Iranian Journal of Animal Science
Vol 52, No 2, Summer 2021 (133-140)
DOI: 10.22059/ijas.2020.307142.653792

علوم دامی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۴۰۰ (ص ۱۴۰-۱۳۳)

مقاله پژوهشی:

اثر دمای منی رقیق‌شده و غلظت اسپرم بر نرخ نفوذ اسپرم، باروری و جوجه‌درآوری مرغ‌های مادر گوشتی مسن

حسین شریده[۱و۲*]، مجتبی زاغری[۳] و سید جعفر میربهبهانی[۲]
۱. پژوهش‌گر شرکت سهامی مزرعه نمونه (خاص)، سازمان اتکا
۲ و ۳. دانش‌آموخته دکتری رشته فیزیولوژی دام و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۲- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۲)

چکیده

هدف از این پژوهش بهینه‌سازی تلقیح مصنوعی در مرغ‌های مادر گوشتی مسن در قالب دو آزمایش بود. در آزمایش نخست، اثر دو دمای متفاوت منی رقیق‌شده (۵ و ۲۵ درجه سلسیوس) خروس هوبارد (۴۰ خروس، سن ۵۸ هفته) بر باروری، جوجه درآوری و نرخ نفوذ اسپرم (SP) به لایه فراویتلین مرغ هوبارد (۱۸۰ مرغ، سن ۵۸ هفته) بررسی شد. در آزمایش دو، سه غلظت متفاوت اسپرم (۱۰۰ (C100)، ۲۰۰ (C200) و ۴۰۰ (C400) میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر (به‌ازای هر مرغ)، از خروس‌های هوبارد (۴۰ خروس، سن ۶۲ هفته) بر باروری، جوجه درآوری و SP در ۲۷۰ مرغ بررسی شد. در آزمایش نخست، یافته‌ها نشان دادند دمای ۵ درجه سلسیوس منی رقیق‌شده نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس سبب افزایش درصد جوجه‌درآوری کل، جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و SP و کاهش مرگ و میر جنینی اولیه شد. یافته‌های آزمایش دو نشان دادند، بیشترین درصد باروری و SP در تیمار C400 گزارش شد. همچنین در این آزمایش بیشترین جوجه‌درآوری کل و جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و کمترین میزان مرگ و میر جنینی اولیه در تیمارهای C200 و C400 گزارش شد. نسبت هزینه به فایده برای تیمارهای C200 و C400 به‌ترتیب تقریباً برابر است با ۲/۹ و ۱/٤ محاسبه شد. به طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان دادند که برای بهینه‌سازی تلقیح مصنوعی در مرغ‌های مسن (با توجه به نسبت هزینه به فایده و جوجه‌درآوری) می‌توان از غلظت تلقیحی ۲۰۰ تا ٤۰۰ میلیون در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ در دمای ۵ درجه سلسیوس استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: **باروری، دمای رقیق‌کننده، خروس، جوجه درآوری، نرخ نفوذ اسپرم.**

Effect of diluted semen temperature and sperm concentration on sperm penetration rate, fertility and hatchability of aged broiler breeder hens

Hossein Sharideh[1*], Mojtaba Zaghari[3] and Seyed Jafar Mirbehbahani[2]
1. Researcher of ETKA Organization
2. Ph.D. Graduate in Animal Physiology and Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 2, 2020 – Accepted: Oct. 13, 2020)

ABSTRACT

The current study aimed to optimize artificial insemination in aged broiler breeder hens in two experiments. In the first experiment, the effect of (two) different diluted semen temperatures (5 and 25 °C) of Hubbard rooster (40 roosters, 58 weeks of age) on fertility, hatchability and sperm penetration (SP) rate in the perivitelline layer of Hubbard hen (180 hens) were investigated. In the second experiment, three (different) sperm concentrations (100 (C100), 200 (C200), and 400 (C400) million sperm in 0.25 mL per hen) of Hubbard roosters (40 roosters, 62 weeks of age) on fertility, hatchability and SP rate of Hubbard broiler breeder hens (270 hens) were explored. In the first experiment, the results showed that the temperature of 5 °C of diluted semen compared to the 25 °C, increased percentage of hatchability of set eggs, hatchability of fertile eggs, and SP and decreased early embryonic mortality. The results of the second experiment showed the highest percentage of fertility and SP rate were observed at treatment C400. Also, in this experiment that highest percentage of hatchability of set eggs and hatchability of fertile eggs and lowest early embryonic mortality were observed at treatment C400. Return on investment (ROI) of the treatments C200 and C400 was approximately 2.9 and 1.4, respectively. In overall, the results of this study showed that (in attention to ROI and hatchability) to optimize artificial insemination of aged broiler breeder hens we can use a sperm concentration of 200 to 400 million in 0.25 mL per hens at 5 °C.

Keywords: Fertility, Extender temperature, Rooster, Hatchability, Sperm penetration.

