مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ۲، سال ۱۳۸۵ (۳٤۰-۳۳۳)

اثر افزودن ويتامين E به رقيق‌كننده بر ويژگي ها و باروري مني خروس‌هاي بومي فارس پس از ٦ يا ٢٤ ساعت نگهداري در دماي ٥-٤ يا ٢٤-١٩ درجه ي سانتي گراد

عليداد بوستاني[1] و محمد جواد ضميري[2]
۱، ۲، دانشجوي پيشين كارشناسي ارشد و استاد دانشكده كشاورزي، دانشگاه شيراز
تاريخ پذيرش مقاله ٨٤/٢/٧

خلاصه

اثر چندين غلظت ويتامين E (۰، ٤، ٨ و ١٢ ميكروگرم در ميلي‌ليتر) بر ويژگيها و باروري مني خروس‌هاي بومي فارس پس از ٦ يا ٢٤ ساعت نگهداري در دماي ٥-٤ (دماي يخچال) يا ٢٤-١٩ درجه‌ي سانتي گراد (دماي آزمايشگاه) بررسي شد. ويتامين E تاثير معني‌داري بردرصد اسپرم زنده، ميزان جنبايي اسپرم، pH و درصد جوجه‌دهي تخم مرغ هاي بارور نداشت. غلظت‌هاي ٤، ٨ و ١٢ ميكروگرم ويتامين E موجب افزايش معني‌داري در درصد باروري نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي ٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد و ٢٤-١٩ درجه‌ي سانتي‌گراد نسبت به گروه كنترل (مني رقيق شده در سكستون بدون ويتامينE) شد. براي ٦ ساعت نگهداري مني در دماي ٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد، افزودن ٨ ميكروگرم ويتامين E در هر ميلي‌ليتر رقيق‌كننده‌ي سكستون، باروري بالاتري را موجب شد. افزودن ٤ يا ٨ ميكروگرم ويتامين E در هر ميلي‌ليتر رقيق‌كننده، موجب افزايش باروري نمونه‌هاي نگهداري شده در دماي ٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد و ٢٤-١٩ درجه‌ي سانتي‌گراد براي ٢٤ ساعت شد. افزودن ٨ ميكروگرم ويتامينE در هر ميلي‌ليتر رقيق‌كننده، موجب افزايش جوجه‌دهي كل براي نمونه‌هاي نگهداري شده در دماي ٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد و ٢٤-١٩ درجه‌ي سانتي‌گراد پس از ٢٤ ساعت شد.

واژه‌هاي كليدي: ويتامين E، مني، اسپرم، خروس، باروري، تلقيح مصنوعي

مقدمه

هزينه و نياز به دقت بالا براي اجراي يك برنامه كارآمد تلقيح مصنوعي، از كاربرد گسترده‌ي آن در ماكيان، جلوگيري كرده است (١). كارآيي اين روش را مي‌توان با رقيق كردن و نگهداري دراز مدت مني، افزايش داد (١٤، ٢٨). معمار و ضميري (١٣٨٤) براي نخستين بار، تغييرات ويژگي‌هاي مني و باروري خروس‌هاي بومي فارس، و ضميري و همكاران (١٣٨٤) اثر پنج رقيق كننده را بر نگهداري اسپرم در دو دما، بررسي كردند. بيشترين شمار كل اسپرم‌هاي زنده و بهنجار در مهرماه ديده شد (٣) و سكستون، بهترين رقيق كننده براي نگهداري كوتاه مدت مني بود؛ اگرچه، با افزايش زمان نگهداري، ميزان جنبايي اسپرم، درصد باروري، درصد جوجه‌دهي و درصد اسپرم زنده، كاهش يافت (٢).

حفظ توان لقاح اسپرم پرندگان اهلي، تا مدت ٤٨ ساعت، به اكسيژن، مايع رقيق كننده‌اي كه فروكتوز يا گلوكز براي توليد ATP داشته باشد، توان بافري بسنده براي حفظ pH و دماي ٥ تا ٧ درجه‌ي سانتي‌گراد، نيازمند است (١).

پژوهش‌هاي اخير نشان مي‌دهند كه تركيبات ليپيدي و اسيدهاي چرب اسپرم ممكن است نقش مهمي در باروري داشته باشند. بخش بيشتر فسفوليپيدهاي اسپرم ماكيان، از اسيدهاي چرب اشباع نشده، تشكيل شده است (٧، ٩، ٣٠). سروليني و همكاران (١٩٩٧)، همبستگي مثبت و معني‌داري

مكاتبه كننده: محمدجواد ضميري
E-mail: mjzamiri@yahoo.com

بين تركيبات ليپيدهاي مني و توانايي باروري اسپرم خروس، گزارش كردند و مالديان و همكاران (۱۹۹۸) نشان دادند كه پراكسيداسيون ليپيدهاي اسپرم، موجب كاهش توان جنبايي، سلامت غشاي اسپرم و باروري شد. وجود غلظت بالاي اسيدهاي چرب نااشباع با چند پيوند دوگانه در ليپيدهاي مني، نيازمند داشتن سيستم‌هاي مؤثري براي حفاظت غشاي اسپرم در برابر آسيب‌هاي پراكسيداسيون است (۷، ۲۰). توكوفرول، سلول را در برابر آسيب هاي ناشي از راديكال هاي آزاد، محافظت مي كند و سورايي و همكاران (۲۰۰۰) پيشنهاد كردند احتمال مي رود بتوان اين آسيب ها را با افزودن ويتامين E جبران كرد. بله بوا و همكاران (۱۹۹۳) نشان دادند كه افزودن اين ويتامين به مني رقيق شده‌اي كه براي ۲٤ ساعت در دماي ٤ درجه سانتي گراد نگهداري شده بود موجب بهبود توان باروري اسپرم خروس شد هرچند بر ميزان جنبايي اسپرم تاثير معني داري نداشت.

