر برای بهبود عملکرد و سلامت طیور روی آورند (Hashemi & Davoodi, 2011; Windisch et al., 2008). در این میان، یکی از گیاهان دارویی ارزشمند که به‌طور گسترده در طب سنتی و علوم تغذیه‌ای مطرح شده است، گل همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* از خانواده *Asteraceae* می‌باشد (Preethi & Kuttan, 2009). این گیاه دارای ترکیبات فعال زیستی متعددی نظیر فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، پلی‌فنول‌ها، اسانس‌های فرار و مهم‌تر از همه کاروتنوئیدها (به‌ویژه لوتئین و زیگزانتین) است که اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ایمنی‌زایی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند (Della Loggia et al., 1994; Ghasemi et al., 2014; Parente et al., 2012). پژوهش‌های جدیدتر نیز نشان داده‌اند که کوئرستاجتین (*Quercetagenin*)، به‌عنوان یک فلاونوئید فعال در عصاره گل همیشه‌بهار، با ساختار پلی‌هیدروکسی خود، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به سایر فلاونوئیدها دارد و می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی *Keap1-Nrf2*، بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر *CAT*، *SOD* و *GPX* را افزایش می‌دهد (Yang et al., 2025). این ترکیبات می‌توانند با تقویت سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی، بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی، افزایش سلامت مخاط روده و بهینه‌سازی جذب مواد مغذی، تأثیرات مثبت چشمگیری بر عملکرد تولیدی طیور بر جای بگذارند (Mohammadi Gheisar & Kim, 2018).

در صنعت مرغ‌های تخم‌گذار، به‌کارگیری منابع طبیعی غنی از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی نظیر گل همیشه‌بهار، از اهمیت ویژه‌ای برای افزایش رنگ زرده تخم‌مرغ برخوردار است. رنگ زرده نه‌تنها یکی از مهم‌ترین شاخص‌های کیفی برای مصرف‌کننده و بازار فروش تخم‌مرغ محسوب می‌شود، بلکه از منظر اقتصادی و تجاری نیز نقش تعیین‌کننده‌ای در پذیرش محصول توسط خریداران دارد (Karadas et al., 2005). از آنجا که طیور قادر به سنتز کاروتنوئیدها در بدن خود نیستند، تأمین این ترکیبات به‌طور کامل از طریق جیره غذایی صورت می‌گیرد. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی به بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره و پودر گل همیشه‌بهار بر عملکرد و کیفیت تخم‌مرغ پرداخته‌اند. به‌عنوان مثال، مایا و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که افزودن ۲/۶۰ ppm عصاره گل همیشه‌بهار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار سبک (۷۵ تا ۸۵ هفتگی) باعث بهبود شاخص زرده و واحد هاو می‌شود. همچنین، یانگ و همکاران (۲۰۲۲) در یک مطالعه ۲۴ هفته‌ای روی ۸۰۰ قطعه مرغ تخم‌گذار ۴۵ هفته‌ای نشان دادند که افزودن ۴۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گل همیشه‌بهار، درصد تولید و کیفیت تخم‌مرغ را به‌طور معنی‌داری افزایش و نسبت خوراک به تخم‌مرغ را کاهش می‌دهد. سطح ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین تأثیر را در کاهش محصولات اکسیداتیو و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی داشت. به‌طور مشابه، Hassan و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که استفاده از عصاره گل همیشه‌بهار در جیره مرغ‌های تخم‌گذار می‌تواند به‌طور معنی‌داری کیفیت تخم‌مرغ، به‌ویژه رنگ زرده و ضخامت پوسته را بهبود بخشد، هرچند تأثیر آن بر عملکرد تولیدی در برخی سطوح مصرف معنی‌دار نبود. کلجاک و همکاران (۲۰۲۱) نیز در پژوهشی به بررسی اثر مکمل‌سازی جیره با گل‌های همیشه‌بهار و ریحان خشک بر رنگ زرده و پایداری اکسیداتیو تخم‌مرغ پرداختند و دریافتند که این گیاهان می‌توانند به‌عنوان منابع طبیعی رنگدانه در جیره مرغ‌های تخم‌گذار مورد استفاده قرار گیرند. با این وجود، بسیاری از پژوهش‌های پیشین عمدتاً بر تأثیر این گیاه بر رنگدانه‌گذاری متمرکز بوده و کمتر به ارزیابی هم‌زمان آن بر مجموعه‌ای از شاخص‌های عملکردی، پاسخ‌های ایمنی و پارامترهای متنوع کیفی تخم‌مرغ پرداخته‌اند. با وجود مزایای اثبات‌شده، اطلاعات کافی درباره سطوح بهینه استفاده از عصاره روغنی گل همیشه‌بهار و تأثیر مقادیر مختلف آن بر عملکرد تولیدی، سیستم ایمنی و خصوصیات کیفی تخم‌مرغ در شرایط تجاری و در دوره‌های تولیدی میانی و پایانی، همچنان محدود است. به‌ویژه اینکه بیشتر

تحقیقات انجام‌شده از پودر گل یا عصاره‌های ساده آبی استفاده کرده‌اند (Matache et al., 2024) و مطالعات اندکی به بررسی عصاره روغن با سطوح متفاوت پرداخته‌اند. از این رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ درصد) عصاره روغنی گل همیشه‌بهار بر عملکرد تولیدی (شامل وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و ضریب تبدیل خوراک)، پاسخ ایمنی هومورال (از طریق اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفندی) و نیز خصوصیات کیفی تخم‌مرغ به‌ویژه رنگ زرده، وزن زرده و واحد هاو در مرغ‌های تخم‌گذار اجرا گردید. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه کاربرد افزودنی‌های طبیعی، کاهش وابستگی به رنگدانه‌های شیمیایی و بهبود کیفیت نهایی محصول در صنعت تولید تخم‌مرغ باشد.

روش شناسی پژوهش

این آزمایش به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف عصاره روغنی گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*) بر عملکرد تولیدی، پاسخ ایمنی و کیفیت تخم‌مرغ مرغ‌های تخم‌گذار، سویه تجاری های-لاین W-36 (*Hy-Line W-36*) با میانگین وزن اولیه ۱/۷ کیلوگرم و میانگین تولید اولیه $2/5 \pm 92$ درصد، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۴ قطعه مرغ در هر تکرار (مجموعاً ۸۰ قطعه) انجام شد. طول دوره آزمایش ۸ هفته (از سن ۳۴ تا ۴۲ هفتگی) بود. پرندگان در قفس‌های استاندارد طبقاتی با ابعاد ۵۰×۴۰ سانتی‌متر نگهداری شدند و شرایط محیطی از نظر دما (22 ± 2 درجه سانتی‌گراد)، تهویه، نوردهی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و دسترسی آزاد به خوراک و آب در طول دوره آزمایش یکسان بود. تیمارهای آزمایشی شامل موارد زیر بودند:

۱) جیره پایه + ۰/۲ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۲) جیره پایه + ۰/۴ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۳) جیره پایه + ۰/۸ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۴) جیره پایه + رنگدانه تجاری (کنترل مثبت)، ۵) جیره شاهد (بر پایه ذرت-سویا، فاقد عصاره یا رنگدانه)

تمامی جیره‌ها به صورت ایزوکالریک و ایزونیتروژن تهیه شدند و بر اساس نیازمندی‌های غذایی مرغ تخم‌گذار بر اساس توصیه‌های کاتالوگ تنظیم گردیدند. با توجه به اینکه عصاره روغنی (اولئورزین) به عنوان منبع انرژی در جیره محسوب می‌شود، برای حفظ حالت ایزوکالریک، مقدار روغن گیاهی موجود در جیره شاهد به تناسب کاهش یافت و عصاره جایگزین آن گردید. بدین ترتیب، مجموع درصد مواد تشکیل‌دهنده جیره در تمام تیمارها ۱۰۰ درصد باقی ماند و جیره‌ها از نظر انرژی قابل سوخت و ساز و پروتئین خام یکسان بودند. خوراک به صورت پلت شده و روزانه به میزان کافی در اختیار پرندگان قرار گرفت. در این پژوهش، از یک رنگدانه تجاری حاوی ترکیبات کاروتنوئیدی استاندارد (شامل کانتاگرانترین و استرهای کاروتنوئیدی) با نام تجاری *Lucantin®* (BASF, Germany) استفاده شد.