* Corresponding author E-mail: hosseinsharideh@ut.ac.ir or hosseinsharideh@yahoo.com

مقدمه

انتخاب ژنتیکی در لاین مولد جوجه‌های گوشتی برای بهبود بسیاری از ویژگی‌های ارثی مانند وزن بدن، بازده عضلات سینه و بازدهی مصرف خوراک با موفقیت روبرو بوده است (Hocking, 1990; Sharideh *et al.*, 2016a). اما این موفقیت با افزایش طول عمر و عملکرد تولید مثلی به ویژه در اواخر دوره تولید، همبستگی مثبتی ندارد (Sharideh *et al.*, 2016b). کاهش باروری از سن ۴۵ هفتگی گله‌ها به سازه‌های گوناگونی مانند کاهش وزن بیضه، تولید اسپرم و مقدار تستوسترون خون خروس‌ها بستگی دارد (Sarabia Fragoso *et al.*, 2013). همچنین ازآنجاکه خروس‌ها اضافه وزن پیدا می‌کنند، جفت‌گیری کم و ناقص خروس‌ها با مرغ‌ها ممکن است سبب کاهش باروری شود (Hocking & Bernard, 2000; Vizcarra *et al.*, 2010; Sarabia Fragoso *et al.*, 2013).

تلقیح مصنوعی پیش از سن ۴۵ هفتگی در گله‌های مادر گوشتی به علت اینکه با جفت‌گیری طبیعی، باروری بهینه به دست می‌آید، مطلوب نیست (Bakst & Dymond, 2013; Sarabia Fragoso *et al.*, 2013). برای غلبه بر کاهش باروری در گله‌های پیر، خروس‌های جوان به گله‌ها وارد می‌شوند. اما به‌علت شیوع برخی از بیماری‌ها مانند آنفولانزا در برخی فصول ویژه، ورود خروس جوان[1] ممکن است برای گله‌های مرغ مادر گوشتی خطرناک باشد. به نظر می‌رسد با تلقیح مصنوعی در اواخر دوره تولید، خطر امنیت زیستی مربوط به ورود خروس‌های جوان برطرف می‌شود (Bakst & Dymond, 2013). در صنعت ماکیان مانند بوقلمون، به علت اینکه بوقلمون‌های نر به دلیل سنگینی توانایی انتقال منی به جنس ماده طی جفت‌گیری را ندارند، تلقیح مصنوعی در این صنعت گسترش یافته است (Long & Kramer, 2003; Long & Conn, 2012). همچنین در لاین‌های اجداد مانند هوبارد به علت اینکه خروس‌ها برخلاف مرغ‌ها کوتاه قد هستند توانایی جفت‌گیری با مرغ‌ها را ندارند، بنابراین از تلقیح مصنوعی در این لاین استفاده می‌شود.

طبق یافته‌های حاصل از پژوهش‌های پیشین، اثر دمای نگه‌داری منی رقیق‌شده در شرایط سرد (۴ تا ۵ درجه سلسیوس) و محیط (۲۵ درجه سلسیوس) بر کیفیت اسپرم طی گذشت زمان بررسی شد (Sharideh *et al.*, 2019; Vasicek *et al.*, 2015; Zamiri *et al.*, 2005). این پژوهش‌ها به خوبی نشان دادند که طی گذشت زمان کیفیت اسپرم در دمای محیط نسبت به دمای سرد کم‌تر شد، اما دمای مناسب منی رقیق‌شده در زمان تلقیح مصنوعی فوری (به استثنای مطالعه Sexton (1977) که فقط بر درصد باروری انجام شد) بررسی نشده است. در پژوهش Moghbeli *et al.* (2016) که اثر غلظت اسپرم در حضور آنتی‌اکسیدان‌های کاتالاز و ویتامین E بر کیفیت و باروری اسپرم خروس پس از فرآیند انجماد-ذوب بررسی شد. آنها نشان دادند که هر چند کیفیت اسپرم با افزایش غلظت اسپرم کم می‌شود اما باروری مرغ‌ها تحت تاثیر غلظت اسپرم (پس از فرآیند انجماد-ذوب) قرار نگرفت و اثر غلظت اسپرم در تلقیح مصنوعی فوری بر باروری مرغ‌های مادر گوشتی بررسی نشد.

توان باروری منی رقیق نشده خروس‌ها، طی یک ساعت انباشت، کاهش می‌یابد (Sharideh *et al.*, 2019). مصرف مواد مغذی منی (مانند فروکتوز و گلوکز) و تولید متابولیت‌های دفعی (اسید لاکتیک) به وسیله اسپرم‌ها سبب کاهش pH منی و در نهایت آسیب به اسپرم‌ها می‌شوند. همچنین اکسیداسیون چربی غشای اسپرم به علت افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن سبب آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم و از بین رفتن اسپرم‌ها می‌شود (Sexton, 1977). بنابراین، منی خروس تا زمان تلقیح، باید در رقت مناسب در محیطی با فشار اسمزی و قدرت بافری بهینه همراه با منبع انرژی در بهترین دما نگه‌داری شود. با توجه به این‌که، تاکنون پژوهشی به منظور بررسی اثر دمای منی رقیق‌شده و غلظت اسپرم بر درصد باروری، جوجه‌درآوری و مرگ و میر جنینی و همچنین نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین در تلقیح مصنوعی فوری مرغ‌های مادر گوشتی مسن انجام نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی دمای منی رقیق‌شده (در زمان تلقیح مصنوعی فوری) و غلظت‌های متفاوت اسپرم برای بهینه‌سازی تلقیح مصنوعی در مرغ‌های مادر گوشتی مسن در نظر گرفته شد.

