مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، سال ۱۳۸۴ (۶۱۲-۶۰۳)

ارزیابی چندین رقیق‌کننده برای نگهداری اسپرم خروس‌های بومی فارس در دمای ۵-٤ و ۲٤-۱۹ درجه‌ی سانتی‌گراد

محمدجواد ضمیری[۱]، محمدرضا هاشمی[۲] و علیداد بوستانی[۳]
۱، ۲، ۳، استاد و دانشجویان سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/٤/۱۷

خلاصه

این آزمایش، به ارزیابی رقیق کننده‌های سکستون[۱]، وان‌ومبیک[۲] و لیک [۳] (در دمای ۵-٤ درجه‌ی سانتی‌گراد یخچال) و رقیق‌کننده‌های سکستون و چادهوری[٤] (دردمای ۲٤-۱۹ درجه‌ی سانتی گراد اتاق) برای نگهداری اسپرم خروس‌های بومی پرداخت. ویژگی‌های منی رقیق شده (درصد اسپرم زنده، میزان جنبایی اسپرم و pH)، بی‌درنگ پس از رقیق شدن (زمان صفر) و نیز ٦ و ۲٤ ساعت پس از رقیق شدن، ارزیابی شد. نمونه‌های منی رقیق شده (۰/۲میلی لیتر، به نسبت ۱ به ۲) و نگهداری شده برای صفر، ٦ و ۲٤ ساعت، در بعد از ظهر به مرغ‌های بومی تلقیح (هر هفته یک بار و در مجموع برای ۵ هفته) و تخم‌مرغ های آنها برای اندازه‌گیری درصد تخم‌های بارور (نطفه دار) و درصد جوجه‌دهی، جوجه کشی شدند. تفاوت در میزان جنبایی اسپرم، درصد باروری، درصد جوجه‌دهی، درصد اسپرم‌های زنده و pH در نمونه‌های منی نگهداری شده با رقیق‌کننده‌های مختلف، معنی‌دار بود (P<0.0001). با افزایش زمان نگهداری، ارزش فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، کاهش یافت. همه‌ی رقیق کننده ها، برای رقیق کردن منی و تلقیح مصنوعی فوری، مناسب بودند (باروری ۹۱ تا ۹۹ درصد) و کمترین میزان باروری (۱/۲ درصد) درنمونه‌های رقیق شده در رقیق کننده‌ی چادهوری و نگهداری شده در دمای اتاق برای ۲٤ ساعت، به دست آمد. باروری نمونه‌های نگهداری شده در یخچال به طور معنی داری از نمونه‌های نگهداری شده در اتاق بیشتر بود (P<0.01). بیشترین درصد باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دمای ٤ تا ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ٦ ساعت (۷۷٪) و ۲٤ ساعت (٤۱٪) با رقیق کننده‌ی سکستون، به دست آمد. درصد اسپرم‌های زنده و میزان جنبایی اسپرم‌ها، همبستگی بالایی (r=0.80 to 0.90) با جوجه‌دهی کل و باروری داشتند (P<0.0001). همبستگی pH نمونه های منی با میزان جنبایی اسپرم (r=0.65)، درصد اسپرم‌های زنده (r=0.71) و باروری (r=0.67)، نیز معنی دار بود (P<0.0001).

واژه‌های کلیدی: اسپرم، خروس، رقیق‌کننده، دمای نگهداری اسپرم

مکاتبه کننده: محمد جواد ضمیری e-mail:mjzamiri@yahoo.com

1. Sexton
2. Van Wambeke
3. Lake and Ravie
4. Chaudhuri and Lake

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تلقیح مصنوعی، استفاده موثر از اسپرم اضافی جنس نر را ممکن می‌سازد. ایوانف برای اولین بار تلقیح مصنوعی را در پرندگان اهلی انجام داد (۱۷). مراحل تلقیح مصنوعی شامل اسپرم‌گیری، ارزیابی نمونه، نگهداری و تلقیح است و استفاده از روش مناسب و دقت در انجام هر یک از مراحل، نقش بسزایی در موفقیت تلقیح مصنوعی دارد (۲). نگهداری منی مهمترین مرحله در تلقیح مصنوعی است. با توجه به فاصله زمانی بین اسپرم‌گیری و تلقیح، داشتن یک محیط مناسب برای نگهداری اسپرم‌ها، با استفاده از رقیق‌کننده‌ها، امکان‌پذیر می‌شود (۱). رقیق‌کننده‌ها، محلول‌های نمکی بافری هستند که برای افزایش حجم منی (تقسیم آسان نمونه برای تلقیح، آسان شدن ارزیابی، حمل و نقل و تلقیح آسان)، زنده نگه داشتن اسپرم بیرون از بدن و افزایش تعداد تلقیح استفاده می‌شوند (۸).

اسپرم‌گیری به طور کارآمد با روش مالش شکمی در ماکیان، بوقلمون، مرغ شاخدار، قرقاول و بلدرچین و با قطع جریان منی به هنگام جفتگیری در اردک و غاز، انجام می‌شود (۱). پیشرفت‌های بسیاری در زمینه تولید رقیق‌کننده‌های منی و روش‌های نگهداری منی ماکیان انجام شده است اما روش اصلی جمع آوری منی، همان روش مالش شکمی است که در سال ۱۹۳۰ ابداع شد (۸).