تركيب شيميايي غشاي اسپرم هاي خروس هاي برگزيده براي باروري بالا و خروسهاي كنترل (انتخاب نشده) متفاوت بود (٤). از سويي، لانگ و كرامر (۲۰۰۳) نشان دادند كه بين بوقلمونهاي نر يك سويه‌ي ويژه، تفاوتهايي در ميزان پراكسيده شدن ليپيدهاي غشاي اسپرم در شرايط برون تني، وجود داشت. هم چنين، تفاوتهايي بين خروس‌ها از نظر توانايي اسپرم آنها براي هيدروليز غشاي ويتلين، وجود دارد (۲٦). تفاوت بين اسپرم افراد يك گونه و يا نژاد در برابر آسيبهاي سرمايي نشان مي‌دهد كه بين نژادها و سويه‌هاي گوناگون ماكيان نيز وجود چنين تفاوتهايي، امكان پذير است (۱۰، ۱۱)؛ بنابر اين براي كاهش تاثير نامطلوب زمان نگهداري بر اسپرم رقيق شده خروسهاي بومي فارس كه براي تلقيح مصنوعي بكار مي رود، اثر افزودن ويتامين E (آلفا-توكوفرول[1]) به رقيق‌كننده‌ي سكستون بر ويژگي‌ها و باروري مني نگهداري شده در دماي ۵-٤ يا ۲٤-۱۹ درجه‌ي سانتيگراد، پس از ٦ يا ۲٤ ساعت بررسي شد. امكان نگهداري اسپرم در دماي معمولي و دست كم تا ۲٤ ساعت، انعطاف پذيري اين روش را بيشتر خواهد كرد.

1. α-Tocopherol

مواد و روش‌ها

در اين پژوهش، از ۲۵ خروس ۷ ماهه و ۱۷۰ مرغ ۱۲ ماهه بومي استفاده شد. براي خوكردن خروس‌ها به برنامه‌ي اسپرم‌گيري، يك دوره‌ي ۳ هفته‌ي اسپرم‌گيري، درنظرگرفته شد. براي اطمينان از باقي نماندن اسپرم زنده در دستگاه توليد مثلي، مرغ‌ها پس از ۵ هفته وارد آزمايش شدند. مرغ‌ها به طور تصادفي به ۱۷ گروه ۱۰ تايي تقسيم شدند؛ ۱٦ گروه به طور تصادفي به حالت‌هاي مختلف آزمايش از نظر ميزان ويتامين E، زمان نگهداري و دماي نگهداري (جدول ۱)، و يك گروه به گروه شاهد اختصاص داده شد. اسپرم‌گيري در ساعت ۱ بعد از ظهر انجام شد و نمونه‌هاي مني ۲۵ خروس با يكديگر مخلوط شدند. حجم مني، pH مني، غلظت اسپرم، درصد اسپرم هاي زنده و ميزان جنبايي اسپرم تعيين شد.

جدول ۱- نشانه‌هاي اختصاري و ويژگي‌هاي نمونه‌هاي مني

نمونه‌ي مني	ميزان ويتامين E (µg/ml)	زمان نگهداري (ساعت)	دماي نگهداري
E_0SL	۰	٦	آزمايشگاه
E_0SR	۰	٦	يخچال
E_0LL	۰	۲٤	آزمايشگاه
E_0LR	۰	۲٤	يخچال
E_4SL	٤	٦	آزمايشگاه
E_4SR	٤	٦	يخچال
E_4LL	٤	۲٤	آزمايشگاه
E_4LR	٤	۲٤	يخچال
E_8SL	۸	٦	آزمايشگاه
E_8SR	۸	٦	يخچال
E_8LL	۸	۲٤	آزمايشگاه
E_8LR	۸	۲٤	يخچال
$E_{12}SL$	۱۲	٦	آزمايشگاه
$E_{12}SR$	۱۲	٦	يخچال
$E_{12}LL$	۱۲	۲٤	آزمايشگاه
$E_{12}LR$	۱۲	۲٤	يخچال

دماي يخچال (R) بين ٤ تا ۵ درجه‌ي سانتي گراد، دماي آزمايشگاه (L) بين ۱۹ تا ۲٤ درجه‌ي سانتي گراد و زمان نگهداري نمونه‌ها، ٦ ساعت(S) و يا ۲٤ ساعت (L) بود.

