تأثیر محلولهای رقیق کننده بر روی ماندگاری اسپرماتوزوئیدها، قابلیت نطفه‌داری و جوجه درآوری مرغهای مادر گوشتی

دکتر شعبان رحیمی[1] دکتر رضا محمدی[1] دکتر رضا شهیدی[2] مهندس محمد رضا ملا صالحی[3] دکتر ناصر امام جمعه کاشان[4]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ٥٦، شماره ٣، ٢٨-٢٣، (١٣٨٠)

مطالعات ژنتیکی و اصلاح نژادی انجام یافته در سالهای اخیر روی طیور گوشتی در انتخاب صفاتی نظیر بزرگی جثه و سرعت رشد زیاد، وجود همبستگی منفی بین صفات تولید مثلی و افزایش تولید را نشان می‌دهد. به طوری‌که درصد باروری در مرغهای گوشتی در دهه ۹۰ به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. اختلالات فیزیولوژیکی نظیر کاهش میل جنسی، کاهش دفعات جفتگیری و کاهش میزان تولید اسپرم در این پرندگان بروز نموده است. به دلیل اختلاف زیاد در وزن، اندازه و شکل بدن بین دو جنس نر و ماده در طیور گوشتی بویژه بوقلمونها، انجام جفتگیری طبیعی در آنها با مشکلات زیادی همراه بوده و با کاهش باروری و جوجه درآوری توام می‌باشد. لذا استفاده از تلقیح مصنوعی به جای آمیزش طبیعی در طیور سنگین وزن امری اجتناب ناپذیر است. کاربرد تلقیح مصنوعی دارای مزایای زیادی مانند افزایش بازده تولید مثلی و کاهش هزینه‌های تولید می‌باشد. نوع محلول رقیق کننده اسپرم و مدت نگهداری مایع منی بر کیفیت اسپرم تاثیر دارد. در مطالعه اخیر تاثیر سه نوع محلول رقیق کننده اسپرم طیور شامل: Sexton (نوع آمریکایی)، IMV (فرانسوی) و TMU (رقیق کننده ایرانی تولیدی در طرح اخیر) بر روی تحرک و ماندگاری اسپرماتوزوئیدهای خروس آرین مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفتند. اسپرم رقیق شده با محلول Sexton دارای کیفیت بهتری از نظر صفات مزبور در مقایسه با رقیق کننده‌های فرانسوی و ایرانی بود ($P < ۰/۰۵$). رقیق کننده‌های IMV و TMU اختلاف معنی داری نداشتند ($P < ۰/۰۵$). روش نگهداری اسپرم نیز بر تحرک و زنده ماندن اسپرماتوزوئیدها موثر بود ($P < ۰/۰۵$). بین میانگینهای حاصل از تاثیر دو روش مایع و انجماد بر صفات مزبور اختلاف معنی داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). طول مدت نگهداری اسپرم نیز بر تحرک و ماندگاری اسپرماتوزوئیدها موثر بود ($P < ۰/۰۱$). انجام تلقیح بلافاصله بعد از رقیق کردن اسپرم تازه نتایج بهتری نشان می‌داد. نوع محلول رقیق کننده و روش نگهداری مایع منی بر قابلیت نطفه‌داری و میزان جوجه درآوری در مرغهای مادر گوشتی آرین موثر بود ($P < ۰/۰۱$).

واژه‌های کلیدی: محلولهای رقیق کننده، تلقیح مصنوعی، اسپرماتوزوئید، قابلیت‌نطفه‌داری، مرغ مادر گوشتی.

سرعت زیاد رشد و نمو در جوجه‌های گوشتی که از مزایای آنها به شمار می‌رود، برای پرورش دهنده‌های مرغ مادر گوشتی، مشکلاتی را ایجاد نموده است. افزایش سرعت رشد و توانایی تولید مثلی دارای رابطه مستقیمی با یکدیگر نیستند. بنابراین واضح است که نمی‌توان گله‌های مرغ مادر را آزاد گذاشت تا به حداکثر ظرفیت ژنتیکی رشد خود برسند (۴).

طبق تحقیقات به عمل آمده ثابت شده که طی سالهای ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ میلادی در اثر تاکیدی که برای انتخاب صفاتی نظیر بزرگی جثه و رشد سریع روی گله‌های مرغ مادر گوشتی صورت گرفته است میزان باروری آنها از ۹۳ درصد به ۸۰ درصد و پایینتر کاهش یافته است. این امر به خاطر وجود همبستگی منفی است که بین صفات تولید مثلی و تولیدی (سرعت رشد بالا) مشاهده می‌شود به طوری‌که سرعت رشد زیاد در طیور موجب اختلالات فیزیولوژیکی نظیر کاهش میل جنسی و کم شدن تمایل به آمیزش و تعداد دفعات جفتگیری و افت در میزان تولید مایع منی و ... خواهد شد (۹و۳). وجود شرایط نامساعد محیطی از قبیل دما، رطوبت، مسایل تغذیه‌ای و غیره نیز می‌توانند در تشدید مشکل فوق موثر باشند و همچنین در میزان باروری تخم‌مرغهای تولیدی و قابلیت جوجه درآوری در گله‌های مرغ مادر افت چشمگیری حاصل نماید (۵و۳).

به دلیل وجود مشکلاتی در جفتگیری طبیعی طیور سنگین وزن، استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی را به منظور بهبود قابلیت باروری گله به صورت امری ضروری و اجتناب ناپذیر در آورده است (۹). شکی نیست که به کارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی و استفاده توام از محلولهای رقیق کننده منی در افزایش بازده تولید مثلی و کاهش هزینه‌های تولید در صنعت پرورش مرغهای مادر گوشتی موثر می‌باشد و موفقیت در این تا حد زیادی به استفاده از محلولهای رقیق کننده مناسب جهت ذخیره کردن منی آنها در شرایط مطلوب بستگی دارد (۳،۵،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴).