در ساخت رقیق‌کننده‌ها و پیشرفت روش‌های نگهداری برای منی ماکیان، تفاوت‌های فیزیولوژیکی و نیازهای متابولیکی اسپرم گونه‌های مختلف، اهمیت دارد. ساخت رقیق‌کننده‌های جدید برای نگهداری طولانی مدت اسپرم، موجب افزایش و بهبود کارآیی روش‌های نگهداری منی در ماکیان می‌شود (۸). فیلیپس و لاردی (۱۰) نخستین بار از یک محیط دارای بافر فسفات و زرده‌ی تخم مرغ، برای رقیق کردن منی استفاده کردند که در آن، باروری اسپرم برای چند روز حفظ شد. باروری بالای ۸۳٪ در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۹۱٪ در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای اسپرم خروس رقیق شده با رقیق کننده‌ی بلتسویل[1] در مدت زمان ۳۰ دقیقه نگهداری گزارش شد (۱۵). سکستون و فیولاس نشان دادند که باروری منی رقیق شده‌ی خروس با رقیق کننده‌ی بلتسویل، پس از صفر، ۴و ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، به ترتیب،۸۸٪، ۸۸٪و۴۸٪ بود (۱۶). از سویی، بله بوآ و دی ریویرز، باروری منی رقیق شده‌ی خروس در رقیق کننده‌ی بلتسویل را پس از۲۴ ساعت نگهداری‌در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۷۲٪ گزارش کردند (۶).

هوارث از رقیق‌کننده‌های بلستویل، لیک و MEM[2] برای نگهداری منی در دمای ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده کرد. پس از ۶ ساعت نگهداری، باروری نمونه‌ی دارای MEM (۹۰/۳٪) بسیار بالاتر از نمونه‌های نگهداری شده با رقیق‌کننده‌های بلتسویل (۳/۵٪) و لیک (۱/۹٪) بود، امّا تفاوتی در درصد جوجه‌دهی مشاهده نشد (۹). سکستون، تفاوتی در باروری منی رقیق شده با رقیق کننده‌ی بلتسویل، در زمان‌های صفر، ۴ و ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۵ و ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده نکرد، اما باروری پس از ۲۴ ساعت به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود (۱۳). شیندلر و همکاران (۱۲) منی خروس را با رقیق‌کننده‌های لیک، رینگر[3] و شیر به نسبت ۱:۳ رقیق و برای ۴ ساعت در دمای ۴ یا۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری کردند؛ کاهش باروری در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به دمای ۱۰ درجه، کمتر بود. تنفس اسپرم، به دما وابسته است و با افزایش دما، افزایش می‌یابد. کلارک و همکاران (۷)، کمترین میزان جنبایی (تحرک) اسپرم در منی رقیق شده‌ی خروس و بوقلمون با رقیق کننده‌ی بلتسویل را در دمای ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده کردند. در بررسی‌های هوارث (۹)، کاربرد رقیق کننده‌های بلتسویل و لیک، برای نگهداری منی خروس در دمای ۵-۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با موفقیت همراه بود اما این رقیق کننده ها، توان حفظ باروری را در دمای ۴۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، نداشتند.

کمترین شمار اسپرم مورد نیاز برای دستیابی به باروری بهینه، به سن خروس، روش اسپرم‌گیری، فاصله بین اسپرم‌گیری و تلقیح، مهارت فنی تلقیح کننده و سازه‌های دیگری بستگی دارد (۱). سطح بالای باروری با تلقیح ۵۰ میلیون اسپرم، به دست آمد؛ هر چند که تجربه‌های پژوهشی و کاربردهای صنعتی

1. Beltsville

2. Minimum essential medium

3. Ringer

Archive of SID

www.SID.ir

تلقیح مصنوعی رویهمرفته، به استفاده از ۱۰۰ میلیون اسپرم درهر بار تلقیح مصنوعی پرندگان اهلی، انجامیده است (۱). تانجا و گو (۱۸) اثر دوز تلقیح را بر طول دوره‌ی باروری مرغ‌های سویه های گوشتی و تخمگذار بررسی کردند؛ طول دوره‌ی باروری پس از تلقیح ۰/۲ و ۰/۳ سی‌سی منی، به ترتیب ۱۴/۹ و ۱۵/۳ روز بود، و دوز تلقیح و نژاد اثر معنی داری بر طول دوره‌ی باروری داشتند. ویلکاکس (۲۰) نشان داد که طول دوره‌ی باروری منی خروس‌های سویه‌ی گوشتی، کمتر از سویه تخمگذار بود. سکستون (۱۳) اثر تعداد اسپرم تلقیح شده را بر باروری منی رقیق شده به نسبت‌های مختلف با استفاده از رقیق کننده‌ی بلتسویل بررسی کرد؛ تعداد اسپرم لازم، برای دستیابی به باروری بالا (۸۲٪)، برای منی نگهداری شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵ یا ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب، ۲۰ و ۵۰ میلیون بود.