1. Spiking

مواد و روش‌ها

آزمایش نخست

هدف از این پژوهش بررسی دو دمای متفاوت (۵ و ۲۵ درجه سلسیوس) منی رقیق‌شده بر درصد باروری، جوجه درآوری و نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلن بود. این آزمایش در مزرعه پرورش مرغ مادر گوشتی شرکت سهامی مزرعه نمونه (خاص) گرگان، طراحی و اجرا شد. برای جمع‌آوری و رقیق‌کردن منی ۴۰ قطعه خروس مادر گوشتی هوبارد (سن ۵۸ هفته) به کار برده شد. خروس-هایی که حداقل حجم منی (۰/۲ میلی لیتر) و حداقل غلظت اسپرم (۳ میلیارد در یک میلی‌لیتر منی) و درصد جنبایی کل اسپرم بیشتر از ۷۰ درصد داشتند، گزینش شدند. اسپرم‌گیری از خروس به روش غیرتهاجمی که به-وسیله باروس و کوئین گزارش شد، انجام شد (Burrows & Quinn, 1937). پس از رقیق کردن منی (۴۰۰ میلیون در هر میلی‌لیتر رقیق‌کننده، درصد جنبایی و زنده‌مانی به‌ترتیب بالای ۷۰ درصد و ۸۰ درصد) در رقیق‌کننده بلستویل[1] (۸/۶۷ گرم سدیم ال-گلوتامات، ۴/۳۰ گرم سدیم استات سه آبه، ۰/۶۲ گرم پتاسیم سیترات تری‌بازیک یک آبه، ۰/۳۴ گرم منیزیم کلراید، ۱۲/۷ گرم هیدروژن فسفات پتاسیم دی‌بازیک، ۰/۶۵ گرم هیدروژن فسفات منوبازیک، ۱/۹۵ گرم N- تریس (هیدروکسی متیل) متیل-۲- آمینواتان سولفونیک اسید (TES) و ۵ گرم فروکتوز در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند؛ pH و فشار اسموزیه (میلی‌اسمول/ کیلوگرم) به‌ترتیب برابر است با ۷/۵ و ۳۵۰) یک بخش منی رقیق‌شده بی‌درنگ با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مرغ‌ها تلقیح و بخش دیگر منی رقیق‌شده با دمای ۵ درجه سلسیوس به سایر مرغ‌ها تلقیح شد. برای بررسی درصد باروری، جوجه‌درآوری و نرخ نفوذ اسپرم منی رقیق‌شده در دو دما از ۹۰ قطعه مرغ هوبارد (فلکس، سن ۵۸ هفته) به‌ازای هر دما (پس از دو هفته پیاپی تلقیح مصنوعی) استفاده شد.

مرغ‌ها و تلقیح مصنوعی

برای انجام آزمایش نخست، از گله تجاری مرغ مادر گوشتی فلکس هوبارد در سن ۵۸ هفتگی، ۱۸۰ قطعه مرغ مادر گوشتی گزینش و به ۶ جایگاه آزمایشی منتقل شدند. آزمایش روی بستر انجام شد. در هر جایگاه آزمایشی ۳۰ قطعه مرغ قرار گرفت. واحدهای آزمایشی به ابعاد ۲ × ۳ متر و مجهز به دانخوری ناودانی زنجیره‌ای، آبخوری سرپستانکی و سه لانه تخم‌گذاری بودند. آب مصرفی به شیوه آزاد در اختیار مرغ‌ها قرار گرفت. برنامه نوری نیز به شیوه ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت خاموشی اعمال شد. توزیع خوراک ۲۰ دقیقه پس از شروع روشنایی انجام شد. میزان مصرف خوراک بر اساس وزن بدن و توصیه برنامه پرورشی مرغ مادر گوشتی هوبارد تنظیم شد. مرغ‌های هر تیمار پس از دو هفته عادت‌دهی به شرایط جدید، در سن ۶۱ و ۶۲ هفتگی تلقیح مصنوعی شدند. مرغ‌ها با غلظت ۱۰۰ میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ هفته‌ای یکبار بعد از ظهر تلقیح مصنوعی شدند (Sharideh *et al.*, 2020). نحوه نگهداری و مهار مرغ به هنگام تلقیح مصنوعی بدین نحو است که با فشار دادن با دو دست پیرامون و بخش پشتی بدن پرنده، ناحیه واژن را آشکار و با وارد کردن سرنگ دارای اسپرم تا عمق سه تا چهار سانتی‌متر به‌وسیله شخص دیگر، منی در محل نزدیک به لوله‌های ذخیره اسپرم تخلیه شد. در این زمان فشار وارده بر نواحی شکمی و دمی قطع می‌شود.

درصد باروری و جوجه‌درآوری

تخم‌مرغ‌ها از دومین روز نخستین تلقیح مصنوعی تا انتهای هفته ۶۲ جمع‌آوری شدند. به منظور خنک‌سازی صحیح تخم‌مرغ‌ها تا دمای پیشنهاد شده (۱۸ درجه سلسیوس)، تخم‌مرغ‌ها روزانه پنج بار جمع‌آوری شدند. تخم‌مرغ‌های سالم، بدون آلودگی و یک زرده نگه‌داری شدند. برای ضدعفونی کردن تخم‌مرغ‌ها بعد از هر جمع‌آوری از گاز فرمالدهید استفاده شد. هر هفته، تخم‌مرغ‌ها به جوجه‌کشی مزرعه نمونه برده شد. برای بررسی درصد باروری و جوجه‌درآوری، پس از ۲۱ روز، جوجه‌های در آمده از تخم‌مرغ هر تیمار شمرده شد و تخم‌مرغ که جوجه از آنها بیرون نیامده شکسته شد و وضعیت آنها یاداشت شد (Moghbeli *et al.*, 2016).