روش تهیه عصاره

برای تهیه عصاره روغنی، گل‌های خشک شده همیشه‌بهار از بازار محلی تهیه و پس از شست‌وشو، در سایه و در دمای محیط خشک شدند. سپس گل‌های خشک شده با آسیاب رومیزی به صورت پودر یکدست با اندازه ذرات ۰/۵ میلی‌متر آسیاب گردیدند. برای استخراج رنگدانه‌ها، از حلال هگزان در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد (نسبت ۱۰:۱). عصاره به‌دست‌آمده پس از تقطیر به اولئورزین تبدیل شده و به منظور جلوگیری از اکسیداسیون و تجزیه زانتوفیل‌ها، مقدار ۰/۱ تا ۰/۳ درصد اتوکسی‌کین در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده و به خوبی مخلوط گردید (Pratheesh et al., 2009). در مرحله بعد، عصاره با محلول‌های اتانولی هیدروکسید پتاسیم (دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه) صابونی شده و سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی با جاذب سیلیکاژل، رنگدانه‌های کاروتنوئیدی جداسازی و برای افزودن به جیره‌های آزمایشی آماده شدند (رضایی و همکاران، ۱۳۹۸). اولئورزین به‌دست‌آمده به دلیل ماهیت چسبناک، ابتدا با حامل بی‌اثر (سیلیس خوراکی) به نسبت ۱:۱ مخلوط شده و سپس به صورت پودر یکنواخت به جیره پایه افزوده گردید. اختلاط نهایی در میکسر افقی به مدت ۱۵ دقیقه

انجام شد تا توزیع همگن عصاره در کل جیره تضمین گردد. بازده استخراج اولتورزین از گل خشک همیشه بهار حدود ۱۲ تا ۱۵ درصد وزن خشک بوده است.

جدول ۱- اجزای جیره‌های آزمایشی و آنالیز شیمیایی جیره پایه

Table 1- Ingredients and chemical composition of the basal diet

جیره پایه Basal diet	ماده خوراکی Ingredient
58.5	ذرت Corn
26.5	کنجاله سویا Soybean meal
0.5	روغن Vegetable oil / Oil
2	سبوس گندم Wheat bran
9	کربنات کلسیم Calcium carbonate
0.5	مکمل ویتامینه و معدنی ^۱ Vitamin-mineral premix ¹
3	کنسانتره تخمگذار ^۲ Layer concentrate
100	کل Total
2650	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolizable energy (kcal/kg)
16.60	پروتئین خام (درصد) Crude protein (%)
4.05	کلسیم (درصد) Calcium (%)
0.35	فسفر قابل دسترس (درصد) Available phosphorus (%)
0.16	سدیم (درصد) Sodium (%)
0.21	کلر (درصد) Chloride (%)
0.95	لیزین (درصد) Lysine (%)
0.44	متیونین (درصد) Methionine (%)
0.64	ترئونین (درصد) Threonine (%)

^۱ پیش‌مخلوط ویتامینی و معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A (رتینیل استات) ۶۶۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D₃ (کوله‌کلسیفرول) ۲۸۰۵ واحد بین‌المللی؛ ویتامین E (DL-α-tocopheryl acetate) ۱۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین K₃ (منادیون دی‌متیل‌پیریمیدینول) ۰/۲ میلی‌گرم؛ ریوفلاوین ۴/۴ میلی‌گرم؛ اسید پانتوتنیک ۶/۶ میلی‌گرم؛ نیاسین ۲۴/۲ میلی‌گرم؛ منگنز (سولفات منگنز) ۶۰ میلی‌گرم؛ روی (سولفات روی) ۵۰ میلی‌گرم؛ آهن (سولفات آهن) ۶۰ میلی‌گرم؛ مس (سولفات مس) ۸ میلی‌گرم؛ سلنیوم (سلنیت سدیم) ۰/۳ میلی‌گرم؛ ید (یدید پتاسیم) ۰/۳۵ میلی‌گرم.

^۲ Vitamin-mineral premix provided per kg of diet: Vitamin A (retinyl acetate) 6,600 IU; Vitamin D₃ (cholecalciferol) 2,805 IU; Vitamin E (DL-α-tocopheryl acetate) 10 IU; Vitamin K₃ (menadiolone dimethylpyrimidinol) 2.0 mg; Riboflavin 4.4 mg; Pantothenic acid 6.6 mg; Niacin 24.2 mg; Manganese (MnSO₄) 60 mg; Zinc (ZnSO₄) 50 mg; Iron (FeSO₄) 60 mg; Copper (CuSO₄) 8 mg; Selenium (Na₂SeO₃) 0.3 mg; Iodine (KI) 0.35 mg.

^۳ انرژی قابل متابولیسم: ۵۹۰ کیلوکالری بر کیلوگرم، پروتئین: ۱۶/۶٪، لیزین: ۳/۳٪، چربی خام: ۲۲/۰٪، فیبر خام: ۲/۸٪، کلسیم: ۱۱/۸۹٪، فسفر قابل دسترس: ۳۷/۲٪، متیونین: ۱۶/۶٪، لیزین: ۳/۳٪، ترئونین: ۵/۰٪، نمک: ۷۵/۱۰٪.

^۴ Metabolizable energy: 590 kcal/kg, Protein: 8.5%, Crude fat: 0.42%, Crude fiber: 2.8%, Calcium: 11.89%, Available phosphorus: 7.37%, Methionine: 6.16%, Lysine: 3%, Threonine: 0.5%, and Salt: 10.75%.

اندازه‌گیری شاخص‌های عملکرد تولیدی

شاخص‌های عملکرد تولیدی شامل میزان مصرف خوراک (بر حسب گرم در روز)، وزن تخم‌مرغ (با توزین روزانه تخم‌مرغ‌های هر تکرار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم)، درصد تولید تخم‌مرغ (تعداد تخم‌مرغ تولیدی تقسیم بر تعداد پرندگان زنده در هر تکرار)، توده تخم‌مرغ (وزن متوسط تخم‌مرغ ضرب در درصد تولید) و ضریب تبدیل غذایی (میزان خوراک مصرفی تقسیم بر وزن توده تخم‌مرغ) بودند. کلیه شاخص‌های عملکردی به‌صورت هفتگی ثبت و محاسبه شدند.

اندازه‌گیری پاسخ ایمنی هومورال

برای ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال، در پایان هفته ششم آزمایش، از هر تکرار دو مرغ به‌طور تصادفی انتخاب شده و پس از علامت‌گذاری، مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۹ درصد گلبول‌های قرمز گوسفندی (SRBC) به عضله سینه هر پرنده تزریق شد. هفت روز پس از تزریق اولیه، خون‌گیری از ورید بال انجام شد و بلافاصله همان دوز قبلی SRBC مجدداً به‌صورت یادآور تزریق گردید (Van der Zijpp & Leenstra, 1980). هفت روز پس از تزریق دوم، بار دیگر خون‌گیری صورت پذیرفت. نمونه‌های خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، سرم آن‌ها جداسازی شد. تیترا آنتی‌بادی کل علیه SRBC با استفاده از روش هم‌آگلوتیناسیون اندازه‌گیری گردید (Van der Zijpp & Leenstra, 1980).

اندازه‌گیری خصوصیات کیفی تخم‌مرغ

تعداد سه عدد تخم‌مرغ به‌طور تصادفی از هر تکرار (در مجموع ۱۲ تخم‌مرغ در هر تیمار در هفته ۳۸ و ۴۲ هفته جمع‌آوری گردید. تخم‌مرغ‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل شده و کلیه اندازه‌گیری‌ها در دمای محیط و طی ۲۴ ساعت انجام شد. خصوصیات کیفی تخم‌مرغ به شرح زیر و با استفاده از روش‌های استاندارد ارزیابی گردید:

وزن تخم‌مرغ، زرده، آلبومین و پوسته: وزن کل تخم‌مرغ با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. پس از شکستن تخم‌مرغ روی سطح صاف، زرده به آرامی جدا و توزین گردید. پوسته پس از شست‌وشو با آب مقطر و خشک‌شدن در دمای محیط (به مدت ۲۴ ساعت) وزن‌کشی شد. وزن آلبومین با تفريق وزن زرده و پوسته از وزن کل تخم‌مرغ محاسبه گردید (Roberts, 2004). ضخامت پوسته (همراه با غشای داخلی) با استفاده از میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر در سه نقطه (قسمت انتهایی پهن، میانی و قسمت نوک تیز تخم‌مرغ) اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به‌عنوان ضخامت پوسته گزارش شد (Roberts, 2004).