چندین سال است که مرکز مطالعات مرغ بومی فارس، وابسته به سازمان جهاد کشاورزی استان فارس، برنامه‌های بهنژادی مرغ بومی را اجرا می‌کند، و معمار و ضمیری (۱۳۸۴)، به تازگی، تغییرات ویژگی‌های اسپرم و باروری خروس‌های بومی این مرکز را گزارش کردند. بنابراین، دستیابی به رقیق‌کننده‌های مناسب، می تواند در پیشرفت برنامه‌های بهنژادی مرغ بومی، سهم بسزایی داشته باشد. با توجه به این که، نقش رقیق‌کننده‌ها در حفظ باروری اسپرم خروس‌های بومی بررسی نشده، ضروری است که رقیق‌کننده‌های مناسبی برای نگهداری اسپرم خروس‌های بومی، به منظور افزایش سرعت پیشرفت برنامه‌های بهنژادی، شناسایی شود. این پژوهش در راستای شناسایی رقیق‌کننده‌های مناسب برای اسپرم خروس‌های بومی، به منظور افزایش راندمان تلقیح مصنوعی و کاهش هزینه‌های ناشی از باروری پایین اسپرم پس از نگهداری، انجام شد. دراین پژوهش، اثر ۴ رقیق کننده، که بیشترین زمان نگهداری اسپرم خروس‌های بومی با باروری بالا را در دمای ۵-۴ و ۲۴-۱۹ درجه‌ی سانتی‌گراد ممکن سازد، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از ۱۶۰ مرغ و ۲۰ خروس ۷ ماهه‌ی بومی استفاده شد. مرغ‌ها و خروس‌ها از گله‌ی موجود در مرکز مطالعات مرغ بومی فارس، به طور تصادفی انتخاب شدند. برای خوکردن خروس‌ها به برنامه‌ی اسپرم گیری، یک دوره‌ی ۳ هفته‌ی اسپرم‌گیری، درنظرگرفته شد. برای اطمینان از باقی نماندن اسپرم زنده در دستگاه تولید مثلی، مرغ‌ها پس از ۶ هفته وارد آزمایش شدند. مرغ‌ها به طور تصادفی به ۱۶ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند؛ یک گروه، شاهد و ۱۵ گروه دیگر برای تیمارهای مختلف آزمایش (فاکتورهای دما، نوع رقیق کننده و زمان نگهداری)، درنظر گرفته شدند (جدول ۱).

جدول ۱- نشانه‌های اختصاری برای نمونه‌های منی از نظر نوع رقیق کننده، دما و زمان نگهداری اسپرم رقیق شده

نمونه‌ی منی	رقیق کننده[1]	دمای نگهداری[2]	زمان نگهداری (ساعت)
AC_0	A	-	۰
AC_6	A	یخچال	۶
AC_{24}	A	یخچال	۲۴
BC_0	B	-	۰
BC_6	B	یخچال	۶
BC_{24}	B	یخچال	۲۴
CC_0	C	-	۰
CC_6	C	یخچال	۶
CC_{24}	C	یخچال	۲۴
CR_0	C	-	۰
CR_6	C	اتاق	۶
CR_{24}	C	اتاق	۲۴
DR_0	D	-	۰
DR_6	D	اتاق	۶
DR_{24}	D	اتاق	۲۴

۱- ترکیب شیمیایی رقیق کننده ها، از اتچز (۱) برگرفته شده است:
A: Lake and Ravie (1979)
B: Van Wambeke (1972)
C: Sexton (1977)
D: Chaudhuri and Lake (1988)
۲- دمای یخچال بین ۵-۴ درجه‌ی سانتی گراد و دمای اتاق بین ۲۴-۱۹ درجه‌ی سانتی گراد متغیر بود.

از رقیق‌کننده‌های وان‌ومبیک، لیک و سکستون برای نگهداری منی خروس‌ها در دمای یخچال (۵-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) و از رقیق‌کننده‌های سکستون و چادهوری برای

Archive of SID

www.SID.ir

نگهداری منی در دمای اتاق (۲۴-۱۹ درجه‌ی سانتی گراد) استفاده شد (۱). منی رقیق شده (به نسبت ۱ به ۲)، در زمان‌های ۰، ۶ و ۲۴ ساعت پس از تهیه و نگهداری، و بعد از ظهر، به میزان ۰/۲ سی سی منی رقیق شده، به هر مرغ تلقیح شد که نزدیک به ۲۰۰ میلیون اسپرم زنده داشت. تخم مرغ‌ها، ۲ تا ۶ روز پس از هر تلقیح، جمع آوری شدند و درصد باروری و جوجه دهی آنها (بر پایه کل تخم مرغ و هم چنین بر پایه تخم مرغ های بارور) محاسبه شد.

در هر یک از مراحل آزمایش، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده، pH و میزان جنبایی اسپرم نیز اندازه‌گیری شد. میانگین حجم منی و غلظت اسپرم هر خروس در هر نوبت، به ترتیب برابر با ۰/۷ میلی لیتر و ۱/۸ بیلیون اسپرم در هر میلی لیتر بود. فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، به شرح زیر بودند:

۱- pH منی با استفاده از دستگاه pH متر تا ۲ رقم اعشار
۲- غلظت اسپرم در منی با استفاده از هیموسیتومتر
۳-جنبایی اسپرم با میکروسکوپ مجهز به صفحه گرمایی، و در مقیاس صفر (بدون حرکت) تا ۵ (با حرکت بسیار زیاد) (۵).
۴- درصد اسپرم زنده با روش رنگ آمیزی با ائوزین- نیگروزین (۴).
۵- باروری (درصد)
۶- جوجه دهی (درصد)

داده‌ها با روش آنالیز واریانس برای "داده‌های تکرار شونده روی هر فرد"[1] و با استفاده از Proc Mixed برنامه‌ی SAS، آنالیز و میانگین‌ها، با روش توکی (P=0.01) مقایسه شدند (۱۱). داده هایی که به شکل درصد بودند، در آغاز به Arcsine $\sqrt{x}$ تبدیل و آنالیز شدند، اما در این مقاله، میانگین‌های تبدیل نشده، گزارش شده‌اند.

نتایج

تفاوت در میزان جنبایی اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، باروری، درصد جوجه‌دهی کل و درصد جوجه‌دهی نسبت به تخم مرغ های بارور (جدول ۲) معنی‌دار بود (P=0.0001).