1. Beltsville

$$\text{درصد باروری} = \frac{\text{تخم‌مرغ‌های بارور}}{\text{کل تخم‌مرغ‌ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد جوجه‌درآوری کل} = \frac{\text{جوجه‌های زنده}}{\text{کل تخم‌مرغ‌ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور} = \frac{\text{جوجه‌های زنده}}{\text{تخم‌مرغ‌های بارور}} \times ۱۰۰$$

نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین

برای شمارش نرخ نفوذ اسپرم، از هر تکرار هشت تخم‌مرغ در روز سه پس از هر تلقیح مصنوعی جمع‌آوری و استفاده شد (Bramwell *et al.*, 1995; Sharideh *et al.*, 2016a). نحوه رنگ‌آمیزی لایه فراویتلین و شمارش منافذ بدین صورت است که زرده تخم‌مرغ کاملاً از سفیده جدا شد. سپس زرده تخم‌مرغ حداقل ۵ دقیقه در محلول آب نمک یک درصد غوطه‌ور شد. پس از آن لایه زاینده به ابعاد یک در یک سانتی‌متر بریده و لایه زاینده جدا شد و با محلول بافر فسفات نمکی[1] (PBS) شستشو و روی لام تمیز گسترش داده شد. سپس آب اضافی با دستمال پاک شد و چند قطره فرمالین ۱۵ درصد به گسترش چکانده شد. پس از ۲۰ ثانیه چکاندن فرمالین ۱۵ درصد، چند قطره از محلول رنگی فوشین چکانده شد چنانچه تمام سطح گسترش را پوشش دهد. بعد از رنگ گرفتن گسترش با رنگ فوشین، رنگ اضافی با دستمال پاک شده و در محیط آزمایشگاه خشک شد. در نهایت اسلاید را با عدسی شیئ ۴× و با بزرگنمایی کل ۴۰× مشاهده شد و شمار سوراخ‌ها در مرکز لایه زاینده (در میدان دیدی که بیشترین منافذ اسپرم وجود داشت؛ در مساحت ۱۵/۸۹ میلیمتر مربع) شمارش شد (Bramwell *et al.*, 1995; Sharideh *et al.*, 2016a).

آزمایش دو

هدف از این آزمایش بررسی اثر غلظت‌های اسپرم (۱۰۰ (C100)، ۲۰۰ (C200) و ۴۰۰ (C400) میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ) بر درصد باروری، جوجه درآوری و نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلن بود. این آزمایش نیز در مزرعه پرورش مرغ مادر گوشتی شرکت سهامی مزرعه نمونه (خاص) گرگان طراحی و اجرا شد. برای جمع‌آوری منی و رقیق کردن مخلوط منی از ۴۰ قطعه خروس هوبارد (سن ۶۲ هفته) استفاده شد. برای بررسی نرخ‌های باروری، جوجه‌درآوری و میزان نفوذ اسپرم رقیق‌کننده‌ها در سه غلظت اسپرم از ۹۰ قطعه مرغ هوبارد (فلکس، سن ۶۲ هفته) به‌ازای هر تیمار آزمایشی برای ۴ هفته استفاده شد.

مرغ‌ها و تلقیح مصنوعی

برای انجام آزمایش دو، از گله تجاری مرغ مادر گوشتی فلکس هوبارد، ۲۷۰ قطعه مرغ مادر گوشتی در سن ۶۲ هفتگی، انتخاب و به ۹ جایگاه آزمایشی منتقل شدند. آزمایش روی بستر انجام شد. شرایط این آزمایش همانند آزمایش نخست بود. همه‌ی مرغ‌های هر تیمار طی ۶۴ تا ۶۶ هفتگی، هفته‌ای یکبار تلقیح مصنوعی شدند. تلقیح مرغ‌ها با غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ هفته یکبار، بعد از ظهر انجام شد.

درصد باروری و جوجه‌درآوری

برای محاسبه درصد باروری و جوجه‌درآوری، پس از ۲۱ روز، جوجه‌های در آمده از تخم‌مرغ هر تیمار شمرده شد و تخم‌مرغ‌هایی که جوجه از آنها بیرون نیامد، شکسته شدند و وضعیت آنها یاداشت گردید.

نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین

برای شمارش منافذ نفوذ اسپرم، از هر تکرار هشت تخم‌مرغ در روز ۳ بعد از هر تلقیح مصنوعی جمع‌آوری شد. نحوی تهیه محلول رنگی و شمارش منافذ اسپرم همانند آزمایش نخست بود (Bramwell *et al.*, 1995; Sharideh *et al.*, 2016a).