پيش از رقيق كردن مني، بي‌درنگ يك گروه ۱۰ تايي مرغ با ۰/۲ سي سي مني رقيق نشده، تلقيح شدند (گروه شاهد). باقي‌مانده‌ي مني به نسبت ۱ به ۲ با رقيق كننده‌ي سكستون (۲۸)، رقيق شده و به چهار بخش، تقسيم شد. به هر بخش مني رقيق شده، ويتامين E (۰، ٤، ۸ و ۱۲ ميكروگرم در ميلي ليتر) افزوده شد و در دماي آزمايشگاه (۲٤-۱۹ درجه‌ي سانتي‌گراد) و يا يخچال (٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد) براي ٦ و يا ۲٤ ساعت، نگهداري شدند. بي درنگ، پس از رقيق كردن و هم‌چنين پس از نگهداري مني رقيق شده در دما و زمان مورد نظر، ويژگي‌هاي مني (pH، درصد اسپرم زنده و ميزان جنبايي اسپرم) اندازه‌گيري شد. تلقيح مصنوعي، با سرنگ توبركولين و به ميزان ۰/۲ سي سي، يك بار در هفته انجام، و تخم مرغ‌ها، ۲ تا ٦ روز پس از هر تلقيح، جمع آوري شدند. اين كار، براي ٥ هفته تكرار شد. پس از هر بار تلقيح، تخم‌مرغ‌هاي هر گروه، جوجه‌كشي شدند و درصد باروري و جوجه‌دهي، تعيين شد. در هر مرحله، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده، pH و ميزان جنبايي اسپرم نيز اندازه‌گيري شد. فراسنجه‌هاي اندازه‌گيري شده، به شرح زير بودند:

۱- pH مني با استفاده از دستگاه pH متر تا دو رقم اعشار
۲- غلظت اسپرم در مني با استفاده از هيموسيتومتر
۳- جنبايي اسپرم با استفاده از ميكروسكوپ مجهز به صفحه‌ي گرمايي در مقياس صفر (بدون حركت) تا ٥ (با حركت بسيار زياد) (٥).
٤- درصد اسپرم زنده با روش رنگ آميزي با ائوزين-نيگروزين (۳)
٥- باروري (درصد)
٦- جوجه دهي (درصد)

داده‌ها با روش آناليز واريانس براي "داده‌هاي تكرار شونده روي هر فرد"[1] و با استفاده از Proc Mixed نرم افزار SAS، آناليز شدند. مقايسه‌ي ميانگين‌ها، با روش توكي (P=0.05) انجام شد (۲۷). داده‌هايي كه به شكل درصد بودند، در آغاز به $\text{Arcsin}\sqrt{x}$ تبديل و آناليز شدند، اما در اين مقاله، ميانگين‌هاي تبديل نشده، گزارش شده‌اند.

نتايج

ويژگي‌هاي اسپرم

افزودن ويتامين E به رقيق كننده‌ي مني، تاثيري بر ميزان جنبايي اسپرم، درصد اسپرم‌هاي زنده، pH نمونه‌هاي مني و نيز درصد جوجه‌دهي تخم مرغ‌هاي بارور، نداشت (جدول ۲).

باروري

اثر ويتامين E بر درصد تخم مرغ‌هاي بارور، در پي تلقيح نمونه‌هاي مني نگهداري شده در رقيق‌كننده‌ي سكستون، معني‌دار بود. بيشترين درصد تخم مرغ‌هاي بارور براي نمونه‌ي E8SR (۷۲/٦) و كمترين آن براي نمونه E0LL (۲۳/۳)، مشاهده شد (جدول ۳).

باروري نمونه‌هاي مني رقيق شده در سكستون بدون ويتامين **E**: درصد باروري نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٦ و ۲٤ ساعت، تفاوت معني‌داري نشان داد (جدول‌هاي ۲ و ۳). با افزايش زمان نگهداري نمونه‌هاي مني، درصد باروري به طور معني‌داري كاهش يافت. بيشترين باروري مربوط به نمونه‌هاي نگهداري شده به مدت ٦ ساعت در دماي يخچال و يا آزمايشگاه بود.

باروري نمونه‌هاي داراي ٤ ميكروگرم ويتامين **E** در ميلي‌ليتر: بين نمونه‌هاي مني نگهداري شده در دماي يخچال و آزمايشگاه براي ٦ ساعت و يا ۲٤ ساعت، تفاوت معني‌داري ديده نشد.

باروري نمونه‌هاي داراي ۸ ميكروگرم ويتامين **E** در ميلي‌ليتر: تفاوت بين ميانگين‌هاي درصد تخم‌مرغ‌هاي بارور در پي تلقيح نمونه‌هاي مني اين گروه، معني‌دار بود. بيشترين درصد باروري در نمونه‌ي E_8SR (۷۲/٦) و كمترين آن، در E_8LL (٥۱/۲) مشاهده شد. بين نمونه‌هاي مني نگهداري شده در دماي يخچال و آزمايشگاه براي ٦ و يا ۲٤ ساعت، تفاوت معني‌داري ديده نشد (جدول‌هاي ۲ و ۳). درصد باروري نمونه‌هاي مني نگهداري شده براي ٦ ساعت در دماي آزمايشگاه و يخچال، به طور معني‌داري بيشتر از نمونه‌هاي نگهداري شده براي ۲٤ ساعت در همين شرايط بود.

1. Repeated measure ANOVA

جدول ۲- اثر ويتامين E، زمان نگهداري و دماي نگهداري بر ويژگي‌هاي مني خروس‌هاي بومي فارس (ميانگين ± انحراف معيار)