برای اندازه‌گیری واحد هاو (Haugh, 1973) از فرمول زیر و کولیس با دقت ۰/۱ سانتیمتر استفاده گردید.

$$HU = 100 \log (AH + 7.57 - EW^{0.37})$$

HU: واحد هاو، AH: ارتفاع سفیده، EW: وزن تخم‌مرغ

ارتفاع زرده با کولیس دیجیتال و قطر آن با استفاده از شابلون مدرج یا کولیس اندازه‌گیری شد. این شاخص یکی از نشانگرهای تازگی و کیفیت داخلی تخم‌مرغ است. شاخص زرده از نسبت ارتفاع زرده به قطر آن محاسبه شد. (Silversides & Villeneuve, 1994). رنگ زرده با استفاده از فن رنگ‌سنج (Roche Yolk Color Fan) با مقیاس (۱ تا ۱۵) توسط سه ارزیاب آموزش‌دیده و در شرایط نور استاندارد (نور روز و لامپ فلورسنت) ارزیابی و میانگین نمرات آن‌ها به‌عنوان امتیاز نهایی رنگ زرده ثبت گردید (Karadas et al., 2006). مقاومت پوسته تخم‌مرغ با استفاده از دستگاه یونیورسال (Instron) مجهز به سلول بار ۵۰ کیلوگرمی اندازه‌گیری شد. تخم‌مرغ‌ها به‌صورت عمودی بین دو صفحه موازی قرار گرفته و فشار با سرعت ثابت ۲۰ میلی‌متر در دقیقه تا لحظه شکستن پوسته اعمال گردید. حداکثر نیروی ثبت‌شده در لحظه شکست به‌عنوان مقاومت پوسته (بر حسب کیلوگرم-نیرو) گزارش شد (Roberts, 2004).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS نسخه ۹/۴) و رویه (GLM مدل خطی عمومی) تجزیه و تحلیل به طور مستقل در هر هفته شدند. پیش از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن توزیع داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها بررسی گردید. مقایسه میانگین‌های تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) گزارش گردیدند.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در آن Y_{ij} مقدار مشاهده شده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار i (اثر ثابت) و ε_{ij} خطای تصادفی

یافته های پژوهش

عملکرد تولیدی

نتایج مربوط به شاخص‌های عملکرد تولیدی در هشت هفته آزمایش و کل دوره در جدول ۲ ارائه شده است. به طور کلی، افزودن عصاره گل همیشه بهار به جیره تأثیر معنی داری بر وزن تخم مرغ، درصد تولید، توده تخم مرغ و ضریب تبدیل غذایی داشت، در حالی که مصرف خوراک روزانه در اغلب هفته‌ها تحت تأثیر قرار نگرفت. در کل دوره آزمایش، بیشترین وزن تخم مرغ در تیمار ۲ (جیره حاوی ۰/۴ درصد عصاره) با مقدار ۶۲/۰۹ گرم مشاهده شد که به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای ۱ (۶۱/۹۲ گرم)، ۳ (۶۱/۸۹ گرم)، ۴ (۶۱/۳۴ گرم) و شاهد (۶۱/۲۲ گرم) بود ($P < 0.0001$). این روند افزایشی از هفته دوم به بعد به صورت پایدار ادامه یافت؛ به طوری که در هفته‌های دوم تا هشتم، تیمارهای حاوی عصاره (به ویژه سطوح ۰/۴ و ۰/۸ درصد) وزن تخم مرغ بالاتری نسبت به تیمارهای رنگدانه و شاهد داشتند.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر عملکرد مرغ‌های تخم‌گذار

تیمار ^۱ Treatment	هفته اول آزمایش (از سن ۳۴ تا ۳۵ هفتگی) Week 1 (34 to 35 wk)					هفته دوم آزمایش (از سن ۳۵ تا ۳۶ هفتگی) Week 2 (35 to 36 wk)					هفته سوم آزمایش (از سن ۳۶ تا ۳۷ هفتگی) Week 3 (36 to 37 wk)				
	وزن تخم‌مرغ (گرم) Egg weight (g)	میزان تولید (درصد) Production (%)	توده تخم-مرغ (گرم در روز) Egg Mass (g/d)	مصرف خوراک (گرم در روز) Feed Intake (g/d)	ضریب تبدیل غذایی Feed Conversion Ratio	وزن تخم-مرغ (گرم) Egg weight (g)	میزان تولید (درصد) Production (%)	توده تخم-مرغ (گرم در روز) Egg Mass (g/d)	مصرف خوراک (گرم در روز) Feed Intake (g/d)	ضریب تبدیل غذایی Feed Conversion Ratio	وزن تخم‌مرغ (گرم) Egg weight (g)	میزان تولید (درصد) Production (%)	توده تخم-مرغ (گرم در روز) Egg Mass (g/d)	مصرف خوراک (گرم در روز) Feed Intake (g/d)	ضریب تبدیل غذایی Feed Conversion Ratio
1	60.64 ^{ab}	92.86 ^{ab}	56.31 ^{ab}	107.32	1.90 ^{ab}	61.07 ^b	93.75 ^{ab}	57.25 ^a	107.87	1.88	61.52 ^{ab}	93.75	57.65 ^a	108.40	1.88
2	60.85 ^a	93.75 ^a	57.05 ^a	106.75	1.87 ^b	61.46 ^a	93.75 ^{ab}	57.62 ^a	108.07	1.87	61.67 ^a	93.75	57.81 ^a	107.42	1.85
3	60.52 ^{ab}	92.86 ^{ab}	56.20 ^{ab}	107.97	1.92 ^{ab}	61.11 ^b	94.64 ^a	57.84 ^a	107.77	1.86	61.27 ^b	94.64	57.86 ^a	109.12	1.88
4	60.46 ^{bc}	91.07 ^{bc}	55.06 ^{bc}	107.30	1.95 ^a	60.59 ^c	91.07 ^b	55.18 ^b	107.22	1.94	60.75 ^c	91.96	55.87 ^b	106.85	1.91
5	60.12 ^c	90.18 ^c	54.21 ^c	106.65	1.96 ^a	60.61 ^c	91.07 ^b	55.20 ^b	107.37	1.95	60.67 ^c	91.07	55.25 ^b	106.87	1.93
SEM	0.119	0.728	0.437	0.850	0.020	0.073	0.874	0.520	0.966	0.022	0.085	0.849	0.513	0.993	0.028
مقادیر P	0.009	0.020	0.002	0.812	0.041	<0.001	0.047	0.008	0.978	0.079	<0.001	0.097	0.012	0.538	0.503

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح خطای ۰/۰۵ درصد در آزمون دانکن می‌باشد / SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها / ^۱ جیره پایه + ۰/۲ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار ^۲ جیره پایه + ۰/۴ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار، ^۳ جیره پایه + ۰/۸ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار، ^۴ جیره پایه همراه رنگدانه، شاهد با جیره پایه (ذرت و سویا)

Means with the same letters in each column are not significantly different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test. SEM: Standard Error of the Means.

¹ Treatments: Basal diet + 0.2% marigold oil extract, Basal diet + 0.4% marigold oil extract, Basal diet + 0.8% marigold oil extract, Basal diet + commercial pigment, Control (basal diet, corn-soybean).

ادامه جدول ۲

تیمار ^۱	هفته هفتم آزمایش (از سن ۴۰ تا ۴۱ هفتگی)					هفته هشتم آزمایش (از سن ۴۱ تا ۴۲ هفتگی)					کل دوره آزمایش (از سن ۳۴ تا ۴۲ هفتگی)				
	وزن تخم مرغ (گرم)	میزان تولید (درصد)	مرغ (گرم در روز)	توده تخم - مرغ (گرم)	مصرف خوراک (گرم در روز)	وزن تخم مرغ (گرم)	میزان تولید (درصد)	مرغ (گرم در روز)	توده تخم - مرغ (گرم)	مصرف خوراک (گرم در روز)	وزن تخم مرغ (گرم)	میزان تولید (درصد)	مرغ (گرم در روز)	توده تخم - مرغ (گرم)	مصرف خوراک (گرم در روز)
	Egg weight (g)	Production (%)	Egg Mass (g/d)		Feed Intake (g/d)	Egg weight (g)	Production (%)	Egg Mass (g/d)		Feed Intake (g/d)	Egg weight (g)	Production (%)	Egg Mass (g/d)		Feed Intake (g/d)
۱	62.67 ^a	93.75 ^a	58.75 ^a	108.80 ^{ab}	1.85	63.03 ^a	91.07 ^{ab}	57.40 ^a	108.60 ^{abc}	1.89	61.92 ^b	93.52 ^a	57.91 ^a	107.47 ^b	1.85 ^b
۲	62.83 ^a	92.86 ^a	58.34 ^{ab}	108.10 ^{ab}	1.85	63.11 ^a	91.96 ^a	58.04 ^a	109.30 ^{ab}	1.88	62.09 ^a	93.53 ^a	58.07 ^a	108.02 ^b	1.86 ^b
۳	62.72 ^a	92.86 ^a	58.24 ^{ab}	110.25 ^a	1.89	63.00 ^a	92.86 ^a	58.50 ^a	110.37 ^a	1.88	61.89 ^b	93.86 ^a	58.09 ^a	109.29 ^a	1.88 ^b
۴	62.22 ^b	91.96 ^{ab}	57.22 ^b	108.97 ^{ab}	1.91	62.54 ^b	89.29 ^{bc}	55.84 ^b	107.37 ^{bc}	1.92	61.34 ^c	91.29 ^b	56.00 ^b	107.96 ^b	1.92 ^a
۵	62.05 ^b	90.18 ^b	55.96 ^c	106.55 ^b	1.90	62.32 ^b	88.39 ^c	55.09 ^b	106.62 ^c	1.93	61.22 ^c	90.62 ^b	55.47 ^b	107.03 ^b	1.93 ^a
SEM	0.062	0.618	0.358	0.668	0.019	0.032	0.652	0.396	0.674	0.18	0.036	0.316	0.187	0.326	0.010
مقادیر P	<0.001	0.024	0.0012	0.040	0.236	0.0002	0.003	0.0003	0.022	0.327	<0.0001	0.034	0.0031	0.0001	<0.0001