واکاوی داده‌ها

به‌ازای هر تیمار سه تکرار (سه قفس در هر کدام ۳۰ قطعه مرغ) در نظر گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 (SAS Institute, 2002) و رویه‌های GLM (داده‌های نفوذ اسپرم)، GENMOD

1. Phosphate buffered saline

(داده‌های باروری و جوجه‌درآوری) و CORR (جهت بررسی ضریب همبستگی بین نفوذ اسپرم، باروری، جوجه‌درآوری و مرگ و میر اولیه جنینی) مورد واکاوی آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها در آزمایش یک با استفاده از گزاره CONTRAST مورد مقایسه قرار گرفتند. در آزمایش دو، به منظور مقایسه میانگین داده‌های مربوط به نفوذ اسپرم و باروری (جوجه‌درآوری) به‌ترتیب از آزمون‌های توکی و کی‌دو[1] (X^2) استفاده شد. سطح معنی‌داری میانگین‌ها در $P\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد. مدل‌های آماری طرح به شرح زیر بود.

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

y_{ij}: مقدار عددی هر مشاهده، μ: میانگین کل، T_i: اثرتیمار (i=1, 2, 3)، e_{ij}: اثر اشتباه آزمایش.

برای برآورد اثر اقتصادی غلظت اسپرم بر جوجه‌درآوری کل، نسبت هزینه به فایده[2] (ROI) به عنوان شاخص سودآوری یک سرمایه گذاری در نظر گرفته شد. برای محاسبه ROI، سود یک سرمایه‌گذاری تقسیم بر هزینه سرمایه‌گذاری، به صورت درصد یا نسبت گزارش شد (Zaghari *et al.*, 2017).

نتایج و بحث

آزمایش نخست

در آزمایش نخست، یافته‌ها نشان دادند که دمای ۵ درجه سلسیوس منی رقیق‌شده نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس تقریباً به‌ترتیب ۶/۲ درصد، ۷/۲ درصد و ۷/۵ درصد جوجه‌درآوری کل، جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین را افزایش داد (جدول ۱). در پژوهش سکستون (۱۹۹۷) که اثر رقیق-کننده بلستویل بر باروری مرغ‌های تخم‌گذار لگهورن بررسی شده بود (درصد هچ جوجه‌ها و نرخ نفوذ اسپرم در پژوهش او بررسی نشد)، گزارش داد که رقیق‌کردن منی با رقیق‌کننده بلستویل در دمای ۵ درجه سلسیوس باروری بیشتری نسبت به دمای ۲۵ درجه سلسیوس داشت (Sexton, 1977). در پژوهش‌های انجام‌شده بر اسپرم پستانداران نشان داده شده است که یکی از راه‌های پیشنهادی برای کاهش رشد باکتری‌ها در رقیق‌کننده منی کاهش دمای رقیق‌کننده تا ۵ درجه سلسیوس بود (Waberski *et al.*, 2019). گزارش شده است که استفاده طولانی‌مدت از رقیق‌کننده‌های دارای آنتی‌بیوتیک منجر به مقاومت آنتی‌بیوتکی و باکتریایی شد (Schulze *et al.*, 2020; Weitze, 2019). در آزمایش نخست در پژوهش کنونی، به خوبی نشان داده شد که سرد کردن رقیق‌کننده تا دمای ۵ درجه سلسیوس برخلاف باور اشتباه برخی از پژوهش‌گران نه تنها درصد باروری مرغ‌ها را کم نکرد بلکه درصد جوجه‌درآوری و نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین تخم‌مرغ‌ها را افزایش داد. بنابراین کاهش دمای منی رقیق‌شده تا ۵ درجه سلسیوس طی تلقیح مصنوعی می‌تواند علاوه بر کاهش رشد باکتری‌ها، منجر به افزایش درصد جوجه‌درآوری و کاهش مرگ و میر اولیه جنینی (جدول ۲) شود و این روش می‌تواند یکی از روش‌های بهینه‌سازی تلقیح مصنوعی در مرغ‌های مادر گوشتی مسن باشد.

آزمایش دو

یافته‌های آزمایش دو، بیشترین درصد باروری و نرخ نفوذ اسپرم در تیمار C400 را نشان دادند. همچنین در این آزمایش بیشترین جوجه‌درآوری کل و جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و کمترین میزان مرگ و میر جنینی اولیه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ گزارش شد (جدول ۳). غلظت اسپرم، اثر معنی‌دار بر نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین داشت چنانچه کمترین و بیشترین شمار منافذ اسپرم در غلظت‌های ۱۰۰ و ۴۰۰ میلیون اسپرم در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ مشاهده شد (جدول۳). لقاح موفقیت‌آمیز با غلظت اسپرم، جنیایی پیشرونده اسپرم و همچنین یکپارچگی و عملکرد غشایی پلاسمایی اسپرم ارتباط تنگاتنگی داشت (Meyer *et al.*, 1980; Bramwell *et al.*, 1995; Das *et al.*, 2006). گزارش شده است که شمار اسپرم‌های نفوذ یافته به غشای فراویتلین با اسپرم‌های ذخیره شده در در لوله‌های ذخیره اسپرم[3] (SST) همبستگی مثبتی داشت (Donoghue, 1996; Sharideh *et al.*, 2016a).