نمونه مني۱	ميزان جنبايي اسپرم	اسپرم زنده (%)	pH	باروري (%)	جوجه‌دهي كل (%)	جوجه‌دهي تخم‌هاي بارور(%)
E0SL	۳/۳۸±۰/۳۸ ab	۷۱/۹۷±٤/٥۰ a	٦/۹۸±۰/۰٤ ab	٥۲/۱۰±۱/٤۷ bcde	٤۲/۳۹±۱/۳٤ bc	۷۹/٤۰±۱/٥۹ abcd
E0SR	۳/۳۹±۰/۳۱ ab	٦۷/۲۷±۱۰/۱۳ a	۷/۱۳±۰/۰۳ a	٥۹/۳۷±۱/۳۸ bc	٥۱/۰٥±۱/٦٦ ab	۸٦/۲۲±۱/۲٦ a
E0LL	۱/٦٤±۰/٥۹ b	٤۷/٤۳±۸/۷۹ a	٦/۹۷±۰/۰٤ ab	۲۳/۳۳±۲/٦۳ f	۱٥/۷٥±۱/٤٦ f	٦۱/۸۱±٥/٦۰ cd
E0LR	۲/٥۲±۰/٥۳ ab	٥۲/۱٤±۹/۱٤ a	۷/۱۱±۰/۰۲ a	۲۹/٤۳±۳/۷٤ f	۱۹/٦۱±۱/٥۸ ef	٦۰/۱٤±۲/۳٦ d
E4SL	۲/۹٤±۰/٦۳ ab	٦۳/٦۹±٥/۸٤ a	٦/۹۸±۰/۰٤ ab	٥٥/۹٤±۱/۳۱ bcd	٤۰/٦۸±۱/٦۹ bcd	۷۲/۲۹±۲/۱۲ abcd
E4SR	۳/۷۸±۰/۲۷ ab	۷۳/٥٥±٥/۲۲ a	۷/۰۹±۰/۰٤ ab	٦۲/۱۷±۱/۱۹ abc	٥۱/۳۷±۲/۲۰ ab	۸۲/۳۷±۲/٤۱ abc
E4LL	۱/۸۷±۰/٤۳ b	٤٥/٤۸±٦/٥۳ a	٦/۸۸±۰/۰۷ b	٤٥/۸٤±۱/۷۲ de	۲۸/۲۷±٤/۱۱ de	٦۰/٥۰±۹/۱۲ d
E4LR	۱/۸٤±۰/٤۸ b	٤٦/٥۷±۹/۲٤ a	۷/۰٦±۰/۰٥ ab	٥۰/۹۳±۲/۱۹ cde	۳۲/٦۳±۲/۳۰ cd	٦۱/٦٥±٤/۲۳ cd
E8SL	۲/۹۰±۰/٦۳ ab	٦۱/٦۰±٦/۱٥ a	۷/۰۰±۰/۰٤ ab	٦٤/۲۸±۳/۲٤ ab	٤۹/۰۱±۲/۸۱ ab	۷٤/۳۳±۳/۰۹ abcd
E8SR	٤/۱٤±۰/۱۹ a	۷۸/۱٦±۳/٦۰ a	۷/۱۳±۰/۰٤ a	۷۲/٦۲±۱/۳۱ a	٦۰/۰۷±۱/۰٥ a	۸۳/۸۳±۰/٦۸ ab
E8LL	۱/٦٦±۰/٥۰ b	٤۸/٦۰±۸/۹٦ a	٦/۹٥±۰/۰٤ ab	٥۱/۱۷±۳/۰٤ cde	٤۲/٤۳±۳/٥۳ bc	۷۹/۸۰±۲/۷٤ abcd
E8LR	۳/۰٤±۰/٤٥ ab	٦۰/٤۸±۸/٥۷ a	۷/۰٦±۰/۰۳ ab	٥۷/۹۲±۲/۲۰ bcd	٤۲/۷۲±۱/٦۰ bc	۷۲/۲٤±۳/۰۰ abcd
E12SL	۳/٤۰±۰/٤۸ ab	٦۷/۰۷±٥/۲۹ a	۷/۰۰±۰/۰٥ ab	٥٤/۹۹±۳/۲۷ bcd	٤۲/۳۳±٤/۱۳ bc	۷۷/۰۹±۲/٤۹ abcd
E12SR	۳/۳٤±۰/٤٤ ab	۷۳/۸٦±٦/٤۳ a	۷/۱۰±۰/۰٤ a	٦۱/٥۷±۲/۳۷ abc	٤۹/۰٥±۳/۱۸ ab	۷۹/٤٦±۲/۷٤ abcd
E12LL	۲/۱۰±۰/٦۰ ab	٤۷/٥۱±٥/۳۳ a	٦/۹۲±۰/۰٥ ab	٤۲/۲۳±۲/۳۲ e	۲۸/٥۷±۲/٦۹ de	۷۱/۳۲±۹/۷۹ abcd
E12LR	۲/۹٦±۰/٥۰ ab	٥٥/۹٤±۹/۸۹ a	۷/۰۹±۰/۰٥ ab	٤۱/۹۷±۲/٦۸ e	۲۸/۲٤±۱/۹۹ de	٦٤/۷۳±٦/۲٦ bcd

a، b، c، d، e و f در هر ستون، ميانگين‌هايي كه حرف يا حروف همانند دارند، تفاوت آماري معني‌داري ندارند (آزمون توكي P>۰/۰٥)

۱- براي نشانه هاي اختصاري نمو نه هاي مني، جدول ۱ را بنگريد.

جدول ۳- ميانگين* درصد تخم‌مرغ‌هاي بارور در پي تلقيح مصنوعي اسپرم رقيق شده‌ي خروس‌هاي بومي فارس در رقيق كننده‌ي سكستون و داراي صفر (E_0)، ٤ (E_4)، ۸ (E_8) و ۱۲ (E_{12}) ميكروگرم ويتامين E در ميلي‌ليتر رقيق كننده‌ي سكستون. نمونه‌هاي رقيق شده، براي ٦ تا ۲٤ ساعت در دماي يخچال (٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد) يا دماي محيطي (۲٤-۱۹ درجه‌ي سانتي‌گراد) نگهداري، و پس از آن، تلقيح شدند.