محلولهای رقیق کننده تاثیرات سوء مواد زاید ناشی از متابولیسم اسپرماتوزوئیدها و آلاینده‌هایی مانند اورات، ادرار و یا مدفوع آمیخته شده با منی همین طور سمیت یونهای مثبت مانند آهن، مس، روی و در مرحله پایینتر منیزیم و غیره و یونهای منفی نظیر کلراتها، نیتراتها و سولفاتها را خنثی می‌نماید (۳،۴،۱۳،۱۴). رقیق کننده مواد مغذی لازم مانند قندهای ساده نظیر گلوکز و فروکتوز و یونهای معدنی مانند پتاسیم و سدیم و کلسیم و ... را جهت انجام فعالیتهای متابولیکی اسپرمها فراهم می‌آورد (۹و۳). به دلیل ایزوتونیک بودن این گونه محلولها، محیطی با فشار اسمزی مناسب برای فعالیت اسپرماتوزوئیدها فراهم می‌شود (۱۴و۱۱).

این گونه محلولها به دلیل داشتن ظرفیت بافری، اسید حاصل از متابولیسم مواد قندی توسط اسپرم (اسید لاکتیک) را خنثی کرده و از تغییرات بیش از حد اسیدیته مایع منی که برای اسپرمها (خصوصاً در زمان ذخیره طولانی مدت) بسیار مضر است، جلوگیری به عمل می‌آورد (۱۱و۴). رقیق کننده به دلیل داشتن مواد **سرما محافظ** از وارد آمدن تنشهای حرارتی (اعم از تنشهای سرمایی و یا گرمایی) به هنگام ذخیره طولانی مدت منی به روش انجماد ممانعت به عمل می‌آورد (۹). با پی بردن به تاثیرات نوع رقیق کننده (فاکتور۱) و طول مدت ذخیره مایع منی (فاکتور۲) بر صفات کمی و کیفی سلولهای جنسی‌نر (اسپرماتوزوئیدها) بررسی اثرات متقابل این دو فاکتور می‌توان به اطلاعات و نتایج مفیدی در زمینه نگهداری مناسب مایع منی و افزایش مدت ذخیره کردن اسپرمها با کیفیت مطلوب در هر دو حالت مایع و روش انجماد دست یافت (۵،۶،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۴).

ابداع و ارایه یک رقیق کننده با ترکیبات مناسب جهت نگهداری طولانی مدت مایع منی و در توسعه و کاربرد تلقیح مصنوعی در واحدهای تولیدی و در سطح تجاری در صنعت پرورش طیور کشور نقش شایان توجهی خواهد داشت (۹،۱۲،۱۳،۱۴). همچنین به کارگیری نتایج به دست آمده از اجرای این طرح در غلبه بر معضل افت تولید ناشی از کاهش باروری اسپرماتوزوئیدها و در نتیجه افزایش تعداد تخم مرغهای بدون نطفه بخصوص در فصول گرم و مناطق گرمسیری کشور تا حد زیادی چاره ساز خواهد بود (۶و۷).

هدف از اجرای این طرح دستیابی موارد زیر بود: ۱- تهیه یک رقیق کننده مناسب از منابع موجود در دسترس و جلوگیری از خروج ارز اضافی

۱) گروه آموزشی پرورش و مدیریت تولید طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی تغذیه و اصلاح نژاد دام دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) مرکز اصلاح نژاد کشور، تهران - ایران.
۴) گروه آموزشی علوم دامی مجتمع آموزش عالی ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران - ایران.

از کشور. ۲- ارزیابی ماندگاری اسپرم طیور به صورت منجمد و تلاش در جهت افزایش مدت زمان نگهداری اسپرم با کیفیت مطلوب به صورت مایع و به حالت انجماد. ۳- ارزیابی احتمال وجود تداخل بین نوع محلول رقیق کننده و طول مدت ذخیره مایع منی. ۴- توسعه و توجیه اقتصادی استفاده از تکنیک رقیق نمودن مایع منی و تلقیح مصنوعی در صنعت پرورش مرغ مادر گوشتی در کشور. ۵- افزایش بازده تولید مثلی، قابلیت نطفه‌داری، میزان جوجه درآوری در گله‌های مادر گوشتی و تخمگذار، کاهش هزینه‌های تولید و افزایش بهره‌وری اقتصادی در واحدهای تولیدی کشور.

مواد و روش کار

این طرح در مرکز اصلاح نژاد دام کشور واقع در مشکین آباد شهرستان کرج در تابستان ۱۳۷۹ و بر روی مرغهای مادر گوشتی (هیبرید آرین) انجام شد. تمامی پرندگان مورد آزمایش درسن ۲۶ هفتگی انتخاب شده و به مرکز انتقال داده شدند. هر کدام از خروسهای مورد آزمایش به صورت انفرادی و در قفسهایی به ابعاد ۴۱×۶۱×۶۱ سانتیمتری و مرغها در گروههای سه تایی در اتاقی به مساحت ۴۰ متر مربع (m^2 ۵×۸) با درجه حرارت ۱۸ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت روشنایی در روز و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جیره غذایی بر مبنای جداول تنظیم شده برای سویه آرین تهیه و در اختیار طیور مورد آزمایش قرار گرفت. جیره خروسهای مورد آزمایش شامل ۲۴۵۰ کیلو کالری انرژی متابولیسمی و ۱۴ درصد پروتئین و جیره مرغهای مادر گوشتی شامل ۲۷۵۰ کیلو کالری انرژی متابولیسمی، ۱۸ درصد پروتئین، ۳/۵ درصد کلسیم و ۰/۹ درصد فسفر بود. جیره‌های تهیه شده پلت و به طور آزاد تغذیه شد. همچنین روزانه ۳ مرتبه آب کافی و تازه در اختیار آنها قرار گرفت. از اجزای تشکیل دهنده جیره می‌توان به پودر ذرت، گندم، سویا، پودر ماهی، پودر صدف خوراکی (به عنوان منبع کلسیمی) و مکملهای ویتامینی و مواد معدنی اشاره نمود.