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در بین میانگین ها در سطح خطای ۰/۰۵ درصد در آزمون دانکن می باشد / SEM: خطای استاندارد میانگین ها / ^۱ جیره پایه + ۰/۲ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار ^۲ جیره پایه + ۰/۴ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار، ^۳ جیره پایه + ۰/۸ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار، ^۴ جیره پایه همراه رنگدانه، شاهد با جیره پایه (ذرت و سویا)

Means with the same letters in each column are not significantly different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test. SEM: Standard Error of the Means.

1 Treatments: Basal diet + 0.2% marigold oil extract, Basal diet + 0.4% marigold oil extract, Basal diet + 0.8% marigold oil extract, Basal diet + commercial pigment, Control (basal diet, corn-soybean).

این افزایش وزن احتمالاً به دلیل حضور کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی موجود در عصاره است که با بهبود سوخت و ساز لیپیدها و افزایش سنتز اجزای تخم‌مرغ، باعث افزایش وزن آن می‌شوند. (Karadas et al., 2005; Hashemi & Davoodi, 2011) در کل دوره، تیمارهای ۱ (۹۳/۵۲ درصد)، ۲ (۹۳/۵۳ درصد) و ۳ (۹۳/۸۶ درصد) به طور معنی‌داری درصد تولید بیشتری نسبت به تیمارهای ۴ (۹۱/۲۹ درصد) و شاهد (۹۰/۶۲ درصد) داشتند ($P=0/0342$) هرچند در برخی هفته‌های میانی (هفته‌های ۲ تا ۵) تفاوت‌ها معنی‌دار نبود، اما در هفته‌های پایانی (۶ تا ۸) مجدداً اختلاف معنی‌دار شد و تیمارهای عصاره برتری خود را حفظ کردند. تداوم تولید بالاتر در تیمارهای عصاره نشان‌دهنده کاهش استرس اکسیداتیو و حفظ سلامت سیستم تولیدمثلی در مرغ‌های تغذیه‌شده با این عصاره است. (Ghasemi et al., 2014; Mohammadi Gheisar & Kim, 2018).

توده تخم‌مرغ در کل دوره در تیمارهای حاوی عصاره (۵۷/۹۱ تا ۵۸/۰۹ گرم در روز) به طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای رنگدانه (۵۶/۰۰ گرم در روز) و شاهد (۵۵/۴۷ گرم در روز) بود ($P=0/0031$) این شاخص که ترکیبی از وزن و تولید است، به وضوح برتری تیمارهای ۱، ۲ و ۳ را نشان می‌دهد. روند تغییرات هفتگی نشان داد که از هفته سوم به بعد، توده تخم‌مرغ در تیمارهای عصاره همواره بالاتر از دو تیمار دیگر باقی ماند که حاکی از تأثیر مثبت و پایدار عصاره بر عملکرد کلی گله است. مصرف خوراک روزانه در کل دوره آزمایش به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0/0001$) به طوری که تیمار ۳ (حاوی ۰/۸ درصد عصاره) با میانگین ۱۰۹/۲۹ گرم در روز، بالاترین مصرف خوراک را داشت و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$) در مقابل، تیمارهای ۱، ۲، ۴ و ۵ مصرف خوراک مشابهی داشتند ($P>0/05$). در هفته ششم، تیمار ۱ کمترین مصرف خوراک (۱۰۵/۶۰ گرم) و تیمار ۳ بیشترین مصرف (۱۱۰/۰۷ گرم) را داشت ($P=0/0002$) در کل دوره، تیمار ۳ (حاوی ۰/۸ درصد عصاره) بیشترین مصرف خوراک (۱۰۹/۲۹ گرم) را نشان داد که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/0001$)، اما تیمارهای ۱ و ۲ مصرف خوراکی مشابه با شاهد داشتند. اگرچه تفاوت آماری معنی‌داری بین سطوح ۰/۴ و ۰/۸ درصد از نظر ضریب تبدیل غذایی مشاهده نشد ($P>0/05$)، اما افزایش معنی‌دار مصرف خوراک در سطح ۰/۸ درصد (۱۰۹/۲۹) در مقابل ۱۰۸/۰۲ گرم در روز؛ ($P<0/0001$) بدون بهبود متناسب در ضریب تبدیل و توده تخم‌مرغ، نشان می‌دهد که سطح ۰/۴ درصد از نظر اقتصادی به صرفه‌تر است و می‌تواند با مصرف خوراک کمتر، عملکردی مشابه ارائه دهد. در کل دوره، تیمارهای ۱ (۱/۸۵)، ۲ (۱/۸۶) و ۳ (۱/۸۸) ضریب تبدیل به مراتب بهتری نسبت به تیمار ۴ (۱/۹۲) و شاهد (۱/۹۳) داشتند ($P<0/0001$) بهبود ضریب تبدیل در تیمارهای عصاره، به ویژه در هفته ششم که تیمار ۱ با مصرف خوراک کمتر، بهترین ضریب تبدیل (۱/۷۸) را ثبت کرد، بسیار چشمگیر بود. این یافته نشان می‌دهد که عصاره گل همیشه‌بهار با افزایش قابلیت سوخت و ساز مواد مغذی، بهبود سلامت روده و افزایش کارایی متابولیک، باعث تولید تخم‌مرغ بیشتر با خوراک کمتر می‌شود (Windisch et al., 2008; Mohammadi Gheisar & Kim, 2018). دارند (Pratheesh et al., 2009).

خصوصیات کیفی تخم‌مرغ

نتایج مربوط به خصوصیات کیفی تخم‌مرغ در دو مرحله نمونه‌برداری (مرحله اول و دوم) در جدول ۳ ارائه شده است. بررسی داده‌ها نشان داد که استفاده از عصاره گل همیشه‌بهار تأثیر معنی‌داری بر رنگ زرده در هر دو مرحله، و بر واحد هاو و ضخامت پوسته در مرحله دوم داشت ($P<0/05$)، در حالی که سایر شاخص‌ها از جمله مقاومت پوسته، شاخص شکل و نسبت پوسته تحت تأثیر قرار نگرفتند ($P>0/05$) وزن زرده در مرحله اول به طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P=0/0364$)، اما در مرحله دوم این تفاوت به سطح معنی‌داری نرسید ($P=0/0551$).

رنگ زرده در هر دو مرحله به شدت تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0/0001$). در مرحله اول، تیمار ۴ (رنگدانه تجاری) با امتیاز ۱۰/۵۰ بالاترین رنگ را داشت و به طور معنی‌داری از تمام تیمارهای دیگر برتر بود. تمامی تیمارهای حاوی عصاره (۱، ۲ و

۳) با امتیازهای ۶/۰۰، ۵/۷۵ و ۵/۳۷، به‌طور معنی‌داری از تیمار رنگدانه تجاری (۱۰/۵۰) پایین‌تر بودند و با تیمار شاهد (۴/۶۲) اختلاف معنی‌داری نداشتند. در مرحله دوم نیز الگوی مشابهی مشاهده شد و تیمار ۴ با امتیاز ۱۱/۸۷ بالاترین و تیمار ۳ با امتیاز ۵/۳۷ پایین‌ترین رنگ را در بین تیمارهای عصاره داشت. افزایش رنگ زرده در تیمارهای حاوی عصاره به حضور کاروتنوئیدهای طبیعی (به‌ویژه لوتئین و زیگزانتین) در ساختار گل همیشه‌بهار نسبت داده می‌شود که از طریق جریان خون به فولیکول‌های در حال رشد تخم‌مرغ منتقل و در زرده رسوب می‌کنند (Karadas et al., 2005; Karadas et al., 2006). هرچند رنگدانه تجاری بالاترین امتیاز را داشت، اما سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد عصاره نیز توانستند رنگ زرده را به‌طور قابل‌قبولی بهبود بخشند که از منظر بازاری‌پسندی و کاهش وابستگی به افزودنی‌های شیمیایی حائز اهمیت است. واحد هاو در مرحله اول تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت ($P=0/5225$) و واحد هاو در مرحله دوم تفاوت معنی‌دار شد ($P=0/437$) در این مرحله، تیمارهای ۴ (۷۱/۱۲) و ۱ (۷۰/۸۳) بالاترین واحد هاو را داشتند و با تیمارهای ۳ (۶۹/۵۷) و شاهد (۶۳/۸۵) تفاوت معنی‌داری نشان دادند. تیمار ۲ (۶۷/۲۷) با هیچ‌یک از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. واحد هاو که شاخصی از تازگی و کیفیت پروتئین سفیده تخم‌مرغ است، در تیمارهای حاوی عصاره (به‌ویژه تیمار ۱) بهبود یافت که نشان‌دهنده نقش مثبت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره در حفظ ساختار پروتئین‌های سفیده و کاهش تخریب آن‌ها طی نگهداری است (Roberts, 2004; Silversides & Villeneuve, 1994). آلبومین جلوگیری می‌کنند و باعث افزایش واحد هاو می‌شوند (Ghasemi et al., 2014).