1. Chi-square test
2. Return on investment
3. Sperm storage tubules (SST)

جدول ۱. اثر دمای منی رقیق‌شده (۵ و ۲۵ درجه سلسیوس) بر باروری، جوجه‌درآوری کل، جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و نفوذ اسپرم به لایه فرویتلین پس از تلقیح مصنوعی مرغ‌ها در آزمایش یک

Table 1. Effect of diluted semen temperature (5 and 25 ℃) on fertility, hatchability of fertile eggs set hatchability of eggs set (%) and sperm penetration (SP) in the inner perivitelline layer after artificial insemination of hens in experiment 1

Temperature (℃)	Traits			
	Fertility,[1] %	Hatchability of fertile eggs set,[1] %	Hatchability of eggs set,[1] %	SP (Log_{10}+1)
25	83.05 (1.38 to 1.81)	83.36 (1.38 to 1.85)[b]	69.24 (0.64 to 0.99)[b]	2.41[b]
5	83.76 (1.45 to 1.78)	88.58 (1.82 to 2.24)[a]	74.20 (0.89 to 1.17)[a]	2.59[a]
SEM	-	-	-	0.05
P value	0.73	0.01	0.04	0.05

۱. میانگین تخمین زده شده به عنوان درصد با ۹۵ درصد حدود اطمینان داخل کمان‌ها نشان داده شده است.

a و b) حروف غیرمتشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی هستند (*P* < ۰/۰۵).

1. The estimated mean as a percentage with 95% confidence interval shown in the parentheses.
a, b) Different letters in columns represent significant differences between the experimental groups (*P* < 0.05).

جدول ۲. اثر دمای منی رقیق‌شده (۵ و ۲۵ درجه سلسیوس) بر مرگ و میر جنینی در اوایل (۰-۶ روزگی)، اواسط (۷-۱۳ روزگی) و اواخر (۱۴-۲۱ روزگی) دوره جنینی پس از تلقیح مصنوعی مرغ‌ها در آزمایش یک

Table 2. Effect of diluted semen temperature (5 and 25 ℃) on embryonic mortality in early (0-6 days), mid (7-13 days) and late (14-21 days) embryonic periods after artificial insemination of hens in experiment 1

Temperature (℃)	Traits		
	Embryonic mortality (0-6 days),[1] %	Embryonic mortality (7-13 days),[1] %	Embryonic mortality (14-21 days),[1] %
25	4.00 (-3.61 to -2.79)[a]	3.68 (-3.78 to -2.88)	8.97 (-2.59 to -2.04)
5	1.83 (-4.43 to -3.52) [b]	3.18 (-3.76 to -3.06)	6.64 (-2.92 to -2.42)
P value	< 0.01	0.58	0.06

۱. میانگین تخمین زده شده به عنوان درصد با ۹۵ درصد حدود اطمینان داخل کمان‌ها نشان داده شده است.

a و b) حروف غیرمتشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی هستند (*P* < ۰/۰۵).

1. The estimated mean as a percentage with 95% confidence interval shown in parentheses.
a, b) Different letters in columns represent significant differences between the experimental groups (*P* < 0.05).

جدول ۳. اثر غلظت اسپرم (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیون به‌ازای هر مرغ) بر باروری، جوجه‌درآوری کل، جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین پس از تلقیح مصنوعی مرغ‌ها در آزمایش دو

Table 3. Effect of sperm concentration (100, 200, 400 million per hen) on fertility, hatchability of fertile eggs set hatchability of eggs set (%) and sperm penetration (SP) in the inner perivitelline layer after artificial insemination of hens in experiment 2

Sperm concentration (million per hen)	Traits			
	Fertility,[1] %	Hatchability of fertile eggs set,[1] %	Hatchability of eggs set,[1] %	SP (Log_{10}+1)
100	77.96 (1.09 to 1.46)[c]	82.69 (1.32 to 1.78)[b]	64.46 (0.43 to 0.75)[b]	2.43[c]
200	83.81(1.43 to 1.86)[b]	88.61 (1.78 to 2.33)[a]	74.24 (0.88 to 1.24)[a]	2.64[b]
400	87.74 (1.72 to 2.20)[a]	89.70 (1.88 to 2.44)[a]	78.70 (1.11 to 1.49)[a]	2.84[a]
SEM	-	-	-	0.031
P value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

۱. میانگین تخمین زده شده به عنوان درصد با ۹۵ درصد حدود اطمینان داخل کمان‌ها نشان داده شده است.

a و b) حروف غیرمتشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی هستند (*P* < ۰/۰۵).

1. The estimated mean as a percentage with 95% confidence interval shown in parentheses.
a, b) Different letters in columns represent significant differences between the experimental groups (*P* < 0.05).

جدول ۴. اثر غلظت اسپرم (۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیون به‌ازای هر مرغ) بر بر مرگ و میر جنینی در اوایل (۰-۶ روزگی)، اواسط (۷-۱۳ روزگی) و اواخر (۱۴-۲۱ روزگی) دوره جنینی پس از تلقیح مصنوعی مرغ‌ها در آزمایش دو

Table 4. Effect of sperm concentration (100, 200, 400 million per hen) on embryonic mortality in early (0-6 days), mid (7-13 days) and late (14-21 days) embryonic periods after artificial insemination of hens in experiment 2

Sperm concentration (million per hen)	Traits		
	Embryonic mortality (0-6 days),[1] %	Embryonic mortality (7-13 days),[1] %	Embryonic mortality (14-21 days),[1] %
100	5.69 (-3.13 to -2.48)[a]	4.19 (-3.50 to -2.74)	7.49 (-2.80 to -2.22)
200	3.72 (-3.68 to -2.84)[ab]	2.58 (-4.16 to -3.14)	5.33 (-3.22 to -2.52)
400	2.58 (-4.35 to -3.18)[b]	2.25 (-4.31 to -3.24)	5.80 (-3.12 to -2.44)
P value	0.008	0.09	0.25

۱. میانگین تخمین زده شده به عنوان درصد با ۹۵ درصد حدود اطمینان داخل کمان‌ها نشان داده شده است.

a و b) حروف غیرمتشابه در ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی هستند (*P* < ۰/۰۵).