این پژوهش در دو مرحله به روش یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی اجرا شد. مرحله اول شامل اسپرم گیری از خروسهای سویه آرین و بررسی اثر سه فاکتور نوع رقیق کننده در سه سطح (آمریکایی Sexton , فرانسوی IMV و ایرانی TMU) و روش نگهداری مایع منی در دو سطح (روش انجماد و روش مایع) و طول زمان ذخیره سازی در سه سطح (صفر،۲۴و۴۸ ساعت بعد از اسپرم‌گیری) بر روی صفات کیفی اسپرماتوزوئیدها نظیر (درصد تحرک، زنده - مرده و طبیعی - غیر طبیعی بودن آنها) انجام گرفت.

ارزیابی تمامی صفات کیفی به روش چشمی و با استفاده از یک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و صفحه مانیتور متصل به آن، انجام شد. اسپرم‌گیری از خروسها به روش ارایه شده توسط کوئین و باروو (۱۹۳۷) انجام گرفت. بعد از جمع آوری مایع منی و انتقال آن به آزمایشگاه بلافاصله مایع منی به سه قسمت مساوی تقسیم شد و هرقسمت با یکی از سه رقیق کننده مورد آزمایش (آمریکایی، فرانسوی و ایرانی) به نسبت ۱ به ۴ رقیق شد. بعد از انجام ارزیابیهای اولیه، جهت ذخیره مایع منی و محافظت از سلولهای موجود در منی رقیق شده، به محلولها ۴/۵ درصد ماده **سرما محافظ** دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید. محلول رقیق شده با یک میکروپیپت به درون پایوت‌های ۰/۲۵ میلیمتری کشیده شد و با کمک دستگاه بسته‌بندی کننده پایوت‌ها، عمل بستن سر پایوت‌ها انجام گرفت. سپس این پایوت‌ها به طور افقی بر روی یک سینی شیاردار قرار داده شد. این مجموعه به مدت ۲ ساعت در دمای بین ۵ تا ۱۰ درجه سانتیگراد در مکانی مناسب و به حالت ساکن در همین وضعیت قرار گرفت. بعد از به تعادل رسیدن محلول منی رقیق شده با ماده **سرما محافظ**، محلول به تعادل رسیده به تانک مخصوص انجماد انتقال یافت. روند مراحل انجماد بدین ترتیب بود که از دمای ۵ درجه سانتیگراد تا دمای ۳۵- درجه سانتیگراد هر دقیقه ۱ درجه و از دمای ۳۵- تا ۹۰- درجه سانتیگراد در هر دقیقه ۸ درجه از دمای محیط کاسته شد. بعد از این دما پایوت‌های منجمد شده جهت ذخیره طولانی مدت به داخل مخزن ازت مایع انتقال یافتند. ذخیره مایع منی به حالت مایع نیز در دمای بین ۵ تا ۱۰ درجه سانتیگراد انجام شد.

مرحله دوم طرح شامل تلقیح مصنوعی مایع منی رقیق شده (با هر سه نوع رقیق کننده مورد آزمایش) در هر دو روش (مایع و انجماد) و ارزیابی اثر دو فاکتور (نوع محلول رقیق کننده در سه سطح (آمریکایی Sexton , IMV و TMU) و روش نگهداری مایع منی در دو سطح (مایع و انجماد) بر قابلیت نطفه‌داری (درصد) و میزان جوجه در آوری (درصد) مرغهای مادر گوشتی تلقیح شده (سویه آرین) می‌باشد. عمل تلقیح مصنوعی در عمق ۵ سانتیمتری واژن پرنده ماده و با دوز ۰/۰۵ سی‌سی و متوسط ۱۰۰ میلیون اسپرم در هر دوز و در ساعت ۱۷ بعد از ظهر انجام شد.

دو روز بعد از انجام هر تلقیح، تخم مرغهای تولیدی جمع آوری و ضدعفونی شده و در یک اتاقک کوچک و در دمای بین ۸ تا ۱۰ درجه سانتیگراد و در رطوبت ۶۵ تا ۷۵ درصد و به مدت یک هفته ذخیره شدند. بعد از اتمام هر دوره تلقیح، تمامی تخم مرغهای جمع آوری شده در این مدت، به داخل دستگاه جوجه کشی منتقل شدند. دمای درون دستگاه جوجه کشی در طول ۱۸ روز اول دوره انکوباسیون ۳۷/۸ درجه سانتیگراد با رطوبت ۶۵ درصد و ۳ روز آخر دوره ۳۷ درجه سانتیگراد با رطوبت ۷۵ درصد تنظیم شد. میزان نطفه‌داری (درصد) نیز در روز هفتم دوره انکوباسیون از طریق نوردهی یا Candling و میزان جوجه در آوری (درصد) نیز در روز ۲۱ هر دوره تعیین گردید. بعد از انجام هر مرحله، نتایج به دست آمده ثبت شد.

برای تجزیه و تحلیل نتایج از روش آنالیز واریانس استفاده و مقایسه بین میانگینها از طریق آزمون جدید چند دامنه‌ای دانکن و در سطح ۵و۱ درصد با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام شد.