جدول ۳- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه بهار بر کیفیت تخم مرغ مرغ های تخم گذار

Table 3- Effect of different levels of marigold extract on egg quality characteristics of laying hens

۴۲ هفته‌گی 42 week							۳۸ هفته‌گی 38 week							تیمار ^۱ Treatment
وزن زرده (گرم) Yolk Weight (g)	ضخامت پوسته (میلی متر) Shell Thickness (mm)	نسبت پوسته Shell Ratio	واحد هاو HU: Haugh Unit	رنگ زرده Yolk Color	شاخص شکل Shape Index	مقاومت پوسته (کیلوگرم) Shell Strength (kg)	وزن زرده (گرم) Yolk Weight (g)	ضخامت پوسته (میلی متر) Shell Thickness (mm)	نسبت پوسته Shell Ratio	واحد هاو HU: Haugh Unit	رنگ زرده Yolk Color	شاخص شکل Shape Index	مقاومت پوسته (کیلوگرم) Shell Strength (kg)	
17.50 ^{ab}	0.392 ^a	10.016	70.83 ^a	6.50 ^b	74.59	3.71	17.58 ^a	0.40	10.10	72.10	6.00 ^b	75.53	3.43	۱
16.28 ^b	0.398 ^a	10.06	67.27 ^b	6.87 ^b	75.87	4.27	17.15 ^{ab}	0.42	9.87	74.81	5.75 ^b	75.32	4.11	۲
16.76 ^{ab}	0.390 ^a	9.91	69.57 ^b	5.37 ^c	74.64	4.57	17.14 ^{ab}	0.41	10.02	77.48	5.37 ^b	74.52	4.32	۳
16.62 ^b	0.350 ^b	9.82	71.12 ^a	11.87 ^a	74.26	4.42	16.79 ^b	0.40	9.67	77.68	10.50 ^a	75.73	4.08	۴
17.89 ^a	0.345 ^b	9.88	63.85 ^b	6.25 ^{bc}	75.59	4.58	17.07 ^b	0.43	9.97	73.60	4.62 ^b	75.04	4.64	۵
0.38	0.011	0.169	1.69	0.324	0.77	0.505	0.15	0.009	0.23	2.66	0.54	0.88	0.39	SEM
0.048	0.011	0.80	0.043	<0.001	0.53	0.29	0.036	0.25	0.74	0.52	<0.001	0.8	0.33	مقادیر P

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در بین میانگین ها در سطح خطای ۰/۰۵ درصد در آزمون دانکن می باشد / SEM: خطای استاندارد میانگین ها / ^۱ جیره پایه + ۰/۲ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار ^۲ جیره پایه + ۰/۴ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار ، ^۳ جیره پایه + ۰/۸ درصد عصاره روغنی گل همیشه بهار ، ^۴ جیره پایه همراه رنگدانه، شاهد با جیره پایه (ذرت و سویا)

Means with the same letters in each column are not significantly different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test. SEM: Standard Error of the Means.

\ Treatments: Basal diet + 0.2% marigold oil extract, Basal diet + 0.4% marigold oil extract, Basal diet + 0.8% marigold oil extract, Basal diet + commercial pigment, Control (basal diet, corn-soybean).

ضخامت پوسته در مرحله اول تفاوت معنی‌داری نداشت ($P=0/2589$)، اما در مرحله دوم تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P=0/111$) در مرحله دوم، تیمارهای ۱ ($0/392$ میلی‌متر)، ۲ ($0/398$ میلی‌متر) و ۳ ($0/390$ میلی‌متر) به‌طور معنی‌داری ضخامت پوسته بیشتری نسبت به تیمارهای ۴ ($0/350$ میلی‌متر) و شاهد ($0/345$ میلی‌متر) داشتند. افزایش ضخامت پوسته در تیمارهای عصاره احتمالاً به‌دلیل بهبود جذب کلسیم و فسفر در نتیجه افزایش سلامت روده و کاهش استرس اکسیداتیو است (Roberts, 2004). همچنین، کاروتنوئیدها با تقویت سوخت و ساز ویتامین D و افزایش بیان پروتئین‌های حمل‌کننده کلسیم در روده، می‌توانند به افزایش ضخامت پوسته کمک کنند. (Windisch et al., 2008) وزن زرده در مرحله اول به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P=0/0364$) بیشترین وزن زرده در تیمار ۱ (جیره حاوی $0/2$ درصد عصاره) با مقدار $17/58$ گرم مشاهده شد که با تیمارهای ۴ (رنگدانه تجاری؛ $16/79$ گرم) و شاهد ($17/07$ گرم) تفاوت معنی‌داری داشت. در مرحله دوم، اگرچه تفاوت بین تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما تیمار شاهد ($17/89$ گرم) به‌طور معنی‌داری وزن زرده بیشتری نسبت به تیمارهای ۲ ($16/28$ گرم) و ۴ ($16/62$ گرم) داشت. سایر تیمارها (۱ و ۳) در جایگاه میانی قرار گرفتند و با هیچ‌یک از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. افزایش وزن زرده در تیمار ۱ در مرحله اول را می‌توان به بهبود جذب لیپیدها و کاروتنوئیدهای محلول در چربی نسبت داد که منجر به رسوب بیشتر مواد در زرده می‌شود (Karadas et al., 2006). با این حال، عدم تکرار این الگو در مرحله دوم ممکن است به‌دلیل تغییرات فیزیولوژیک مرغ‌ها در طول دوره تولید باشد. مقاومت پوسته ($P=0/3391$ و $P=0/2972$)، شاخص شکل ($P=0/8847$ و $P=0/5301$) و نسبت پوسته ($P=0/7436$ و $P=0/8098$) در هر دو مرحله تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از عصاره گل همیشه‌بهار، تأثیر منفی بر ساختار فیزیکی و استحکام پوسته ندارد و سطح $0/2$ درصد روغنی گل همیشه‌بهار به‌عنوان بهترین سطح از نظر بهبود کیفیت تخم‌مرغ معرفی می‌شود.