۱- میزان جنبايي اسپرم

میزان جنبایی اسپرم، پس از ۶ ساعت نگهداری، در نمونه‌ی CC_6 بیشترین و در نمونه‌ی DR_6 کمترین بود. میزان جنبایی اسپرم در نمونه‌ی DR_6 با نمونه‌های BC_6 و CC_6 تفاوت معنی‌داری داشت. در بین نمونه‌های منی ۲۴ ساعت نگهداری شده، بیشترین میزان جنبایی اسپرم در نمونه‌ی CC_{24} و کمترین آن در نمونه‌ی DR_{24} مشاهده شد. میزان جنبایی اسپرم در نمونه‌های نگهداری شده در یخچال به طور معنی داری بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق بود. میزان جنبایی اسپرم در نمونه‌های منی با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت. تمام نمونه‌های منی که بی‌درنگ پس از رقیق شدن تلقیح شدند، میزان جنبایی بالاتری نسبت به نمونه‌هایی داشتند که برای ۶ و ۲۴ ساعت نگهداری شدند. روند کاهش میزان جنبایی اسپرم در نمونه‌های منی نگهداری شده در یخچال، کمتر از نمونه‌های منی نگهداری شده در دمای اتاق بود. میزان جنبایی اسپرم نمونه‌های منی ۲۴ ساعت نگهداری شده در دمای اتاق، به طور معنی داری از دیگر نمونه‌های منی کمتر بود. میزان جنبایی اسپرم با pH نمونه‌ی منی همبستگی مثبت و معنی داری نشان داد (جدول ۳).

۲- درصد اسپرم‌هاي زنده

نمونه‌ی DR_6 به طور معنی داری درصد اسپرم زنده کمتری نسبت به نمونه‌های CC_6 و AC_6 داشت. بین نمونه‌های CC_6 و CR_6 تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در بین نمونه‌های منی ۲۴ ساعت نگهداری شده، بیشترین درصد اسپرم زنده در نمونه‌ی CC_{24} (۷۵/۴) و کمترین آن در نمونه‌ی DR_{24} (۳۵/۹) مشاهده شد. درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های ۲۴ ساعت نگهداری شده در دمای اتاق نسبت به نمونه‌های ۲۴ ساعت نگهداری شده در یخچال، به طور معنی داری کمتر بود و فقط CR_{24} با BC_{24} تفاوت معنی داری نداشت. درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌های ۶ ساعت نگهداری شده به طور معنی داری کمتر از نمونه‌های بلافاصله تلقیح شده پس از رقیق کردن بود. درصد اسپرم‌های زنده با pH نمونه‌ی منی همبستگی مثبت و معنی داری نشان داد (جدول ۳).

1. Repeated measure ANOVA

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- تاثیر نوع رقیق کننده، زمان نگهداری و دمای نگهداری (نمونه‌ی منی) بر ویژگی‌های تولید مثلی خروس‌های بومی (میانگین ± انحراف معیار)

نمونه‌ی منی[1]	pH	میزان جنبایی اسپرم	اسپرم زنده (٪)	باروری (٪)	جوهه دهی کل (٪)	جوهه دهی نسبت به تخم‌های بارور (٪)
AC_0	ab ۷/۰۵±۰/۲۰	ab ۴/۴۷±۰/۴۱	a ۹۴/۳۵±۲/۸۶	ab ۹۳/۲۴±۲/۴۴	ab ۸۷/۳۰±۱۲/۱۷	a ۷۸/۱۱±۱۷/۲۷
AC_6	de ۶/۵۸±۰/۲۱	abcd ۳/۶۴±۰/۳۶	bcd ۸۳/۶۹±۲/۸۶	cd ۶۹/۰۹±۲/۱۸	abcde ۶۶/۱۰±۱۸/۲۸	a ۷۶/۴۴±۱۷/۰۰
AC_{24}	ef ۶/۴۵±۰/۱۶	cd ۲/۶۸±۰/۴۱	def ۷۱/۵۸±۲/۸۴	e ۳۴/۲۸±۴/۵۵	def ۳۳/۳۵±۶/۰۸	a ۷۸/۹۵±۱۵/۱۹
BC_0	ef ۶/۴۴±۰/۱۷	ab ۴/۴۷±۰/۴۱	a ۹۳/۹۹±۴/۶۷	ab ۹۰/۵۷±۴/۸۰	abcd ۷۳/۲۸±۳۰/۴۰	a ۶۶/۵۵±۲۶/۸۵
BC_6	ef ۶/۳۰±۰/۰۲	abc ۳/۹۲±۰/۴۶	bcde ۸۲/۵۵±۴/۳۹	cd ۶۸/۰۵±۴/۴۳	abcde ۷۳/۴۷±۱۱/۸۴	a ۸۶/۷۲±۱۰/۸۲
BC_{24}	f ۶/۱۸±۰/۰۵	cd ۲/۸۳±۰/۴۷	fg ۶۷/۴۶±۲/۰۶	e ۲۶/۸۸±۶/۳۹	ef ۲۸/۱۸±۶/۷۳	a ۸۴/۸۱±۹/۴۰
CC_0	a ۷/۳۳±۰/۰۵	a ۴/۶۱±۰/۴۸	a ۹۴/۴۵±۱/۸۹	a ۹۴/۶۰±۳/۴۳	a ۹۲/۹۰±۹/۷۵	a ۸۳/۰۵±۱۲/۶۵
CC_6	abc ۶/۹۹±۰/۱۰	abc ۳/۹۴±۰/۶۸	bc ۸۴/۷۸±۲/۷۳	bc ۷۷/۰۷±۴/۱۷	abc ۸۳/۴۶±۱۲/۲۱	a ۸۷/۵۲±۱۳/۹۰
CC_{24}	bcd ۶/۸۸±۰/۱۳	bcd ۳/۲۵±۰/۴۸	cdef ۷۵/۳۶±۲/۰۵	e ۴۰/۶۶±۴/۴۷	ef ۳۱/۶۴±۸/۷۶	a ۶۳/۸۱±۲۰/۱۱
CR_0	a ۷/۳۵±۰/۰۵	ab ۴/۴۷±۰/۴۱	a ۹۵/۵۷±۱/۲۰	a ۹۸/۷۲±۱/۲۲	a ۹۴/۶۷±۱۱/۹۳	a ۸۵/۴۶±۱۳/۷۵
CR_6	cde ۶/۶۲±۰/۰۲	abcd ۳/۵۱±۰/۲۶	cde ۸۰/۷۸±۲/۷۹	de ۵۱/۲۵±۴/۰۷	bcde ۴۹/۷۲±۱۳/۷۰	a ۷۹/۲۸±۲۳/۷۴
CR_{24}	bcd ۶/۹۱±۰/۳۴	e ۰/۸۱±۰/۵۴	g ۵۳/۰۳±۶/۹۸	fg ۱۴/۶۶±۲۳/۴۶	fg ۴/۵۶±۴/۳۴	ab ۳۲/۲۲±۴۳/۱۰
DR_0	a ۷/۳۱±۰/۱۶	a ۴/۶۱±۰/۴۸	ab ۹۱/۸۲±۳/۷۷	ab ۹۱/۴۴±۲/۸۹	abc ۷۵/۹۶±۲۴/۷۱	a ۷۳/۶۱±۲۷/۸۷
DR_6	f ۶/۱۰±۰/۰۳	d ۲/۴۳±۰/۲۷	ef ۷۱/۰۳±۳/۴۱	e ۴۰/۶۴±۳/۲۲	cdef ۳۵/۹۶±۱۳/۲۰	a ۷۰/۵۶±۲۴/۱۸
DR_{24}	g ۵/۲۷±۰/۲۰	e ۰	h ۳۵/۸۷±۴/۷۰	g ۱/۱۸±۲/۶۳	g ۰	b ۰