نتایج

بررسیهای آماری نشان داد که تاثیر نوع رقیق کننده بر تحرک، زنده و طبیعی بودن اسپرماتوزوئیدها معنی‌دار است ($P<0/05$) (جدول ۱). میانگین تحرک اسپرماتوزوئیدها در منی رقیق شده با محلول Sexton (محلول شماره ۱) بالاتر از دیگر رقیق‌کننده‌های فرانسوی (IMV) و ایرانی (TMU) بود($P<0/05$). تفاوت بین دو رقیق کننده، IMV و TMU معنی‌دار نیست($P<0/05$). (جدول ۲). همچنین این حالت نیز در مورد صفات اسپرم زنده و طبیعی نیز مشاهده می‌شود و رقیق کننده Sexton دارای عملکرد بالاتری نسبت به سایر رقیق کننده‌ها بود($P<0/05$). (جدول ۲).

بررسیهای آماری نشان داد که اثر تیمار نوع روش نگهداری مایع منی بر تمامی صفات فوق یعنی تحرک، زنده و طبیعی بودن اسپرمها معنی‌دار است ($P<0/05$) (جدول ۲).

نتایج تجزیه واریانس اثر این تیمار بر صفات فوق و همچنین مقایسه اثرات هر دو روش نگهداری مایع منی یعنی حالت مایع و در حالت انجماد بر میانگین صفات تحرک، زنده و طبیعی بودن اسپرمها در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس آزمون دانکن، بین تیمار روش نگهداری منی در حالت مایع و انجماد اختلاف معنی‌داری وجود دارد($P<0/05$). بررسیهای آماری نشان داد که تیمار طول زمان ذخیره سازی مایع منی بر روی صفات تحرک، زنده و طبیعی بودن اسپرمها بسیار معنی‌دار است ($P<0/05$) (جدول ۲).

در مرحله دوم طرح نیز مشخص شدکه نوع رقیق کننده و نوع روش نگهداری مایع منی هر دو بر قابلیت نطفه‌داری و جوجه در آوری مرغهای مادر گوشتی تلقیح شده بسیار معنی‌دار است. نتایج به دست آمده در هر دو مرحله در جداول ۳ و ۴ قابل مشاهده است. نوع محلول رقیق کننده با درجه آزادی ۲ و روش نگهداری با درجه آزادی ۱ در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار هستند.

جدول ۱- خلاصه نتایج تجزیه واریانس روش نگهداری مایع منی، نوع محلول رقیق کننده و زمان ارزیابی مایع منی بر روی صفحات تحرک اسپرم، اسپرم زنده و اسپرم طبیعی موجود در مایع منی گرفته شده از خروسهای سویه آرین

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات		
		تحرک اسپرم	اسپرم زنده	اسپرم طبیعی
تکرار	۲	۱۱۳/۴۰^{ns}	۱۰۷/۷۲^{ns}	۱۱۰/۸۸^{ns}
روش نگهداری مایع منی	۱	۴۵۶/۴۶**	۳۴۷/۵۴۷**	۵۱۶/۴۶۳**
نوع محلول رقیق کننده	۲	۳۰۵۱/۳۵**	۳۳۹۵/۷۲*	۳۱۹۶/۲۲*
زمان ارزیابی مایع منی	۲*	۱۲۹۱/۷۹**	۱۱۶۲/۳۸۹**	۱۲۱۶/۸۸**
روش × رقیق کننده	۲	۱۰۳/۳۵۳*	۹۸/۱۳۰*	۷۲/۲۹۶*
روش × زمان ارزیابی	۲	۷/۴۶۳^{ns}	۸/۶۸۵^{ns}	۱۱/۶۳۰^{ns}
رقیق کننده × زمان ارزیابی	۴	۲/۵۱۹*	۰/۳۶۱*	۲/۴۴*
روش × رقیق کننده × زمان ارزیابی	۴	۶/۵۱۹^{ns}	۶/۸۲۴^{ns}	۴/۱۳۰^{ns}
اشتباه آزمایشی	۳۴	۲۵/۵۰۵	۲۳/۷۶۱	۲۶/۰۲۶
ضریب تغییرات (٪)		۷/۹۰	۷/۱۲	۷/۷۵

ns) غیره معنی‌دار، ۰ و ۰۰ به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪. ماخذ) یافته‌های تحقیق.

جدول ۲- مقایسه اثرات روش نگهداری مایع منی، نوع محلول رقیق کننده و زمان ارزیابی مایع منی بر روی میانگینهای صفات تحرک و ماندگاری و طبیعی بودن اسپرم

تیمار		تحرک اسپرم (درصد)	اسپرم زنده (درصد)	اسپرم طبیعی (درصد)
روش نگهداری مایع منی (A)				
مایع		۶۶/۸۶۱^{a}	۷۱/۱۲^{a}	۶۸/۶۶^{a}
انجماد		۵۱/۴۰^{b}	۵۶/۲۴^{b}	۵۳/۲۰^{b}
انحراف معیار		۱/۲۹	۱/۲۸	۱/۲۸
رقیق کننده (B)				
Sexton		۷۵/۷۳۶^{a}	۸۰/۷۵^{a}	۷۷/۷۸^{a}
Imv		۵۶/۵۶۹^{c}	۶۰/۹۴^{c}	۵۸/۴۰^{c}
Tmu		۶۰/۰۸۳^{c}	۶۴/۳۵^{c}	۶۱/۶۱^{c}
انحراف معیار		۱/۲۸	۱/۲۳	۱/۲۴
زمان ارزیابی (D)				
زمان o		۷۲/۸۸^{a}	۷۶/۵۸^{a}	۷۴/۰۷^{a}
زمان ۲۴		۶۳/۱۴^{b}	۶۷/۴۴^{b}	۶۵/۱۰^{b}
زمان ۴۸		۵۶/۳۸^{c}	۵۷/۵۰^{c}	۵۸/۶۳^{c}
انحراف معیار		۱/۴۰	۱/۴۳	۱/۴۱
روش نگهداری (A) × رقیق کننده (B)				
مایع	Sexton	۷۶/۸۱^{a}	۸۱/۶۱^{a}	۷۹^{a}
	Imv	۶۰/۳۹^{b}	۶۴/۳۶^{b}	۶۲/۲۸^{b}
	Tmu	۶۳/۳۹^{b}	۶۷/۳۹^{b}	۶۴/۶۹^{b}
انجماد	Sexton	۷۴/۶۷^{a}	۷۹/۸۹^{a}	۷۶/۵۶^{a}
	Imv	۵۲/۷۵^{d}	۵۷/۵۳^{d}	۵۴/۵۳^{d}
	Tmu	۵۶/۷۸^{d}	۶۱/۶۳^{d}	۵۸/۵۳^{d}
روش نگهداری (A) ×	زمان ارزیابی (D)			
مایع	زمان o	۷۵/۴۲^{a}	۷۸/۸۹^{a}	۷۶/۵۳^{a}
	زمان ۲۴	۶۵/۶۹^{c}	۷۰/۱۱^{c}	۶۷/۶۷^{c}
	زمان ۴۸	۵۹/۴۷^{d}	۶۴/۳۶^{d}	۶۱/۷۸^{d}
انجماد	زمان o	۷۰/۳۳^{b}	۷۴/۲۸^{b}	۷۱/۶۱^{b}
	زمان ۲۴	۶۰/۵۸^{d}	۶۵/۷۸^{d}	۶۲/۵۳^{d}
	زمان ۴۸	۵۳/۲۸^{e}	۵۸/۶۷^{e}	۵۵/۴۷^{e}

اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک می‌باشند، براساس آزمون دانکن، در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند. ماخذ: یافته‌های تحقیق.

بحث

همان گونه که قبلاً اشاره شد تنها اسپرماتوزوئیدهای متحرک قادر به عبور از ناحیه واژن و انتقال به توبولهای ذخیره کننده اسپرم می‌باشند (۶). چرا که برخلاف تصور قبلی بسیاری ازمحققین، گزینش اسپرماتوزوئیدها در سطح توبولهای ذخیره کننده آنها نمی‌باشد، بلکه فرآیند انتخاب اسپرمهای سالم در درون واژن و تحت کنترل دو مکانیسم مکانیکی (تحرک اسپرمها) و دیگری عامل بیوشیمیایی (واکنش متقابل بین اسپرمها و ترشحات موکوسی واژنی) صورت می‌گیرد (۶،۹،۱۴). یکی از عوامل تاثیر گذار بر روی بازده ذخیره اسپرم در غدد نگهدارنده اسپرم در جنس ماده انتخاب اسپرم از ناحیه واژن می‌باشد (۹و۶). در این میان هر چه میزان تحرک اسپرمهای تخلیه شده در ناحیه واژن بیشتر باشد به همان اندازه نیز بازده ذخیره اسپرم در پرنده ماده افزایش می‌یابد (۶،۹،۱۴).

جدول ۳- خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثرات نوع محلول رقیق کننده، روش نگهداری مایع منی بر روی صفات قابلیت نطفه داری و جوجه در آوری در مرغهای مادر گوشتی تلقیح شده (سویه آرین)

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات	
		قابلیت نطفه‌داری	میزان جوجه درآوری
تکرار	۲	۱۳/۷۲ ns	۲۱/۱۶۷ ns
نوع محلول رقیق کننده	۲	۶۷۸/۲۲**	۵۷۸/۶۶**
روش نگهداری مایع منی	۱	۱۷۰۱/۳۸۹**	۱۶۶۲/۷۲۲**
رقیق کننده × روش	۲	۳۶/۲۲**	۴۸/۲۲**
اشتباه آزمایشی	۱۰	۲۴/۵۸۹	۲۰/۵۶۷
ضریب تغییرات (٪)		۷/۴۸	۷/۲۹

ns) غیرمعنی‌دار، ۰ و ۰۰) به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪، ماخذ) یافته‌های تحقیق.

جدول ۴- مقایسه اثرات نوع محلول رقیق کننده و ورش نگهداری مایع منی بر روی میانگینهای صفات قابلیت نطفه‌داری (درصد) و میزان جوجه درآوری (درصد) مرغهای مادر گوشتی تلقی شده (سویه آرین)

تیمار		قابلیت نطفه‌داری (درصد)	میزان جوجه‌درآوری (درصد)
رقیق کننده (A)			
Sexton		۸۱/۲۲ a	۷۶ a
Imv		۶۰/۶۱ b	۵۵/۵۳ b
Tmu		۵۹ b	۵۳/۵۳ b
انحراف معیار		۲/۵۷	۲/۶۶
روش نگهداری مایع منی (C)			
مایع		۷۶/۱۵ a	۷۱/۱۵ a
انجماد		۵۲/۱۹ b	۵۲/۱۹ b
انحراف معیار		۲/۲۴	۲/۴۲
روش نگهداری (C) × رقیق کننده (A)			
مایع	Sexton	۸۸/۱۱ a	۸۲/۶۷ a
	Imv	۷۴/۳۳ b	۶۹/۳۳ b
	Tmu	۷۳/۶۷ b	۶۸/۷۲ b
انجماد	Sexton	۶۶/۶۷ c	۶۲/۱۳ c
	Imv	۴۷/۶ d	۴۲/۳۳ d
	Tmu	۵۱/۳۳ d	۴۴/۸۹ d

اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک می‌باشند، بر اساس آزمون دانکن، در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری ندرند، ماخذ: یافته‌های تحقیق.