زمان نگهداري	٦ ساعت (S)		۲٤ ساعت (L)	
دماي نگهداري	٥-٤ درجه (R)	۲٤-۱۹ درجه (L)	٥-٤ درجه (R)	۲٤-۱۹ درجه (L)
E_0	$_{B}$٥۹/٤^{a}	$_{A}$٥۲/۱^{a}	$_{C}$۲۹/٤^{b}	$_{B}$۲۳/۳^{b}
E_4	$_{AB}$٦۲/۲^{ab}	$_{A}$٥٥/۹^{bc}	$_{A}$٥۰/۹^{bc}	$_{A}$٤٥/۸^{c}
E_8	$_{A}$۷۲/٦^{a}	$_{A}$٦٤/۳^{ab}	$_{A}$٥۷/۹^{bc}	$_{A}$٥۱/۲^{c}
E_{12}	$_{AB}$٦۱/٦^{a}	$_{A}$٥٥/۰^{a}	$_{B}$٤۲/۰^{b}	$_{A}$٤۲/۲^{b}

* در هر رديف (حروف كوچك) و يا در هر ستون (حروف بزرگ)، ميانگين‌هايي كه حرف يا حروف همانند دارند، تفاوت آماري معني‌داري ندارند (P>0.05).

باروري نمونه‌هاي داراي ۱۲ ميكروگرم ويتامين **E** در ميلي‌ليتر: تفاوت بين ميانگين‌هاي درصد تخم‌مرغ‌هاي بارور در پي تلقيح نمونه‌هاي مني اين گروه، معني‌دار بود. بيشترين باروري در نمونه‌ي $E_{12}SR$ (٦۱/٦ درصد) و كمترين آن در نمونه‌هاي $E_{12}LR$ (٤۲ درصد) و $E_{12}LL$ (٤۲/۲ درصد) ديده شد (جدول‌هاي ۲ و ۳). باروري نمونه‌هاي مني نگهداري شده

در دماي آزمايشگاه و يخچال براي ٦ ساعت به طور معني‌داري بيشتر از نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در همين شرايط بود.

باروري نمونه‌هاي E_0، E_8 و E_{12} با افزايش زمان نگهداري، كاهش يافت اما ميزان كاهش باروري در نمونه‌هاي E_8 و E_{12} به طور معني‌داري كمتر از E_0 بود. باروري نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي آزمايشگاه (E_4LL، E_8LL و $E_{12}LL$) به طور معني‌داري بالاتر از E_0LL بود. همچنين، باروري نمونه‌هاي نگهداري شده در دماي يخچال براي ٢٤ ساعت (E_4LR، E_8LR و $E_{12}LR$) نيز به طور معني‌داري بالاتر از E_0LR بود. بين نمونه‌هاي نگهداري شده در يخچال براي ٦ ساعت، تنها، نمونه‌ي E_8SR به طور معني‌داري باروري بالاتري نسبت به E_0SR نشان داد.

درصد جوجه‌دهي كل

اثر ويتامين E بر درصد جوجه‌دهي كل، معني‌دار بود. بيشترين درصد جوجه‌دهي كل در نمونة E_8SR (٦٠/١) و كمترين آن، در E_0LL (١٥/٨) ديده شد (جدول‌هاي ٢ و ٤). درصد جوجه دهي نمونه‌هاي داراي ويتامين E نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي آزمايشگاه (E_4LL، E_8LL و $E_{12}LL$) به طور معني‌داري بيشتر از E_0LL بود. همچنين، درصد جوجه‌دهي نمونه‌هاي داراي ٤ و ٨ ميكروگرم ويتامين E در ميلي‌ليتر رقيق كننده و نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي يخچال (E_4LR و E_8LR) به طور معني‌داري بيشتر از E_0LR بود. با افزايش زمان نگهداري نمونه‌ها در يخچال، درصد جوجه‌دهي كل به طور معني‌داري كاهش يافت. درصد جوجه‌دهي كل در نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي آزمايشگاه، در غلظت‌هاي ٤ و ٨ ميكروگرم در ميلي‌ليتر ويتامين E افزايش ولي در غلظت ١٢ ميكروگرم در ميلي‌ليتر كاهش يافت.

بحث

همانند يافته‌هاي بله‌بوا و همكاران (١٩٩٣) در خروس‌هاي كورنيش، ويتامين E اثر معني‌داري بر pH، درصد اسپرم زنده و ميزان جنبايي نمونه‌هاي مني خروس‌هاي بومي فارس نداشت. اما در بوقلمون، ميزان جنبايي نمونه‌هاي مني داراي ويتامين E با افزايش زمان نگهداري، كاهش كمتري نسبت به نمونه‌هاي بدون ويتامين E نشان داد (١٥).

همة غلظت‌هاي ويتامين E موجب افزايش باروري نمونه‌هاي نگهداري شده براي ٢٤ ساعت در دماي يخچال و آزمايشگاه نسبت به نمونه‌ي بدون ويتامين E در همين شرايط شد، ولي غلظت‌هاي ٤ و ٨ ميكروگرم ويتامين E، بالاترين باروري را داشتند. اين يافته‌ها، نتايج بله‌بوا و همكاران (١٩٩٣) در خروس‌هاي كورنيش را درباره‌ي تاثير مثبت غلظت‌هاي مشخصي از ويتامين E بر باروري مني نگهداري شده در دماي ٤ درجه‌ي سانتي‌گراد براي ٢٤ ساعت، تاييد مي‌كنند كه غلظتهاي بيشتر از ٨ ميكروگرم ويتامين E در ميلي‌ليتر سكستون، موجب كاهش معني داري در ميزان باروري شد. علت كاهش باروري نمونه‌هاي داراي ١٢ ميكروگرم ويتامين E نسبت به نمونه‌هاي داراي ٤ و ٨ ميكروگرم، شايد اين باشد كه ويتامين E در غلظت‌هاي بالا مي‌تواند به عنوان يك عامل اكسيدكننده، اثري منفي بگذارد (١٣).