a, b, c, d, e, f, g, h: در هر ستون، میانگین هایی که حرف یا حروف همانند دارند، از نظر آماری تفاوت معنی دار ندارند (توکی، P>0.01)

۱-برای ویژگی نمونه ها، جدول ۱ را ببینید

جدول ۳- ضریب همبستگی* pH منی با درصد اسپرم زنده، جنبایی اسپرم، باروری و جوجه‌دهی در ماکیان بومی

	pH	تعداد
اسپرم زنده (٪)	۰/۷۱	۶۰
جنبایی	۰/۶۵	۶۰
باروری (٪)	۰/۶۷	۷۵
جوجه دهی کل (٪)	۰/۵۹	۷۵
جوجه دهی نسبت به تخم های بارور (٪)	۰/۳۸	۷۵

*: P< 0.0001

۳- باروري

بین نمونه‌های منی که بی‌درنگ تلقیح شدند، نمونه CR_0 (۹۸/۷) دارای بیشترین و نمونه BC_0 (۹۰/۶) دارای کمترین درصد باروری بود اما تفاوت بین باروری آنها معنی دار نبود. در نمونه‌های ۶ ساعت نگهداری شده، بیشترین درصد باروری در نمونه‌ی CC_6 (۷۷/۱) و کمترین آن، در نمونه‌ی DR_6 (۴۰/۷) مشاهده شد (P< 0.01). باروری نمونه‌های ۶ ساعت نگهداری شده در یخچال، به طور معنی داری بیشتر از نمونه‌های ۶ ساعت

Archive of SID

www.SID.ir

نگهداری شده در دمای اتاق بود. نمونه‌های منی که بی‌درنگ تلقیح شدند، نسبت به دیگر نمونه‌ها، بیشترین باروری را داشتند. نمونه‌های نگهداری شده برای ۶ ساعت، بجز نمونه‌ی CC_6، باروری کمتری نسبت به نمونه‌هایی داشتند که بی‌درنگ تلقیح شدند. اثر زمان نگهداری بر کاهش باروری در نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در یخچال بود. باروری، همبستگی بالایی با درصد اسپرم زنده، میزان جنبایی اسپرم و pH منی داشت (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۴- ضریب همبستگی* درصد اسپرم زنده و میزان جنبایی اسپرم با باروری و جوجه‌دهی در ماکیان بومی

	درصد اسپرم زنده	میزان جنبایی اسپرم	تعداد
باروری (٪)	۰/۹۲	۰/۸۹	۶۰
جوجه دهی کل (٪)	۰/۸۲	۰/۸۴	۶۰
جوجه دهی نسبت به تخم‌های بارور (٪)	۰/۵۶	۰/۶۳	۶۰

*: $P< 0.0001$

٤- درصد جوجه دهي کل

بیشترین درصد جوجه‌دهی کل در نمونه‌ی CR_0 (۹۸/۷) و کمترین آن در DR_{24} (صفر) مشاهده شد. نمونه‌ی CR_{24} به طور معنی داری درصد جوجه‌دهی کمتری نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در یخچال داشت. تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های CC_{24} و CR_{24} مشاهده نشد. با افزایش زمان نگهداری، درصد جوجه دهی کاهش یافت. نمونه‌های ۲۴ ساعت نگهداری شده در یخچال تفاوت معنی داری با نمونه‌های ۶ ساعت نگهداری شده، نداشتند اما نمونه‌های ۲۴ ساعت نگهداری شده در دمای اتاق، تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های ۶ ساعت نگهدای شده، داشتند. درصد جوجه‌دهی کل با درصد اسپرم زنده، میزان جنبایی اسپرم و pH منی همبستگی مثبت و معنی داری داشت (جدول‌های ۳ و۴).