از آن جایی‌که بازده ذخیره اسپرم در غدد نگهدارنده در پرنده ماده بسیار پایین است (به طوری‌که این میزان در مرغ حدود ۰/۹ و در بوقلمون معادل ۰/۸ کل اسپرمهای تخلیه شده در ناحیه واژن می‌باشد) بنابراین بدیهی است که هر عاملی که بتواند موجب افزایش تحرک اسپرماتوزوئیدها و ماندگاری بیشتر آنها گردد در میزان عبور انتخابی اسپرمها از واژن و بازده ذخیره اسپرم در غدد نگهدارنده SST و همچنین طول دوره باروری و تولید تخم مرغهای نطفه‌دار و افزایش میزان جوجه درآوری گله مرغهای مادر گوشتی موثر خواهد بود (۱۴و۹). در این میان نقش تیمار نوع رقیق کننده بسیار حایز اهمیت است. در طرح اخیر رقیق کننده Sexton به دلیل راندمان بالا و تاثیر مثبتی که بر صفات تحرک و ماندگاری اسپرمها از خود نشان داده است، در افزایش قابلیت باروری و میزان جوجه درآوری مرغهای مادر گوشتی تلقیح شده نیز موثر بوده است (۶) چرا که محلول Sexton بهتر از دو رقیق کننده دیگر اسپرماتوزوئیدها را در مقابل تغییرات ناشی از تولید اسید لاکتیک و یون هیدروژن حاصل از متابولیسم مواد انرژی‌زا و تغییرات فشار اسمزی محافظت نموده و مواد مغذی لازم جهت انجام فعالیتهای متابولیکی اسپرم را تامین می‌نماید.

استفاده از رقیق کننده مناسب نه تنها در ماندگاری اسپرماتوزوئیدها و تحرک و طبیعی یا غیر طبیعی بودن آنها و در نتیجه افزایش بازده تولید مثلی در پرنده نر، بلکه در افزایش عبور اسپرماتوزوئیدها از ناحیه واژن و بازده ذخیره اسپرمها در غدد نگهدارنده اسپرمها SST و بهبود بازده تولید مثلی (بهبود قابلیت نطفه‌داری و میزان جوجه درآوری) در گله‌های مرغ مادر نیز دارای نقش بسزایی می‌باشد. مقایسه اثر تیمار (نوع رقیق کننده) بر میانگینهای تحرک اسپرم، اسپرم زنده و اسپرم طبیعی و تاثیر آن بر قابلیت نطفه‌داری و جوجه درآوری در جداول ۲ و ۴ آورده شده است که گویای این حقیقت می‌باشند. نمودارهای مربوط به این تیمار آزمایشی بر صفات مذکور نیز در ادامه آورده شده است. برای حصول افزایش بازده تولیدمثلی از طریق تلقیح مصنوعی لازم است که بازده تلقیح مصنوعی افزایش یابد. به عبارتی اگر از تخم مرغهای تولیدی حاصل از تلقیح جوجه‌های بیشتری به دست آید، بازده تولید مثلی زیاد شده است (۳،۹،۱۴). در افزایش بازده تلقیح مصنوعی عواملی مانند کیفیت اسپرم، سن پرنده نر، برنامه نوری، فصل، وزن بدن، رژیم غذایی و تکنیک جمع آوری اسپرم دخیل هستند (۸). یکی دیگر از عوامل موثر، رقیق کننده‌های به کار گرفته شده برای رقیق سازی و افزایش مدت نگهداری و ازدیاد تعداد واحدهای تلقیحی است (۱،۳،۵،۶،۹،۱۱،۱۴). در حقیقت افزایش تعداد واحدهای تلقیحی به کار گرفته شده در تلقیح مصنوعی، بر مبنای رقیق کننده می‌باشد و به کمک رقیق کننده‌ها می‌توان با یک پرنده نر تعداد بیشتری پرنده ماده را بارور ساخت (۱۴و۹). در مجموع رقیق کننده Sexton دارای بهترین عملکرد بود و در درجات بعدی رقیق کننده‌های IMV و TMU قرار دارند. اختلاف بین میانگینهای به دست آمده از محلول Sexton با دو رقیق کننده دیگر معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).تفاوت بین دو رقیق کننده IMV و TMU معنی‌دار نبود ($P < ۰/۰۵$). از آنجایی‌که هزینه ساخت رقیق کننده ایرانی (TMU) بسیار کمتر از هزینه‌های مورد نیاز جهت ساخت محلول رقیق کننده فرانسوی ($P < ۰/۰۵$) است و نیز به دلیل در دسترس‌تر بودن و فراوانتر بودن مواد مورد نیاز جهت ساخت این محلول و با توجه به این نکته که میانگین مربعات به دست آمده از این دو رقیق کننده و تاثیر آنها بر صفات اندازه‌گیری شده در هر دو مرحله طرح انجام شده بسیار نزدیک به هم می‌باشد و اختلاف فاحشی بین آنها دیده نمی‌شود به کارگیری و استفاده از این محلول رقیق کننده نسبت به رقیق کننده فرانسوی از توجیه اقتصادی بالاتری برخوردار بوده و قابل توصیه است.

در تلقیح مصنوعی با استفاده از رقیق کننده و در نتیجه افزایش حجم منی اخذ شده از یک پرنده نر تعداد پرنده ماده بیشتری را می‌توان بارور ساخت و در نتیجه به پرنده کمتری در برنامه‌های تلقیحی نیاز است. بدین ترتیب می‌توان فشار انتخابی بیشتری را در مورد صفات مطلوب اقتصادی و تثبیت آنها یا حذف ژنهای مضر در گله نظیر (ژن کوتولگی) در هر نسل اعمال نمود. بدین ترتیب امکان گسترش برنامه‌های اصلاح نژادی فراهم می‌گردد (۲،۳،۶،۹،۱۳،۱۴).

استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی توام با افزایش فشار انتخابی در برنامه‌های بهنژادی گله باعث افزایش سرعت پیشرفتهای ژنتیکی در صفات تولیدی در واحد زمان می‌گردد و این حالت تنها در صورتی امکانپذیر است که انجام تلقیح مصنوعی توام با استفاده از محلولهای رقیق کننده باشد (۱،۳،۶،۹،۱۴). این مسئله بخوبی در نتایج طرح آزمایشی انجام شده مشاهده شد.