جدول ٤- ميانگين* درصد جوجه‌دهي كل تخم‌مرغ‌ها در پي تلقيح مصنوعي اسپرم رقيق شده‌ي خروس‌هاي بومي فارس در رقيق كننده‌ي سكستون و داراي صفر (E_0)، ٤ (E_4)، ٨ (E_8) و ١٢ (E_{12}) ميكروگرم ويتامين E در ميلي‌ليتر رقيق كننده‌ي سكستون. نمونه‌هاي رقيق شده، براي ٦ تا ٢٤ ساعت در دماي يخچال (٥-٤ درجه‌ي سانتي‌گراد) يا دماي محيطي (٢٤-١٩ درجه‌ي سانتي‌گراد) نگهداري، و پس از آن، تلقيح شدند.

زمان نگهداري	٦ ساعت (S)		٢٤ ساعت (L)	
دماي نگهداري	٥-٤ درجه (R)	٢٤-١٩ درجه (L)	٥-٤ درجه (R)	٢٤-١٩ درجه (L)
E_0	$_{A}$٥١/١^{a}	$_{A}$٤٢/٤^{a}	$_{CD}$١٩/٦^{b}	$_{C}$١٥/٨^{b}
E_4	$_{A}$٥١/٤^{ab}	$_{A}$٤٠/٧^{bc}	$_{AB}$٣٢/٦^{cd}	$_{B}$٢٨/٣^{cd}
E_8	$_{A}$٦٠/١^{a}	$_{A}$٤٩/٠^{ab}	$_{A}$٤٢/٧^{bc}	$_{A}$٤٢/٤^{bc}
E_{12}	$_{A}$٤٩/١^{a}	$_{A}$٤٢/٣^{a}	$_{BC}$٢٨/٢^{b}	$_{B}$٢٨/٦^{b}

* در هر رديف (حروف كوچك) و يا در هر ستون (حروف بزرگ)، ميانگين‌هايي كه حرف يا حروف همانند دارند، تفاوت آماري معني‌داري ندارند ($P>0.05$)

روند كاهش ميزان باروري نمونه‌هاي بدون ويتامين با افزايش زمان نگهداري، هم سو با يافته‌هاي پيشين براي خروس‌هاي بومي فارس (۳) و خروس هاي اصلاح شده(۳۳،۱۲) و بوقلمون (۸) است. در دما بالا، ميزان ATP اسپرم نسبت به دماهاي پايين زودتر كاهش مي‌يابد و نيز ميزان مصرف اكسيژن و توليد اسيد لاكتيك بيشتر مي شود كه كاهش كيفيت اسپرم را در پي دارد (۳۲). فزون بر اين، افزايش زمان و دماي نگهداري، موجب افزايش ميزان تنفس اسپرم رقيق شده (و كاهش باروري) مي‌شود كه شايد ناشي از تغيير در ميزان مواد غذايي در دسترس (مانند فروكتوز) باشد؛ رقيق‌كننده‌ي سكستون، ۵ ميلي‌گرم فروكتوز در ميلي ليتر دارد كه نزديك به ۱۰۰ برابر بيشتر از نمونه‌ي مني رقيق نشده است و مي‌تواند موجب تحريك متابوليزم اسپرم شود (۱۲).

پس از ۲٤ ساعت نگه داري مني رقيق شده، بويژه در دماي ۲٤-۱۹ درجه‌ي سانتيگراد، همه‌ي غلظت‌هاي ويتامين E درصد جوجه‌دهي كل تخم مرغ‌ها را افزايش دادند؛ هرچند كه غلظت ۸ ميكروگرم، بيشترين درصد جوجه‌دهي كل را موجب شد. تا ٦ ساعت نگهداري مني رقيق شده در هر يك از دو دما، ويتامين E تاثير معني‌داري بر درصد جوجه‌دهي كل در مقايسه‌ي با نمونه‌هاي بدون ويتامين نداشت اما در اين حالت نيز درصد جوجه‌دهي در غلظت ۸ ميكروگرم، بيشترين بود. پژوهشهاي منتشر شده درباره‌ي اين موضوع، به بررسي تاثير ويتامين E بر جوجه‌دهي نپرداخته‌اند.