٥- درصد جوجه دهي تخم مرغ‌هاي بارور

بین نمونه‌های منی رقیق شده، تنها درصد جوجه دهی DR_{24} به طور معنی داری کمتر از دیگر نمونه‌ها بود. اثر افزایش زمان نگهداری بر کاهش درصد جوجه‌دهی، معنی دار نبود. درصد جوجه‌دهی برای زمان‌های مختلف نگهداری نمونه منی، تفاوت معنی داری نشان نداد؛ نمونه‌های CC_6، BC_6، CR_0، BC_{24} و CC_0 به ترتیب، دارای بیشترین درصد جوجه دهی بودند. این فراسنجه با درصد اسپرم زنده، pH نمونه منی، و میزان جنبایی اسپرم همبستگی مثبت و معنی داری داشت (جدول‌های ۳ و ۴).

٦- pH نمونه‌هاي مني

با افزایش زمان نگهداری، pH نمونه‌های منی کاهش یافت. میزان کاهش pH در نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در یخچال بود. تفاوت pH نمونه‌ی CC_0 با CC_6 معنی دار نبود اما با CC_{24} معنی دار بود. نمونه‌ی AC_0 با AC_6 و AC_{24} تفاوت معنی داری نداشت اما تفاوت pH نمونه‌ی AC_6 و AC_{24} معنی‌دار بود. pH در نمونه‌ی DR با گذشت زمان به طور معنی داری کاهش یافت به طوری که pH نمونه‌های DR_0، DR_6 و DR_{24} تفاوت معنی داری داشتند.

بحث

بیشترین درصد باروری در نمونه‌هایی دیده شد که بی درنگ پس از رقیق شدن، تلقیح شدند. با افزایش زمان نگهداری، باروری کاهش یافت. تفاوت معنی داری در باروری نمونه‌های نگهداری شده در یخچال، بین رقیق‌کننده‌های A، B و C دیده نشد . به نظر می‌رسد که توان این ۳ رقیق کننده (جدول ۱) برای حفظ میزان باروری یکسان است. استفاده از رقیق کننده‌های C و D تفاوتی در باروری نمونه‌های نگهداری شده در اتاق، ایجاد نکرد. مقایسه‌ی باروری نمونه‌ی CC_6 با CR_6 و CC_{24} با CR_{24} نشان داد که باروری نمونه‌های نگهداری شده در اتاق، به طور معنی داری کمتر از نمونه‌های نگهداری شده در یخچال بود. ضریب همبستگی بالای باروری با درصد اسپرم‌های زنده (۰/۹۲) و میزان جنبایی اسپرم‌ها (۰/۸۹)، نشان داد که می‌توان با بررسی درصد اسپرم‌های زنده و یا میزان جنبایی اسپرم‌ها در نمونه‌های منی خروس‌های بومی، برآوردی از باروری نمونه، به دست آورد. باروری نیز همانند میزان جنبایی اسپرم‌ها و درصد اسپرم‌های زنده، در نمونه‌های بلافاصله تلقیح شده بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده برای ۶ و ۲۴ ساعت بود.

Archive of SID

www.SID.ir

باروری نمونه های دارای تغییرات کم pH، نسبت به نمونه های دارای تغییرات زیاد pH، بیشتر بودکه نشان دهنده‌ی اهمیت حفظ pH در خلال نگهداری نمونه‌ی منی رقیق شده است؛ هرچند که ضریب همبستگی بین درصد باروری و pH نشان می دهد که تغییرات pH اندکی کمتر از ۵۰ درصد واریانس‌های باروری و درصد اسپرم زنده را دربر می‌گیرد. با افزایش زمان نگهداری، pH نمونه‌های منی کاهش یافت که ناشی از تولید اسید لاکتیک به وسیله‌ی اسپرم است (۷). در نمونه‌هایی که تغییرات pH کمتری داشتند، تغییرات کمتری نیز در فراسنجه‌هایی که با pH همبستگی داشتند، مشاهده شد و انتظار می‌رود که نگهداری نمونه‌های منی در یخچال، موجب کاهش کمتری در pH شود. ویل کاکس (۲۰) نیز نشان داد که کاهش pH دردمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد کمتر بود.

با افزایش زمان نگهداری، تفاوت معنی داری در میزان جوجه‌دهی کل مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که نگهداری نمونه‌های منی در اتاق یا یخچال، تغییری دراین فراسنجه ایجاد نمی‌کند. می‌توان گفت که، با استفاده از هر ۴ رقیق کننده، درصد جوجه‌دهی کل، یکسان می‌ماند. زمان نگهداری، دمای نگهداری و نوع رقیق کننده، موجب تفاوت معنی داری در درصد جوجه‌دهی تخم مرغ‌های بارور، نشد. با توجه به همبستگی پایین درصد اسپرم‌های زنده و میزان جنبایی اسپرم با درصد جوجه‌دهی تخم مرغ‌های بارور، می‌توان گفت که، کاهش درصد اسپرم‌های زنده و میزان جنبایی اسپرم‌ها (در اثر زمان، دما و نوع رقیق کننده)، موجب کاهش معنی داری در درصد جوجه‌دهی نمی‌شود.