در مجموع این نتیجه حاصل شد که ذخیره طولانی مایع منی به روش انجماد در طیور در صورتی‌که توام با به کارگیری شیوه درستی صورت گیرد با راندمان خوبی همراه می‌باشد و استفاده از روش انجماد جهت نگهداری طولانی مدت مایع منی در گله‌های لاین عملی و قابل توصیه است. در روش انجماد میزان فعالیتهای متابولیکی و تحرک اسپرمها به حدود صفر می‌رسد و دیگر قادر به تولید اسید لاکتیک و اسیدی نمودن محیط نمی‌باشند. بدیهی است که میزان انرژی مورد نیاز آنها نیز در این حالت به دلیل توقف فعالیتهای متابولیکی صفر می‌باشد (۹).

بدین ترتیب با به کارگیری روش درست انجماد در حال حاضر امکان ذخیره طولانی مدت اسپرماتوزوئیدها به روش انجماد با راندمانی مطلوب و برای زمان طولانیتری (بیش از دو ماه) وجود دارد و در عمل در گله‌های لاین و اجداد این مساله نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های بهنژادی خواهد داشت (ماخذ: یافته‌های تحقیق).

تیمار روش نگهداری نیز همانند تیمار نوع محلول رقیق کننده به دلیل این که به طور مستقیم بر روی میزان تحرک و ماندگاری اسپرمها تاثیر گذار می‌باشد و در میزان عبور انتخابی اسپرمها از ناحیه واژن و میزان بازده ذخیره اسپرم در توبولهای نگهدارنده (SST) و همچنین بازده تولید مثلی و قابلیت باروری و جوجه درآوری گله‌های مادر دارای تاثیر معنی‌داری می‌باشد ($P < ۰/۰۵$). بنابراین به کارگیری بهترین شیوه نگهداری مایع منی چه به حالت مایع و چه در حالت انجماد به منظور بقای اسپرماتوزوئیدها و متعاقباً حفظ قابلیت باروری و میزان جوجه درآوری گله‌های مرغ مادر تلقیح شده امری ضروری و اجتناب ناپذیر می‌باشد. توصیه می‌شود که در تمامی مراحل ذخیره سازی مایع منی به دلیل حساسیت زیاد اسپرماتوزئیدهای پرندگان به تنش حرارتی (سرما یا گرما)، اقدامات احتیاطی جهت محافظت اسپرماتوزوئیدها در مقابل تنشهای حرارتی به عمل آید تا هم بتوان راندمان تولید مثلی گله‌های تلقیح شده را در یک سطح مطلوب و استاندارد و قابل قبولی حفظ نمود و هم بهره‌وری اقتصادی را در واحدهای تولیدی بهبود بخشید (ماخذ: یافته‌های تحقیق).

با افزایش طول مدت ذخیره مایع منی از تعداد اسپرمهای متحرک موجود در آن کاسته می‌شود. چرا که در اثر فعالیتهای متابولیکی اسپرماتوزوئیدها نظیر (تنفس و گلیکولیز) برای تامین انرژی مورد نیاز خود از مواد انرژی‌زای موجود در محلول رقیق کننده، میزان اسید لاکتیک و یونهای هیدروژن در محلول افزایش می‌یابد. این امر سبب می‌شود که pH محیط کاهش یابد و محلول اسیدی شود. وجود محیط اسیدی برای اسپرمهای پرندگان فوق‌العاده خطرناک و کشنده است که نتیجه این حالت کاهش میزان تحرک و فعالیت متابولیکی اسپرماتوزوئیدها و ماندگاری آنها می‌باشد (۲،۶،۹،۱۲،۱۴). بنابراین ذخیره طولانی اسپرماتوزوئیدها چه به روش انجماد و چه به روش مایع باعث کاهش میزان اسپرماتوزوئیدهای متحرک موجود در منی می‌گردد. لذا استفاده از رقیق کننده‌های مناسب و به کارگیری شیوه صحیح ذخیره سازی می‌تواند در افزایش مدت زمان ذخیره کردن اسپرمها موثر باشد بدون اینکه افت قابل توجهی درتعداد اسپرمهای متحرک مشاهده شود (۱۴و۹). هر چند کاهش میزان تحرک اسپرماتوزوئیدها در زمان ذخیره کردن مایع منی و با اثر گذشت زمان امری اجتناب ناپذیر است، با این حال نوع رقیق کننده و نوع روش نگهداری مایع منی در نسبت کاهش تحرک و میزان ماندگاری اسپرماتوزوئیدهای ذخیره شده و امکان نگهداری بیشتر آنها نقش بسزایی دارد (۹و۶).

با اینکه در زمان به کارگیری منی ذخیره شده امکان دستیابی به سطوح باروری مطلوب دور از انتظار نیست با این حال در صورت امکان استفاده از منی تازه رقیق شده برای انجام برنامه‌های تلقیحی ترجیح داده شده و توصیه می‌گردد چرا که در بسیاری از موارد استعمال منی تازه به دلیل داشتن اسپرماتوزوئیدهای متحرک زیاد با راندمان بالاتری نسبت به مایع منی ذخیره شده همراه بوده است (ماخذ: یافته‌های تحقیق). در تحقیق حاضر بهترین نتیجه، زمانی حاصل شد که بلافاصله یا کمی بعد از رقیق کردن مایع منی مورد ارزیابی قرار گرفت (جداول ۳ و ۴).

به طور کلی عواملی مانند نوع رقیق کننده، روش نگهداری و طول مدت ذخیره سازی مایع منی بر قابلیت ماندگاری اسپرماتوزوئیدها و قابلیت نطفه‌داری و جوجه درآوری مرغهای مادر گوشتی دارای تاثیر معنی‌داری است ($P<۰/۰۵$).