پاسخ ایمنی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه گلبول‌های قرمز گوسفندی (SRBC) در جدول ۴ ارائه شده است. بررسی داده‌ها نشان داد که افزودن عصاره گل همیشه‌بهار به جیره غذایی، تأثیر معنی‌داری بر پاسخ ایمنی هومورال مرغ‌های تخم‌گذار داشت ($P=0/0126$) بیشترین تیترا آنتی‌بادی در تیمار ۳ (جیره حاوی $0/8$ درصد عصاره) با مقدار $5/50$ مشاهده شد که با تیمارهای ۲ ($5/25$) و ۱ ($5/00$) تفاوت معنی‌داری نداشت، اما به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۴ ($4/25$) و شاهد ($4/50$) بود. کمترین تیترا آنتی‌بادی مربوط به تیمار رنگدانه تجاری (تیمار ۴) بود که نشان‌دهنده عدم تأثیر این ترکیب بر تحریک سیستم ایمنی است و عملکردی مشابه با شاهد داشت. افزایش تیترا آنتی‌بادی در تیمارهای حاوی عصاره را می‌توان به حضور ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدها و ساپونین‌های موجود در گل همیشه‌بهار نسبت داد. این ترکیبات با تحریک سلول‌های B و T، بهبود عملکرد سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن و افزایش تولید سیتوکین‌های التهابی، پاسخ ایمنی هومورال را تقویت می‌کنند. (Ghasemi et al., 2014; Hashemi & Davoodi, 2011) همچنین، کاروتنوئیدهای موجود در عصاره از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، عملکرد لنفوسیت‌ها را بهبود بخشیده و باعث افزایش تولید آنتی‌بادی می‌شوند (Della Loggia et al., 1994; Parente et al., 2012). مشاهدات این پژوهش با یافته‌های قبلی مبنی بر خواص ایمونومدولاتوری گیاهان دارویی در طیور هم‌خوانی دارد. (Mohammadi Gheisar & Kim, 2018) یافته مهم دیگر این بود که رنگدانه تجاری نه تنها تأثیری بر افزایش پاسخ ایمنی نداشت، بلکه کمترین تیترا را نیز به خود اختصاص داد. با توجه به یافته‌های این پژوهش، اگرچه رنگدانه تجاری در شدت رنگ‌دهی زرده برتری داشت، اما تیمارهای حاوی عصاره گل همیشه‌بهار (به‌ویژه سطح $0/2$ درصد) از نظر شاخص‌های کلیدی عملکرد تولیدی (وزن و توده تخم‌مرغ، ضریب تبدیل غذایی)، کیفیت فیزیکی تخم‌مرغ (ضخامت پوسته) و پاسخ ایمنی هومورال عملکرد بهتری نشان دادند. این مزایا، همراه با هزینه کمتر افزودنی، نبود باقیمانده شیمیایی و قابلیت چندمنظوره بودن عصاره، نشان می‌دهد که استفاده از این افزودنی

طبیعی می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مقرون‌به‌صرفه و ایمن برای رنگدانه‌های تجاری در صنعت پرورش مرغ تخم‌گذار مد نظر قرار گیرد. عصاره گل همیشه‌بهار (به‌ویژه سطح ۰/۲ درصد) علاوه بر بهبود معنی‌دار رنگ زرده در مرحله دوم نمونه‌برداری (۰/۰۵ < P)، پاسخ ایمنی هومورال را نیز به‌طور معنی‌داری تقویت کرد و تیتراژ آنتی‌بادی علیه SRBC را در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد (P=۰/۰۱۲۶). این ویژگی نشان‌دهنده پتانسیل این. این ویژگی به‌خصوص در دوره‌های تنش و واکسیناسیون یا در سیستم‌های پرورش فاقد آنتی‌بیوتیک، از ارزش کاربردی بالایی برخوردار است.

جدول ۴- اثر سطوح مختلف عصاره گل همیشه‌بهار بر تیتراژ آنتی‌بادی ایمنی هومورال (log2)

Table 4- Effect of different levels of marigold extract on humoral immune (log2)

مقادیر P	SEM	۵	۴	۳	۲	۱	تیمار ^۱ Treatment
۰/۰۱۲۶	۰/۲۴۱۵	4.50 ^{bc}	4.25 ^c	5.50 ^a	5.25 ^{ab}	5.00 ^{abc}	SRBC

حروف مشابه در ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح خطای ۰/۰۵ درصد در آزمون دانکن می‌باشد/ SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها/ ۱ جیره پایه ۰/۲+ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۲ جیره پایه ۰/۴+ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۳ جیره پایه ۰/۸+ درصد عصاره روغنی گل همیشه‌بهار، ۴ جیره پایه همراه رنگدانه، شاهد با جیره پایه (ذرت و سویا)

Means with the same letters in row are not significantly different at the 0.05 level using Duncan's multiple range test.

SEM: Standard Error of the Means.

¹ Treatments: Basal diet + 0.2% marigold oil extract, Basal diet + 0.4% marigold oil extract, Basal diet + 0.8% marigold oil extract, Basal diet + commercial pigment, Control (basal diet, corn-soybean).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن عصاره روغنی گل همیشه‌بهار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار، به‌ویژه در سطوح ۰/۴ و ۰/۸ درصد، تأثیر مثبت و معنی‌داری بر عملکرد تولیدی، کیفیت تخم‌مرغ و پاسخ ایمنی هومورال داشت.

عملکرد تولیدی

در پژوهش حاضر، استفاده از عصاره گل همیشه‌بهار در هر سه سطح (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ درصد) باعث افزایش معنی‌دار وزن تخم‌مرغ، توده تخم‌مرغ و بهبود ضریب تبدیل غذایی نسبت به تیمار شاهد و رنگدانه تجاری گردید (۰/۰۵ < P)، هرچند بالاترین وزن تخم‌مرغ در سطح ۰/۴ درصد (۶۲/۰۹ گرم) مشاهده شد، اما بین سطوح ۰/۲ و ۰/۸ درصد از نظر این شاخص تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. افزایش مصرف خوراک در سطح ۰/۸ درصد، به‌دلیل کاهش قابلیت هضم یا تغییر در سوخت و ساز ناشی از سطوح بالای ترکیبات زیست‌فعال عصاره، به‌طور کامل به تولید تخم‌مرغ تبدیل نشده است. از این رو، سطح ۰/۴ درصد از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر است، زیرا با مصرف خوراک کمتر، عملکردی مشابه سطح ۰/۸ درصد ارائه می‌دهد. این یافته‌ها با نتایج مطالعه‌ی Abdel-Wahab و همکاران (۲۰۲۳) بر روی بلدرچین‌های تخم‌گذار هم‌خوانی دارد؛ آن‌ها گزارش کردند که افزودن ۲۰۰ و ۲۵۰ ppm عصاره گل همیشه‌بهار به جیره، تعداد تخم‌مرغ، درصد تولید، وزن تخم‌مرغ و توده تخم‌مرغ را به‌طور معنی‌داری افزایش داده و بهترین ضریب تبدیل غذایی را بدون تأثیر معنی‌دار بر مصرف خوراک به‌همراه داشته است. همچنین، یافته‌های یک مطالعه جدید بر روی مرغ‌های تخم‌گذار در دوره پایانی تولید (Yang et al., 2025) نشان داد که افزودن ۴۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گل همیشه‌بهار به جیره به‌طور معنی‌داری درصد تولید و توده تخم‌مرغ را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، Zarghi و همکاران (۲۰۲۶) نیز گزارش کردند که استفاده از عصاره گیاهان دارویی (از جمله *Ziziphora clinopodioides*) در جیره بلدرچین‌های تخم‌گذار باعث بهبود معنی‌دار تولید روزانه و توده تخم‌مرغ گردیده است.

بهبود شاخص‌های عملکردی در پژوهش حاضر را می‌توان به حضور ترکیبات زیست‌فعال نظیر کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها در عصاره گل همیشه‌بهار نسبت داد. این ترکیبات از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بهبود سلامت

مخاط روده و کاهش استرس اکسیداتیو، جذب مواد مغذی را افزایش داده و کارایی خوراک را بهبود می‌بخشد (Hashemi, 2018; Davoodi, 2011; Mohammadi Gheisar & Kim, 2018). یافته‌های Abdel-Wahab و همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان داد که تیمارهای حاوی عصاره گل همیشه‌بهار باعث بهبود معنی‌دار آنزیم‌های گوارشی و درصد قابلیت هضم مواد مغذی شدند (Abdel-Wahab et al., 2023). مؤید این مکانیسم است. هرچند برخی مطالعات تأثیر معنی‌داری بر عملکرد تولیدی گزارش نکرده‌اند (Gao et al., 2014; Wezyk et al., 1992)، این تفاوت را می‌توان به تفاوت در سطح مصرف، نوع عصاره (پودر در مقابل عصاره روغنی)، سن پرندگان و شرایط آزمایش نسبت داد.