قدرت هر ۳ رقیق کننده در حفظ درصد اسپرم‌های زنده، یکسان بود. به هنگام نگهداری نمونه‌های منی در اتاق، کاهش درصد اسپرم زنده‌ی نمونه‌ی رقیق شده با رقیق کننده‌یC نسبت به نمونه‌ی رقیق شده با رقیق کننده‌ی D، کمتر بود و می‌توان گفت که هنگام نگهداری نمونه‌ها دردمای اتاق، درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌ی رقیق شده با رقیق کننده‌یC بالاتر از نمونه‌ی رقیق شده با رقیق کننده‌ی D خواهد بود. نمونه‌هایی که تغییرات pH کمتری در طول مدت نگهداری داشتند، درصد اسپرم‌های زنده بیشتری نیز داشتند.

یافته‌های باروری منی رقیق شده‌ی خروس‌های بومی در رقیق کننده‌ی بلتسویل، با نتایج دیگر پژوهشگران، هماهنگ است. برای نمونه، سکستون و فیولاس (۱۶) منی خروس‌های نژاد تخمگذار را با استفاده از رقیق کننده‌ی بلتسویل (به نسبت ۱:۴) در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری کردند. باروری برای نمونه‌ی بلافاصله تلقیح شده و نمونه‌ی ۲۴ ساعت نگهداری شده به ترتیب، ۸۷ و ۵۰ درصد بود. کلارک و همکاران (۷) منی خروس‌های نژاد گوشتی را با استفاده از همین رقیق کننده (به نسبت ۱:۵) در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری کردند؛ باروری پس از ۶ ساعت نگهداری اسپرم، ۷۵ درصد بود. وان‌ووست و لینس‌ترا (۱۹) منی خروس را با رقیق کننده ی بلتسویل (به نسبت ۱:۱) در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری کردند. همانند یافته های خروس های بومی فارس، درصد اسپرم‌های زنده و جنبایی اسپرم‌ها با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت. باروری و درصد اسپرم‌های زنده در نمونه‌ی بلافاصله تلقیح شده، همانند خروس‌های بومی‌فارس بود، اما پس از ۲۴ ساعت نگهداری، میزان باروری و درصد اسپرم‌های زنده (به ترتیب، ۶۵ و ۹۲ درصد) بیشتر از خروس‌های بومی فارس بود.

یافته‌های سکستون (۱۴) در خروس‌های نژاد تخمگذار نیز با یافته‌های این پژوهش هماهنگ است که درآن، باروری منی رقیق شده با رقیق کننده‌ی بلتسویل (به نسبت ۱:۲)، برای نمونه‌ی بلافاصله تلقیح شده و نمونه‌ی ۲۴ ساعت نگهداری شده در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب، ۸۵ و ۴۴ درصد بود. از سویی، کلارک و همکاران (۷) باروری منی رقیق شده‌ی خروس‌های نژاد تخمگذار در رقیق کننده‌ی بلتسویل (به نسبت ۱:۵) را پس از ۶ ساعت نگهداری، ۶۱ درصد گزارش کردند که بیشتر از باروری منی خروس‌های بومی، ۶ ساعت نگهداری شده دراین دما بود؛ به دلیل تفاوت‌های نژادی، مدیریت و نسبت رقیق کردن، این اختلاف منطقی به نظر می‌رسد. اما میزان جنبایی به دست آمده پس از ۶ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد همانند یافته‌های به دست آمده از خروس‌های بومی فارس بود. همانند یافته‌های این پژوهش، ویل کاکس (۲۱) نیز تفاوت معنی داری در جوجه دهی، در اثر رقیق کردن نمونه‌های منی مشاهده نکرد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری پایانی

۱- همه‌ی رقیق کننده‌های بررسی شده در این پژوهش، برای رقیق کردن منی خروس‌های بومی و تلقیح مصنوعی فوری، مناسب بودند؛ و دامنه‌ی تغییرات باروری آنها، بین ۹۱ تا ۹۹ درصد بود.

۲- بیشترین درصد باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دمای ۴ تا ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۶ ساعت (۷۷٪) و ۲۴ ساعت (۴۱٪) با رقیق کننده‌ی سکستون، به دست آمد. نگهداری اسپرم در سکستون برای ۶ ساعت و در دمای ۱۹ تا ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، موجب حفظ باروری به میزان ۵۰ درصد شد.

۳- هیچ یک از رقیق کننده‌ها برای نگهداری اسپرم در دمای ۱۹ تا ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، مناسب نبودند. در این شرایط، میزان باروری برای رقیق کننده‌ی سکستون، ۱۵ درصد و برای رقیق کننده‌ی چادهوری، ۱/۲ درصد بود.

۴- با توجه به همبستگی بالای باروری با میزان جنبایی اسپرم (۰/۸۹) و نیز با درصد اسپرم‌های زنده (۰/۹۲)، می‌توان برای ارزیابی باروری خروس‌های بومی، از میزان جنبایی و یا درصد اسپرم‌های زنده، بهره گرفت.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم معاونت امور دام و مرکز مطالعات مرغ بومی سازمان جهاد کشاورزی استان فارس، برای تامین مرغ و خروس و خوراک، سپاسگزاری می‌شود.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. اتچز، ر. ج. ۱۳۸۰. تولید مثل در پرندگان اهلی (برگرداننده: محمد جواد ضمیری). انتشارات دانشگاه شیراز، ۴۲۳ ص .