تشکر و قدردانی

در پایان از زحمات و همکاریهای صمیمانه مدیریت محترم مرکز پشتیبانی طیور کشور و مدیریت محترم مزرعه مرغ مادر مشکین آباد در تامین مرغ و خروس و دان مورد نیاز جهت انجام آزمایشها تشکر و قدردانی می‌نماید. همچنین از همکاری ریاست محترم مرکز اصلاح نژاد دام کشور و کلیه همکاران محترم در تخصیص مکان مناسب برای انجام آزمایش و اجازه استفاده از امکانات و آزمایشگاههای آن مرکز و راهنماییهای سازنده و دقیق این عزیزان صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. از مدیریت محترم شرکت روکت اینترنشنال و کلیه همکاران ایشان که در تامین وسایل مربوط به اسپرم گیری و تلقیح مصنوعی و در اختیار گذاشتن محلول رقیق کننده فرانسوی (IMV) ما را یاری نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

۱. پور رضا، ج. (۱۳۷۴): اصول علمی و عملی پرورش طیور. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد دانشگاه صنعتی اصفهان، ۳۲۰ صفحه.

۲. دادرس، ح. و منصوری، س. (۱۳۷۵): پرندگان و ساختار فعالیت بدن آنها (تالیف اس. کینگ و ام. مک‌لی‌لند) انتشارات شیراز، ۳۹۰ صفحه.

۳. زنده روح کرمانی، ر. و. میرسلیمی، س.م. (۱۳۷۴): فیزیولوژی پرندگان (تالیف استورکی). انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر، ۶۹۷ صفحه.

۴. گلیان، ا. و سالار معینی، م. (۱۳۷۴): تغذیه طیور. انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر، ۳۴۸ صفحه.

5. Bahr, J.M. and Nalbandov, A.V. (1982): Reproduction in poultry: In Reproduction in Farm animals, Lea& Febiger, 4th edition, PP: 529–551.
6. Brillard, J.P. (1993): Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. Poult. Sci. 72: 923-928.
7. Chaudhuri, D. (1996): Artifical insemination and its application to poultry industry-improvement of reproductive efficiency through prediction of fertilizing ability and high temperature semen extender. Proceedings of the xx world's Poult. Congress, vol l, PP: 539-546.
8. Donoghue, A.m. and Wishart, G.j. (2000): Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science 62: 213-232.
9. Etches, R.J. (1996): Reproduction in Poultry. CAB International. PP: 234-259.
10. Kirby, J.D., Tressler, C.J. and Kirby, Y.k. (1998): Evaluation of the duration of sperm fertilizing in five lines of commercial broiler breeder and delaware cross males. Poult. Sci. 77: 1688-1698.
11. Kumararaj, R., Omparkash, A.V. (1996): Effect of different diluents, cryoprotectants and equilibration on freezing of poultry semen. Proceedings of the xx World's Poult. Congress, vol l, PP: 554-567.

12. Lake, P.E. (1982): Factors affecting the fertility level in poultry, with special reference to artificial insemination. Br. Poult. Sci. 23: 106-117.
13. Lake, P.E. and Stewart, J.M. (1978): Artifical insemination in poultry. Bulletin. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, No. 213. Her Majestry's Stationary Office. London. UK.
14. Reddy, R.P. (1996): Use of artificial inseminationin broilers, under various production, management, and marketing conditions. Proceedings of the XX World's Poult. Congress, Vol I, PP: 519-529.

The effect of different diluents on viability of spermatozoa, fertility and hatchability in broiler breeders.

Rahimi, S.[1], Mohammadi, R.[1], Shahidi, R.[2], Molla Salehi,M.R.[3], Emam Jomeh. N.[4]

[1]Department of Faculty Sciences, College of Agriculture Tarbiat Modarres University, Tehran – Iran. [2]Department of Animal nutrition and Breedings, Faculty,of Veterinary Medicine,University of Tehran, Tehran – Iran. [3]State Breeding Center, Karaj – Iran. [4]Department of Animal Sciences,Abu – Reyhan Higher Education Complex,University of Tehran, Tehran – Iran.

The genetic breeding improvement plan which carried out between the past decade, put emphasis on selection characteristics shuch as weight gain and rapid growth in broiler breeders, reduced fertility rate extensively. This occured due to negative correlation between reproductive and productive trials. Therefore, rapid growth rate in poultry brought about induction the physiological disorders (e.g. reducing of libido, mating number, and semen production). Due to large size and heavy body weight in turkeys and broiler breeders, natural mating is known to be difficult and fertility rate reduces in meat type poultry. Therefore, using of artificial insemination (AI) became very necessary in these birds. AI has many advantages to natural mating e.g. cost effectivnes, higher fertility, hatchability and etc. Utilizing a good semen diluent is of high importance in AI application in order to maintaining the seemen in optimum condition. In this project, the effect of three different kind of semen extener such as Sexton (American), IMV (French) and TMU (Iranian semenextender which is developed in this research) were compared on semen quality. The semen which diluted by sexton extender, showed better quality than The other two (IMV & IMU) (P>0/05). No difference were observed between IMV and TMU on The effect of semen quality. Method of semen storage also had significant effect on motility and viability of spermatozoa (P<0/05). Liquid and frozen form of maintaining semen showen significant effect (P<0/01) on sperm quality. Duration of sperm storage affected the motility and viability of spermatozoa (P<0/01). Application of AI immediately after dilution of fresh semen showed better results. Kind of extender and method of sperm storage affected the rate of fertility and hachability in brolier breeder hens (P<0/01).

Key words: Extender. Artifical insemination, Spermatozoid, hatchability, Fertility, Broiler Breeder.