1. The estimated mean as a percentage with 95% confidence interval shown in parentheses.
a, b) Different letters in columns represent significant differences between the experimental groups (*P* < 0.05).

گزارش شده است که غلظت بالاتر دوز تلقیح با بهبود باروری (Donoghue, 1996) و زنده‌مانی جنین (Meyer *et al.*, 1980) ارتباط داشت. در پژوهش کنونی، مشاهده شد که با افزایش غلظت اسپرم تلقیح شده به مرغ‌ها مرگ و میر اولیه جنینی کاهش پیدا کرد (جدول ۴). پژوهش‌های گوناگونی که بر بوقلمون انجام شده بود، نشان دادند که افزایش مرگ و میر اولیه رویانی با نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین ارتباط داشت (Sexton, 1988; Donoghue, 1996; Christensen *et al.*, 2005). Eslick & McDaniel (1992) گزارش کردند که غلظت اسپرم در تلقیح مرغ‌های مادر گوشتی با زنده‌مانی رویان در ارتباط است. آن‌ها گزارش کردند هر چند که مرگ و میر وسط و اواخر دوره جنینی تحت تأثیر غلظت اسپرم تلقیحی قرار نگرفت اما با کاهش غلظت اسپرم تلقیح شده به مرغ، مرگ و میر اولیه رویان (۱-۷ روز) به طور قابل توجهی افزایش یافت. در پژوهش کنونی، مشاهده شد که افزایش غلظت اسپرم تلقیح شده به مرغ‌ها نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین را افزایش داد و ضریب همبستگی نرخ نفوذ اسپرم به لایه فراویتلین با درصد باروری، جوجه‌درآوری کل، جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های بارور و مرگ و میر اولیه جنینی به‌ترتیب ۰/۴۲، ۰/۸۰، ۰/۷۷ و ۰/۵۸- شد ($P\leq$۰/۰۵). در نتیجه، یکی از راه‌های بدست آوردن درصد باروری و جوجه‌درآوری بهینه افزایش غلظت اسپرم (آزمایش دو) و یا کیفیت اسپرم تلقیحی (آزمایش نخست) است.

در آزمایش دو، جوجه‌درآوری‌کل تیمارهای C200 و C400 نسبت C100 معنی‌دار شد. تنها تفاوت هر سه تیمار (در مزرعه پرورش مرغ مادر گوشتی) در شمار خروس‌هایی که نگه‌داری می‌شوند، خواهد بود. به طور مثال برای مرغ‌های (مزرعه پرورشی ۱۰ هزارتایی) که ۱۰۰ میلیون اسپرم دریافت می‌کنند، تقریباً ۲۰۸ قطعه خروس نیاز است و برای تیمارهای C200 و C400 به‌ترتیب ۴۱۶ و ۸۳۳ قطعه خروس لازم است. اگر هزینه هر یک کیلوگرم خوراک ۳۰،۰۰۰ ریال باشد، هزینه جیره خروس‌ها در هر هفته برای تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیون اسپرم، به‌ترتیب ۶،۱۱۵،۲۰۰ و ۱۸،۳۷۵،۰۰۰ ریال بیشتر از تیمار C100 خواهد بود. سود حاصل از تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیون اسپرم (با توجه به تولید مرغ‌های مسن، به‌طور میانگین ۶۰ درصد و قیمت هر جوجه گوشتی ۳۰،۰۰۰ ریال در نظر گرفته شد)،

.

در هر هفته برای مرغ مادر گوشتی نسبت به تیمار C100 به‌ترتیب برابر است با ۰۰۰،۱۸،۰۰۰ و ۲۵،۶۳۲،۰۰۰ ریال خواهد شد. نسبت هزینه به فایده برای تیمارهای C200 و C400 به‌ترتیب تقریباً برابر است با ۲/۹ و ۱/۴ خواهد شد. بنابراین از لحاظ اقتصادی تیمار C200 با صرفه‌تر از تیمار C400 است.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان دادند که برای بهینه‌سازی تلقیح مصنوعی فوری در مرغ‌های مسن با توجه به اثر تیمارها بر جوجه‌درآوری و نسبت هزینه به فایده (قیمت روز جوجه گوشتی)، می‌توان از غلظت تلقیحی ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلیون در ۰/۲۵ میلی‌لیتر به‌ازای هر مرغ در دمای ۵ درجه سلسیوس (منی رقیق‌شده) استفاده کرد.

سپاسگزاری

از آقایان دکتر ساسان پورجعفری دهکردی (مدیر عامل شرکت سهامی مزرعه نمونه)، مهندس دانیال گردانی (جانشین مدیر عامل شرکت سهامی مزرعه نمونه)، مهندس سید علی شیرنگی (مدیر تولید مرغ مادر گوشتی و واحد جوجه‌کشی شرکت سهامی مزرعه نمونه) و همچنین مسئولان و کارمندان محترم مزرعه‌های مادر گوشتی و واحد جوجه کشی که در اجرای این طرح ما را همیاری نمودند، نهایت تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Bakst, M. R. & Dymond, J. S. Artificial insemination in poultry. In: Lemma A., editor. Success in artificial insemination quality of semen and diagnostics employed: InTech; 2013. p. 176-89.
2. Bramwell, R. K., Marks, H. L. & Howarth, B. (1995). Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. *Poultry Science*, 74, 1875-83.