باروري مني پرندگان پس از انزال، به سرعت كاهش مي‌يابد. اگر چه با رقيق كردن، مي‌توان اسپرم را براي مدت بيشتري، نگهداري كرد اما نگهداري اسپرم در شرايط برون تني، بدون اين كه باروري كاهش يابد، امكان پذير نيست (۱). فسفوليپيدها براي فعاليت بيشترآنزيم‌هاي زنجيره‌ي انتقال الكترون در ميتوكندري ها، و مانند آنها ضروري هستند. مهمترين اسيد چرب نا اشباع در فسفوليپيدهاي غشاي اسپرم خروس، دوكوزا تترا انوييك اسيد[1] است كه همبستگي مثبتي با جنبايي اسپرم و باروري دارد (۱۱). اسيدهاي چرب فسفوليپيدها، بر ميزان سياليت غشا اثر مي‌گذارند و از كنشهاي مهم كلسترول تنظيم پروتئين‌هاي غشاي سلولي است. كلسترول، هم چنين موجب حفظ غشا در برابر تغيير دما مي‌شود و ميزان سياليت غشا را تنظيم مي‌كند. از آنجا كه اسپرم خروس، مقدار شايان توجهي ليپيد دارد (۲۰) كه نزديك به ٦۰ درصد آن، فسفوليپيد است (۱۹) بنابراين، مي‌توان پنداشت كه اين فسفوليپيدها بتوانند به عنوان منبع مهم انرژي براي اسپرم در شرايط برون تني باشند. اما تغييرات مهمي در ميزان فسفوليپيد، كلسترول و ليپيدها در اسپرم‌هاي خروسهايي كه مني آنها براي ۲٤ ساعت در دماي ٤۱ و ۵ درجه‌ي سانتيگراد نگهداري شده بود،مشاهده نشد(۲۵،۱۸).

نگهداري مني رقيق شده بوقلمون براي ٤۸ ساعت در دماي ۵ درجه‌ي سانتي‌گراد، موجب كاهش فسفوليپيدهاي غشاي اسپرم شد ولي بر غلظت اين تركيبات در مايع مني تأثيري نداشت (۱٦). لانگ و كرامر (۲۰۰۳) نشان دادند كه بوقلمون‌هاي نر از نظر توليد مالون‌داي‌آلدهايد (MDA)[2] در مني رقيق شده متفاوت بودند (دماي ٤ درجه‌ي سانتي‌گراد براي ۲٤ ساعت)؛ ويتامين E اثر معني‌داري بر پراكسيداسيون ليپيدهاي اسپرم نداشت ولي از اين آزمايش نتيجه‌گيري شد كه پراكسيداسيون ليپيدها، سازه‌ي مهمي در كاهش باروري اسپرم بوقلمون است. در بوقلمون (۱۷)، افزودن ويتامين E به مايع رقيق كننده، مقدار MDA و فسفوليپيدهاي اسپرم‌هاي تازه و نگهداري شده در دماي ٤ درجه براي ۲٤ ساعت را تغيير نداد اما جنبايي را افزايش داد. نگهداري اسپرم براي ۲٤ ساعت در مقايسه‌ي با اسپرم تازه رقيق شده، سبب كاهش فسفوليپيدهاي اسپرم شد، اما اين كاهش به علت متابوليزم اسيدهاي چرب فسفوليپيدها نبود. نتايج اين آزمايش نيز نشان داد كه تأثير مثبت ويتامين E بر جنبايي اسپرم، ناشي از محافظت اسپرم در برابر اكسيداسيون ليپيدها، نيست. ويتامين E ممكن است با تأثير گذاشتن بر اسيدهاي چرب فسفوليپيدها، موجب ثبات غشاي اسپرم و يا موجب حفاظت زنجيره‌ي تنفسي ميتوكندريايي شود (۱۷).

1. Docosateraenoic acid (22:4n-6)

2. Malondialdehyde

متابوليزم فسفوليپيدهاي غشا مي‌تواند به توليد پروستاگلاندينها نيز بيانجامد. در پستانداران، پروستاگلاندينها آثار گوناگوني بر اسپرم مي‌گذارند. به طور كلي، پروستاگلاندين‌هاي سري E موجب افزايش جنبايي و $PGF_2\alpha$ موجب كاهش جنبايي اسپرم پستانداران مي‌شوند (۲۹) اما درباره تأثير پروستاگلاندين‌ها بر اسپرم پرندگان، اطلاعات چنداني در دسترس نيست. غلظت پروستاگلاندينهاي مني پرندگان بسيار كمتر از پستانداران است. به تازگي، وجود پروستاگلاندينها در مايع مني و نيز دراسپرم بوقلمون، گزارش شده است؛ اما روشن نيست كه آيا اسپرم پرندگان مي‌تواند مانند اسپرم پستانداران، پروستاگلاندين بسازد يا نه (۲۱). از سويي، تأثير ويتامين E بر ويژگي‌هاي اسپرم پرندگان روشن نيست و نياز به پژوهش‌هاي بيشتري دارد.

نتيجه‌گيري پاياني

۱- براي ٦ ساعت نگهداري مني خروس‌هاي بومي در دماي يخچال، افزودن ۸ ميكروگرم ويتامين E در هر ميلي‌ليتر رقيق‌كننده‌ي سكستون، باروري بالاتري را موجب شد.

۲- افزودن ٤ يا ۸ ميكروگرم ويتامين E در هر ميلي‌ليتر رقيق كننده‌ي سكستون، موجب افزايش باروري نمونه‌هاي نگهداري شده در دماي آزمايشگاه و يخچال براي ۲٤ ساعت شد.

۳- افزودن ۸ ميكروگرم ويتامين E در هر ميلي‌ليتر رقيق‌كننده‌ي سكستون، موجب افزايش جوجه‌دهي در نمونه‌هاي نگهداري شده در دماي آزمايشگاه و يخچال براي ۲٤ ساعت شد.

سپاسگزاري

از مسئولين محترم معاونت امور دام و مركز مطالعات مرغ بومي فارس براي تامين برخي نيازهاي اين پژوهش، سپاسگزاري مي‌شود.