۲. پیترز، آ. ر.، و پ. جی. بال ۱۳۷۲. تولید مثل در گاو (برگرداننده: محمد جواد ضمیری) انتشارات دانشگاه شیراز. ص ۱۱۵-۱۱۲ .

۳. معمار، م و م. ج. ضمیری. ۱۳۸۴. پراکنش فصلی ویژگی‌های منی و باروری خروس‌های بومی فارس. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳۶، شماره ۳. ص ۵۹۰-۵۸۱

4. Bajpai, P.K. 1963. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. Poultry Sci. 42:462-465.
5. Bakst, M.R. 1980. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. J. Reprod. Fert. 60:121-127.
6. Blesbois, E. & M. de Reviers. 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the the fertilizing ability of fowl spermatozoa stored *in vitro*. J. Reprod. Fert. 95:263-268.
7. Clarke, R.N., T. J. Sexton, & M.A. Ottinger. 1982. Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility and fertility of chicken and turkey semen. Poultry Sci. 61:1912-1917.
8. Donoghue, A.M. & G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim. Reprod. Sci. 62:213-232.
9. Howarth, B., Jr. 1983. Comparison of diluents for holding cock semen six hours at 41^0C. Poultry Sci. 62:1084-1087.
10. Phillips, P.H. & H. A. Lardy. 1940. A yolk buffer pabulum for the preservation of bull semen. J. Dairy Sci. 23:399-404.
11. SAS. 1996. SAS/STAT Software: Changes and Enhancement Through Release 6.12 SAS Inst., Inc., Cary. NC.
12. Schindler, H., S. Weinstein, F. Moses, & I. Gabriel. 1955. The effect of various diluents and storage times on the fertilizing capacity of cock semen. Poultry Sci. 34:1113-1117.
13. Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender. 1: Effect of extension on the fertility capacity of chicken semen. Poultry Sci. 56:1443-1446.
14. Sexton, T.J. 1978. A new poultry semen extender. 3: Effect of storage conditions on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. Poultry Sci. 47:285-289.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Sexton, T.J. 1986. Comparison of commercial diluents for holding turkey semen 24 hours at 5°C. Poultry Sci. 67:131-134.
16. Sexton, T.J. & T.A. Fewlass. 1978. A new poultry semen extender. 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. Poultry Sci. 57:277-284.
17. Smyth, J.R., Jr. 1968. Poultry. In: Perry, F.J. (ed.), The Artificial Insemination of Farm Animals, 4th ed., Rutgers University, the State University of New Jersey, pp. 258-292.
18. Taneja, G.C. & R.S. Gowe. 1961. The effect of dosage of undiluted semen on fertility in two breeds of fowl. Br. Poult. Sci. 2:81-89.
19. Van Voorst, A. & F.R. Leenstra. 1995. Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. Poultry Sci. 74:141-146.
20. Wilcox, F.H. 1958a. Changes in the pH of semen of the domestic cock as affected by temperature and frequency of collection. Poultry Sci. 37:444-449.
21. Wilcox, F.H. 1958b. The effect of dilution and concentration of chicken semen on fertility. Poultry Sci. 37:1357-1362.

Archive of SID

www.SID.ir

An Evaluation of Several Semen Diluents for Storage Of Fars Native Chicken Sperm at 4-5 and 19-24 °C

M.J. ZAMIRI[1], M.R. HASHEMI[2] AND A. BOOSTANI[3]
Professor and Former Graduate Students, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
Accepted July. 7, 2004

SUMMARY

An experiment was conducted to investigate the effectiveness of several diluents for storing native chicken sperm at either 4-5 °C (Sexton; Van Wembeke; and Lake and Ravie diluents) or room temperature (19-24 °C) (Chaudhuri and Lake; and Sexton diluents). Seminal charactristics (% live sperm, sperm motility and pH) were determined immediately upon dilution (Time 0) and at 6 and 24 h after storage. An aliquot (0.2 ml) of diluted semen (1:2 ratio) stored at 0, 6 and 24 h was inseminated in the afternoon. Each hen was inseminated once a week for 5 weeks while eggs being collected for determination of fertilizability and hatchability. Diluent type, storage time, and storage temperature significantly affected sperm motility, % live sperm, pH, % fertile eggs and % hatchability of incubated eggs. Sperm motility, % live sperm, % fertile eggs and % hatchability were significantly higher for the semen stored at 4-5 °C as compared with storage at room temperature. Storage time adversely affected the parameters under investigation. All diluents were suitable for immediate insemination after dilution (91 to 99% fertlity), and the lowest fertility (1.2%) was found in hens inseminated with Chaudhuri and Lake's diluent stored for 24 h at room temperature. Fertility of diluted semen samples stored at 4-5 °C was higher than that of samples stored at room temperature. Compared with other diluents, Sexton resulted in higher fertility levels for the sperms that were stored at 4-5 °C for either 6 h (77%) or 24 h (41%). Correlation coefficients of sperm motility (or % live sperm) with % fertile eggs and % hatchability of incubated eggs were high (r=0.80 to 0.90) and significant (P<0.0001). The correlation coefficients of pH of diluted semen with sperm motility (r=0.65), % live sperm (0.71) and of fertility (r=0.67) were also significant (P<0.0001).

Key words: Sperm, Chicken, Diluent, Sperm storage temperature

Archive of SID

www.SID.ir