3. Burrows, W. H. & Quinn, J. P. (1937). The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*, 16, 19-24.
4. Christensen, V. L., Fairchild, B. D. & Ort, D. T. (2005). The Relationship Between Sperm Hydrolysis of the Perivitelline Layer and Embryonic Livability1. *Journal of Applied Poultry Research*, 14, 60-8.
5. Das, S. C., Isobe, N., Nishibori, M. & Yoshimura, Y. (2006). Expression of transforming growth factor-β isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132, 781-90.
6. Donoghue, A. M. (1996). The effect of twenty-four hour in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. *Poultry Science*, 75, 1035-8.
7. Eslick, M. L. & McDaniel, G. R. (1992). Interrelationships Between Fertility and Hatchability of Eggs from Broiler Breeder Hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 1, 156-9.
8. Hocking, P. M. (1990). The relationships between dietary crude protein, body weight, and fertility in naturally mated broiler breeder males. *British Poultry Science*, 31, 743-57.
9. Hocking, P. M. & Bernard, R. (2000). Effects of the age of male and female broiler breeders on sexual behaviour, fertility and hatchability of eggs. *British Poultry Science*, 41, 370-6.
10. Long, J. A. & Conn, T. L. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 degrees C for 24 hours. *Poultry Science*, 91, 1990-6.
11. Long, J. A. & Kramer, M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*, 82, 1802-7.
12. Meyer, G. B., Props, C. F., Leighton, A. T., Jr., Van Krey, H. P. & Potter, L. M. (1980). Influence of dietary protein during the pre-breeder period on subsequent reproductive performance of large white turkeys. 3. The effects of semen volume and frequency of insemination on fertility and hatchability. *Poultry Science*, 59, 363-8.
13. Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H. & Sharafi, M. (2016). Effect of sperm concentration on characteristics and fertilization capacity of rooster sperm frozen in the presence of the antioxidants catalase and vitamin E. *Theriogenology*, 86, 1393-8.
14. Sarabia Fragoso, J., Pizarro Diaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodriguez-Bertos, A. & Barger, K. (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals*, 48, 345-52.
15. SAS Institute. (2009). *SAS/STAT® User's Guide*, Release 8.02 ed. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC, USA.
16. Schulze, M., Nitsche-Melkus, E., Hensel, B., Jung, M. & Jakop, U. (2020). Antibiotics and their alternatives in Artificial Breeding in livestock. *Animal Reproduction Science*. 106284, from https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106284.
17. Sexton, T. J. (1977). A new poultry semen extender. 1. Effects of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Science*, 56, 1443-6.
18. Sexton, T. J. (1988). Comparison of Commercial Diluents for Holding Turkey Semen 24 Hours at 5 C. *Poultry Science*, 67, 131-4.
19. Sharideh, H., Esmaeile Neia, L., Zaghari, M., Zhandi, M., Akhlaghi, A. & Lotfi, L. (2016 a). Effect of feeding guanidinoacetic acid and L-arginine on the fertility rate and sperm penetration in the perivitelline layer of aged broiler breeder hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100, 316-22.
20. Sharideh, H., Zhandi, M., Zeinoaldini, S., Zaghari, M. & Sadeghi, M. (2019). The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. *Theriogenology*, 129, 103-109.
21. Sharideh, H., Zhandi, M., Zaghari, M. & Akhlaghi, A. (2016 b). Dietary zinc oxide and Escherichia Coli-derived 6-phytase improve the fertility rate in old broiler breeder hens with no effect on immunity in their progeny hatchlings. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 327-336.
22. Sharideh, H., Zhandi, M., Zeinoaldini, S., Zaghari, M., Sadeghi, M., Akhlaghi, A. & Peebles, E. D. (2020). Beneficial effects of dietary coenzyme Q10 on the productive and reproductive variables of broiler breeder hens. *Animal Reproduction Science*, 213, 106256.
23. Vasicek, J., Kuzelova, L., Kulikova, B. & Chrenek, P. (2015) Effect of diluent and storage timeon sperm characteristics of rooster insemination doses. *Avian Biology Research*, 8, 41-46.
24. Vizcarra, J.A., Kirby, J.D., Kreider & D.L. (2010). Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. *Poultry Science*, 89, 328-334.
25. Waberski, D., Luther, A.-M., Grünther, B., Jäkel, H., Henning, H., Vogel, C., Peralta, W. & Weitze, K. F. (2019). Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports*, 9, 14748.
26. Zaghari, M., Derakhshani-Diba, M., Moravej, H. & Zahroojian, N. (2017). Estimation of metabolizable energy equivalency of Bacillus subtilis spore in male broiler chickens. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 5, 9-18.
27. Zamiri, M. J., Hashemi, M. R. & Boostani, A. (2005). An evaluation of several semen diluents for storageof fars native chicken sperm at 4-5 and 19-24 °C. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 36, 603-612. (In Farsi).