منابع مورد استفاده **REFERENCES**

۱. اتچز، ر. ج. ۱۳۸۰. توليد مثل در پرندگان اهلي (برگرداننده: م. ج. ضميري). انتشارات دانشگاه شيراز، چاپ اول. ص ۳۳٦-۲٦۹.

۲. ضميري، م. ج. ، م. ر. هاشمي و ع. بوستاني. ۱۳۸٤. ارزيابي چندين رقيق كننده براي نگهداري اسپرم خروس‌هاي بومي فارس در دماي ٥-٤ و ۲٤-۱۹ درجه‌ي سانتي‌راد. مجله‌ي علوم كشاورزي ايران، جلد ۳٦ (زير چاپ).

۳. معمار، م. و م. ج. ضميري. ۱۳۸٤. پراكنش فصلي ويژگيهاي مني و باروري خروس‌هاي بومي فارس. مجله علوم كشاورزي ايران، جلد ۳٦ (زير چاپ).

4. Ansah, G. A. & R. B. Buckland. 1982. Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels and the relationships of these lipids with fertility of frozen – thawed and fresh semen. Poultry Sci. 61: 623-637.

5. Bakst, M. R. 1980. Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. J. Repord. Fert. 60:121-127.

6. Blesbois, E., I. Grasseau, & J.C. Blum. 1993. Effects of vitamin-E on fowl semen storage at 4°C. Theriogenology 39:771-779.

7. Breque, C., P. Surai & J.-P.Brillard. 2003. Role of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molec. Reprod. Dev. 66:314-323.

8. Cecil, H.C. & M.R. Bakst. 1993. In vitro lipid peroxidation of turkey spermatozoa. Poultry Sci. 72:1370-1378.

9. Cerolini, S., K.A. Kelso, R.C. Noble, B.K. Speak, F. Pizzi & L.G. Cavalchini. 1997a. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. Biol. Reprod. 57:976-980.

10. Cerolini, S., P. Surai, A. Maldjian, T. Gliozzi & R. Noble. 1997b. Lipid composition of semen from different fowl breeders. Poult. & Avian Biol. Rev. 8:141-148.

11. Cerolini, S., F. Pizzi, T. Gliozzi, A. Maldjian, L. Zaniboni & L. Parodi. 2003. World's Poult. Sci. J. 59:65-75.

12. 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.
13. de Man, J.M. 1999. Principles of Food Chemistry. 3rd edn, An Aspen Publication. PP: 355-385.
14. Donoghue, A.M. & G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 213-232.
15. Douard, V., E. Blesbois, M. Magistrini, C. Labbe & D. Hermier. 2000a. Vitamin E and exogenous substrates do not change the phosphodipid loss in turkey semen stored in vitro. Poult. & Avian Biol. Rev. 11:293-294.
16. Douard, V., D. Hermeier & E. Blesbois. 2000b. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. Biol. Rep. 63: 1450-1456.
17. Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbe & E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology 61: 1-13.
18. Howarth, B., Jr. 1981. The phospholipid profile of cock spermatozoa before and after in vitro incubation for twenty-hours at 41 ˚C. Poultry Sci. 60:1516-1519.
19. Howarth, B., Jr., D. Torregrossa & W.M. Britton. 1977. The phospholipid content of the fowl and turkey spermatozoa. Poultry Sci. 56: 1265-1268.
20. Kelso, K.A., S. Cerolini, R.C. Noble, N.H.C. Sparks & B.K. Speake. 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. J. Reprod. Fert. 106: 201-206.
21. Kennedy, J.H., N. Korn & R.J. Thurston. 2003. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. Reprod. Biol. Endoc. 1: 74-80.
22. Lake, P.E. 1966. A cytochemical examination of the spermatozooan of the domestic fowl. Res. Vet. Sci. 7: 121-127.
23. Long, J.A. & M. Kramer. 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poultry Sci. 82: 1802-1807.
24. Maldjian, A., S. Cerolini, P. Surai & B.K. Speake. 1998. The effect of vitamin E, green tea extracts and catechin on the in vitro storage of turkey spermatozoa at room temperature. Poult. & Avian Biol. Rev. 9: 143-151.
25. Ressequie, W.D. & B.L. Hughes. 1984. Phospholipid and cholesterol profiles from chicken seminal components during in vitro storage at 5 ˚C. Poultry Sci. 63: 1438-1443.
26. Robertson, L., Y.I. Wilson, C. Lindsay & G.J. Wishart. 1998. Evaluation of semen from individual male domestic fowl by assessment of sperm perivitelline interaction in vitro and in vivo. Brit. Poult. Sci. 39: 278-281.
27. SAS. 1996. SAS/STAT Software: Changes and Enhancement Through Release 6.12 SAS Inst. Inc. Cary. NC.
28. Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender. 1- Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry Sci. 56: 1443-1446.
29. Schlegel, W., S. Rutermond, G. Farber & Nieschlag, E. 1981. The influence of prostaglandins on sperm motility. Prostaglandins 21: 87-99.
30. Surai, P.F., S. Cerolini, G.J. Wishart, B.K. Speake, R.C. Noble & N.H.C. Sparks. 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Poult. & Avian Biol. Rev. 9: 11-23.
31. Surai, P.F., R.C. Noble, H.C. Sparks & B.K. Speake. 2000. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. J. Reprod. Fert. 120: 257-264.
32. Wishart, G.J. 1984. Metabolism of fowl and turkey spermatozoa at low temperatures. J. Reprod. Fert. 70: 145-149.
33. Wishart, G.J. 1989. Physiological changes in chicken and turkey spermatozoa during in vitro storage. Brit. Poult. Sci. 30: 443-454.