کیفیت تخم‌مرغ

در بخش کیفیت تخم‌مرغ، تأثیر عصاره بر رنگ زرده به‌صورت وابسته به زمان و سطح مصرف بود. در مرحله اول، هیچ‌یک از تیمارهای عصاره نتوانستند رنگ زرده را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دهند ($P > 0.05$) با این حال، در مرحله دوم، سطوح ۰/۲ و ۰/۴ درصد عصاره به‌طور معنی‌داری رنگ زرده را نسبت به شاهد افزایش دادند ($P < 0.05$) این یافته نشان می‌دهد که اثرات مثبت عصاره بر رنگ زرده ممکن است نیاز به زمان داشته باشد و با افزایش دوره مصرف، تجمع کاروتنوئیدها در زرده افزایش می‌یابد (Karadas et al., 2005; Karadas et al., 2006) با این وجود، سطح ۰/۸ درصد عصاره در هر دو مرحله تأثیر مثبتی بر رنگ زرده نداشت و حتی در مرحله دوم از شاهد نیز پایین‌تر بود که نشان‌دهنده وجود الگوی دوز-پاسخ معکوس است. این الگوی معکوس را می‌توان به عواملی مانند تداخل با جذب چربی، اشباع ظرفیت انتقال کاروتنوئیدها، و آنتاگونیسم ترکیبات زیست‌فعال در سطوح بالا نسبت داد (Windisch et al., 2008; Pratheesh et al., 2009; Della Loggia et al., 1994). این نتیجه با مطالعات متعدد دیگر هم‌خوانی دارد. کلجاک و همکاران (Kljak et al., 2021) گزارش کردند که افزودن ۳ درصد گل همیشه‌بهار به جیره، امتیاز رنگ زرده را به ۱۱/۴۷ رساند که به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود (Kljak et al., 2021). همچنین، مطالعه‌ای دیگر نشان داد که مکمل‌سازی جیره با عصاره گل همیشه‌بهار باعث افزایش معنی‌دار زردی، قرمزی و نسبت قرمزی به زردی زرده گردید ($P < 0.001$). افزایش رنگ زرده در تیمارهای حاوی عصاره به حضور کاروتنوئیدهای طبیعی (به‌ویژه لوتئین و زیگزانتین) در ساختار گل همیشه‌بهار نسبت داده می‌شود. از آنجا که طیور قادر به سنتز کاروتنوئیدها نیستند، این ترکیبات باید از طریق جیره تأمین شده و از طریق جریان خون به فولیکول‌های در حال رشد تخم‌مرغ منتقل شده و در زرده رسوب می‌کنند (Karadas et al., 2005; Kwiecien et al., 2012). کلجاک و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان دادند که محتوای کل کاروتنوئید زرده در تیمار ۳ درصد گل همیشه‌بهار (۶۶/۹۵ میکروگرم بر گرم) به‌طور قابل توجهی بیشتر از تیمار شاهد بود (Kljak et al., 2021). اگرچه رنگدانه تجاری از نظر شدت رنگ برتری داشت، اما تیمارهای عصاره با ارائه‌ی رنگ زرده‌ای مطلوب و پذیرفتنی برای مصرف‌کننده، می‌توانند جایگزین طبیعی مناسبی برای رنگدانه‌های شیمیایی محسوب شوند. بالاترین سطح عصاره (۰/۸ درصد) کمترین امتیاز رنگ زرده را در میان تیمارهای عصاره نشان داد، در حالی که سطح ۰/۲ درصد بالاترین امتیاز را به خود اختصاص داد. با توجه به سطح پایین افزودنی (۰/۸ درصد)، رقیق‌سازی جیره نمی‌تواند توجیه‌گر این پدیده باشد. در عوض، این الگوی معکوس را می‌توان به عوامل فیزیولوژیک زیر نسبت داد: (۱) تداخل سطوح بالای ترکیبات زیست‌فعال عصاره با جذب چربی و کاروتنوئیدها از طریق اختلال در امولسیون و جذب لیپیدها، (۲) اشباع ظرفیت انتقال کاروتنوئیدها از خون به فولیکول‌های تخم‌مرغ در سطوح بالای مصرف، (۳) احتمال آنتاگونیسم بین ترکیبات مختلف عصاره (کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها) در سطوح بالا که منجر به کاهش جذب مؤثر کاروتنوئیدها می‌شود، و (۴) تغییرات بالقوه در سوخت و ساز عمومی و قابلیت هضم جیره. این یافته نشان می‌دهد که سطوح بالای عصاره لزوماً به افزایش رنگ زرده منجر نمی‌شود و سطح ۰/۲ درصد به‌عنوان سطح بهینه برای بهبود رنگ زرده در شرایط این پژوهش قابل توصیه است.

در مرحله دوم نمونه‌برداری، ضخامت پوسته در تمام تیمارهای حاوی عصاره (۰/۳۹۰ تا ۰/۳۹۸ میلی‌متر) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (۰/۳۴۵ میلی‌متر) و رنگدانه تجاری (۰/۳۵۰ میلی‌متر) بود ($P=0/0111$) در مورد واحد هاو نیز اگرچه اثر کلی تیمار معنی‌دار بود ($P=0/0437$)، اما فقط تیمار ۰/۲ درصد عصاره (۷۰/۸۳) و تیمار رنگدانه تجاری (۷۱/۱۲) به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد (۶۳/۸۵) قرار گرفتند؛ تیمار ۰/۴ درصد (۶۷/۲۷) حالت میانی داشت و تیمار ۰/۸ درصد (۶۹/۵۷) تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. این یافته با گزارش‌های دیگر در مورد تأثیر مثبت گیاهان دارویی بر کیفیت داخلی و خارجی تخم‌مرغ هم‌خوانی دارد. در راستای یافته‌های پژوهش حاضر، مطالعات متعدد دیگری نیز اثرات مثبت گیاهان دارویی بر کیفیت تخم‌مرغ را تأیید کرده‌اند. به‌عنوان مثال، *Kljak* و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که افزودن ۳ درصد گل همیشه‌بهار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار، علاوه بر بهبود رنگ زرده، باعث افزایش معنی‌دار ضخامت پوسته و کاهش تخلخل آن گردید. همچنین، *Meng* و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای بر روی بلدرچین‌های تخم‌گذار گزارش کردند که استفاده از پودر ریشه کاسنی (حاوی اینولین) می‌تواند با افزایش قابلیت سوخت و ساز پروتئین و جذب کلسیم، به بهبود کیفیت پوسته و وزن تخم‌مرغ کمک کند. بهبود واحد هاو در تیمارهای عصاره نشان‌دهنده نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی در حفظ ساختار پروتئین‌های سفیده و کاهش تخریب آن‌ها طی نگهداری است (*Roberts, 2004*). همچنین، افزایش ضخامت پوسته را می‌توان به بهبود جذب کلسیم و فسفر در نتیجه‌ی افزایش سلامت روده و کاهش استرس اکسیداتیو نسبت داد (*Windisch et al., 2008*). در مطالعه‌ی *Abdel-Wahab* و همکاران (۲۰۲۳) نیز بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تیمارهای حاوی عصاره گزارش شده است (*Abdel-Wahab et al., 2023*) که می‌تواند توجیه‌گر این بهبودها باشد. افزایش وزن زرده در تیمار ۱ در مرحله اول را می‌توان به بهبود جذب لیپیدها و کاروتنوئیدهای محلول در چربی نسبت داد که منجر به رسوب بیشتر مواد در زرده می‌شود (*Karadas et al., 2006*). با این حال، عدم تکرار این الگو در مرحله دوم (با وجود نزدیکی به سطح معنی‌داری؛ $P=0/051$) ممکن است به دلیل تغییرات فیزیولوژیک مرغ‌ها در طول دوره تولید، کاهش تدریجی کارایی جذب کاروتنوئیدها با افزایش سن پرندگان، یا کاهش حساسیت فولیکول‌های تخم‌مرغ به کاروتنوئیدهای جیره‌ای باشد. این یافته نشان می‌دهد که تأثیر عصاره بر وزن زرده ممکن است وابسته به زمان باشد و در دوره‌های اولیه تولید (مرحله اول) بارزتر است.

پاسخ ایمنی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمارهای حاوی عصاره گل همیشه‌بهار، به‌ویژه سطح ۰/۸ درصد، به‌طور معنی‌داری تیتراز آنتی‌بادی علیه *SRBC* را افزایش دادند. این یافته با مطالعات پیشین در مورد خواص ایمونومدولاتوری گل همیشه‌بهار هم‌خوانی دارد. *Abdel-Wahab* و همکاران (۲۰۲۳) بر روی بلدرچین‌های تخم‌گذار نشان دادند که پاسخ ایمنی در تیمارهای حاوی عصاره گل همیشه‌بهار به‌طور معنی‌داری بهبود یافته است ($P<0/001$) (*Abdel-Wahab et al., 2023*). این یافته‌ها با نتایج مطالعات جدید در زمینه خواص ایمونومدولاتوری گیاهان دارویی هم‌خوانی دارد. به‌عنوان مثال، *Ghasemi* و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که افزودنی‌های گیاهی (فیتوبیوتیک‌ها) می‌توانند با تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی، پاسخ آنتی‌بادی علیه *SRBC* را در جوجه‌های گوشتی افزایش دهند. همچنین، مطالعه مروری *Mohammadi Gheisar* و *Kim (2018)* بر نقش فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌های موجود در گیاهان دارویی در تقویت پاسخ‌های ایمنی و کاهش اثرات منفی استرس در طیور تأکید دارد. *Zarghi* و همکاران (۲۰۲۶) نیز اخیراً گزارش کرده‌اند که مکمل‌سازی جیره بلدرچین‌های تخم‌گذار با عصاره گیاهان دارویی (از جمله *Ziziphora clinopodioides*) به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تیتراز آنتی‌بادی علیه *SRBC* گردیده است. معینی و همکاران نیز تأثیر مثبت پودر گل همیشه‌بهار را بر تعداد ائوزینوفیل‌ها (به‌عنوان شاخصی از پاسخ ایمنی) گزارش کردند (*Moeini et al., 2013*). افزایش تیتراز آنتی‌بادی در تیمارهای حاوی عصاره را می‌توان به حضور ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها نسبت داد. این ترکیبات با تحریک سلول‌های *B* و *T*، بهبود عملکرد

سلول‌های ارائه‌دهنده‌ی آنتی‌ژن و افزایش تولید سیتوکین‌ها، پاسخ ایمنی هومورال را تقویت می‌کند (Ghasemi et al., 2014; Hashemi & Davoodi, 2011). همچنین، کاروتنوئیدها از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، عملکرد لنفوسیت‌ها را بهبود بخشیده و باعث افزایش تولید آنتی‌بادی می‌شوند (Della Loggia et al., 1994; Parente et al., 2012). مهم دیگر این بود که رنگدانه تجاری نه تنها تأثیری بر افزایش پاسخ ایمنی نداشت، بلکه کمترین تیر را نیز به خود اختصاص داد. این موضوع برتری افزودنی‌های طبیعی چندمنظوره را نسبت به افزودنی‌های صرفاً شیمیایی آشکار می‌سازد؛ به‌طوری‌که عصاره گل همیشه‌بهار علاوه بر بهبود رنگ زرده، می‌تواند سیستم ایمنی پرندگان را نیز تقویت کند.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزودن عصاره روغنی گل همیشه‌بهار به جیره مرغ‌های تخم‌گذار، به‌ویژه در سطح ۰/۲ درصد (معادل ۲ گرم بر کیلوگرم)، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر و طبیعی برای بهبود عملکرد تولیدی (افزایش وزن و توده تخم‌مرغ، بهبود ضریب تبدیل)، ارتقاء کیفیت تخم‌مرغ (افزایش رنگ زرده، واحد هاو و ضخامت پوسته) و تقویت پاسخ ایمنی هومورال مورد استفاده قرار گیرد. هرچند رنگدانه تجاری در شدت رنگ‌دهی برتری داشت، اما تیمارهای عصاره از نظر سایر شاخص‌های کیفی و به‌ویژه پاسخ ایمنی، عملکرد بهتری نشان دادند که برتری افزودنی‌های طبیعی چندمنظوره را آشکار می‌سازد، الگوی دوز-پاسخ غیرخطی و معکوس رنگ زرده نشان داد که افزایش سطح عصاره از ۰/۲ به ۰/۸ درصد لزوماً به بهبود بیشتر رنگ زرده منجر نمی‌شود و سطح ۰/۲ درصد به‌عنوان سطح بهینه برای دستیابی به تعادل بین عملکرد، کیفیت و هزینه قابل توصیه است.

منابع

- Abdel-Wahab, A. A., Aly, M. M. M., Bahnas, M. S., & Abdelrasoul, R. A. S. (2023). Effect of dietary supplementation of pot marigold flower powder and extract (*Calendula officinalis*) on nutrient digestibility, performance, serum biochemistry, antioxidant parameters, immune response and some gut bacterial count of laying Japanese quail. *Egyptian Poultry Science Journal*, 43(II), 277-295.
- Della Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., & Isaac, O. (1994). The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica*, 60(6), 516-520. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959555>.
- Gao, Y., Chen, H., Huang, R., Wang, C., Yang, Q., & Wang, X. (2014). Effect of *Calendula officinalis* L. extracts on performance and egg qualities of laying hens. *Journal of Hebei Agricultural University*, 37(4), 89-93.
- Ghasemi, H. A., Kasani, N., & Taherpour, K. (2014). Effects of phytogetic feed additives on performance, immune response, and antioxidant status of broiler chicks. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(3), 509-516. <https://doi.org/10.1111/jpn.12098>
- Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2011). Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications*, 35(3), 169-180. <https://doi.org/10.1007/s11259-010-9458-2>
- Hassan, R. A., El-Azeem, N. A., & El-Kholy, M. S. (2016). Effect of marigold extract on performance and egg quality of laying hens. *Egyptian Poultry Science Journal*, 36(1), 165-180.
- Haugh, R. R. (1937). The Haugh unit for measuring egg quality. *US Egg and Poultry Magazine*, 43, 552-555.
- Karadas, F., Grammenidis, E., Surai, P. F., Acamovic, T., & Sparks, N. H. C. (2006). Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *British Poultry Science*, 47(5), 561-566. <https://doi.org/10.1080/00071660600962976>.
- Karadas, F., Surai, P. F., & Sparks, N. H. C. (2005). Influence of carotenoids on yolk coloration. *Poultry Science*, 84(7), 1152-1159. <https://doi.org/10.1093/ps/84.7.1152>.
- Kljak, K., Carović-Stanko, K., Kos, I., Janječić, Z., Kiš, G., Duvnjak, M., Safner, T., & Bedeković, D. (2021). Plant carotenoids as pigment sources in laying hen diets: Effect on yolk color, carotenoid content, oxidative stability and sensory properties of eggs. *Foods*, 10(4), 721. <https://doi.org/10.3390/foods10040721>
- Kwiecien, M., Winiarska-Mieczan, A., & Krusinski, R. (2012). The effect of dried marigold flowers on laying hen performance and yolk pigmentation. *Journal of Elementology*, 17(3), 395-403. <https://doi.org/10.5601/jelem.2012.17.3.01>

- Maia, K. M., et al. (2022). Performance and egg quality of light laying hens fed with canthaxanthin and marigold flower extract. *South African Journal of Animal Science*, 52(4), 433-443. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v52i4.03>
- Matache, C.-C., Panaite, T. D., Cornescu, G. M., & Drăgotoiu, D. (2024). Influence of Natural Pigments on Egg Quality and Yolk Colour Intensity - A Review. *Agroprint Timisoara*, 57 (1), 184.
- Meng, X., Huang, X., Liu, Y., Lv, H., Ding, X., Jian, T., Niu, G., Tong, B., Ren, B., & Chen, J. (2023). Effect of feeding protein and calcium microparticles with *Cichorium intybus* root flour on protein digestibility and protein mass of quail eggs. *Journal of Applied Poultry Research*, 32(1), 100328.
- Moeini, M. M., Ghazi, S. H., Sadeghi, S., & Malekizadeh, M. (2013). The effect of red pepper (*Capsicum annum*) and marigold flower (*Tagetes erecta*) powder on egg production, egg yolk color and some blood metabolites of laying hens. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(2), 301-305.
- Mohammadi Gheisar, M., & Kim, I. H. (2018). Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1), 92-99. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1350120>
- National Research Council. (1994). *Nutrient Requirements of Poultry* (9th rev. ed.). National Academy Press.
- Parente, L. M., Lino, R. S., & Tresvenzol, L. M. F. (2012). Anti-inflammatory effect of *Calendula officinalis* extract. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 5(4), 21-26.
- Pratheesh, V. B., Benny, N., & Sujatha, C. H. (2009). Isolation and purification of lutein from marigold flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6872-6877.
- Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2009). Wound healing activity of *Calendula officinalis* extract. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 20(1), 73-79. <https://doi.org/10.1515/JBCPP.2009.20.1.73>
- Rezaei, M., Karimi, A., & Mohammadi, H. (2019). Investigation of extraction and separation methods of natural pigments from marigold flower. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 16(9), 125-137. (in Persian)
- Roberts, J. R. (2004). Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *Journal of Poultry Science*, 41(3), 161-177. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.161>
- Silversides, F. G., & Villeneuve, P. (1994). Is the Haugh unit a reliable measure of egg interior quality? *Poultry Science*, 73(10), 1606-1610. <https://doi.org/10.3382/ps.0731606>
- Van der Zijpp, A. J., & Leenstra, F. R. (1980). Effect of age, breed, and immune stimulation on the antibody response in chickens. *Poultry Science*, 59(8), 1714-1721.
- Wezyk, S., Koloszko, Z., & Mlodkowski, M. (1992). Effect of dehydrated marigold flowers and lucerne in diet for layer hens on the yolk colour. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 19(2), 79-90.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(E-suppl.), E140-E148. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459>
- Yang, Q., Zhang, K., Wang, J., Bai, S., Zeng, Q., Peng, H., Mu, Y., Xuan, Y., Li, S., & Ding, X. (2025). The addition of marigold extract to the diet improved the performance of laying hens in the late laying period by increasing their
- Zarghi, H., Toghdory, A., & Ghoorchi, T. (2026). The effect of adding mountain mint (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) to diet of laying Japanese quails on productive performance, egg quality traits, blood metabolites and immune response. *Veterinary Medicine & Science*, 12(3), e70015.