

تاریخچه تلقیح مصنوعی^۱ در طیور

مترجم: مسعود برزگر

(دانشجوی دکتری تغذیه طیور- دانشگاه تهران)

(مسئول فنی شرکت گلبار شیمی دانه)

مقدمه

تلقیح مصنوعی به دلیل استفاده بهینه از خروس‌هایی که قادر به جفت‌گیری در شرایط طبیعی نیستند و همچنین کاهش نیاز به خروس در گله ابزار ارزشمندی به حساب می‌آید. این روش اولین ابزار زیست فناوری مورد استفاده است که به موجب آن عملکرد تولیدی افزایش یافته و امکان استفاده از خروس‌های با توانایی ژنتیکی بالا فراهم شده است (Benoff et al., 1981). تلاش‌های اولیه برای شروع تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش عملی توسط ایوانف در سال ۱۸۹۹ در روسیه آغاز شد که در این مورد بر روی حیوانات اهلی از جمله طیور مطالعه صورت گرفت (Ivanow, 1922). این روش در طیور حدود یک قرن پیش برای اولین بار انجام شد که طی آن ایوانف منی را از مجرای دفران خروس جمع‌آوری کرد و توانست تخم مرغ نطفه‌دار تولید کند (Ivanow, 1907). در خروس جمع‌آوری مصنوعی منی بوسیله ابزار ساخته شده توسط ایشیکاوا (۱۹۳۰) صورت گرفت. در سال ۱۹۳۵ باروز و کویین روش ماساژ شکمی در خروس را گزارش کردند. تکنیک جمع‌آوری منی برای تلقیح مصنوعی توسط کویین و باروز (۱۹۳۶) توسعه پیدا کرد. از این رو این محققین را به عنوان "پدر تلقیح مصنوعی طیور" می‌شناسند و روش آن‌ها در دیگر گونه‌های طیور نیز مورد استفاده قرار گرفته است.

تلقیح مصنوعی در مرغ‌های تخمگذار موجود در قفس در فلسطین اشغالی (Thumin, 1951) و استرالیا (Skaller, 1951) استفاده شد. در همان زمان تلقیح مصنوعی برای بهبود باروری جوجه گوشتی در آمریکا بررسی شد (Moultrie, 1956). در هند این روش توسط پروژه تحقیقاتی هماهنگ طیور هند^۲ در سال ۱۹۷۵ معرفی شد. به طور معمول برای تلقیح مصنوعی از منی تازه جمع‌آوری شده استفاده می‌شود زیرا جمع‌آوری آن آسان بوده و در مزارع اصلاح نژادی بزرگ برای تلقیح مرغ‌ها در کنار هم قرار دارند. از دهه ۱۹۶۰ این روش به عنوان جز اساسی در تولیدمثل بوقلمون و به طور انحصاری در گله‌های تجاری استفاده شد. به علت تفاوت وزن بین بوقلمون‌های نر (حدود ۳۳ کیلوگرم برای سویه‌های سفید بزرگ) و ماده (حدود ۹ کیلوگرم در شروع تخمگذاری) جفت‌گیری طبیعی آن‌ها موفقیت آمیز نبود که نتیجه آن کاهش باروری سویه‌های سینه پهن سنگین بود در نتیجه تلقیح مصنوعی در گله‌های تجاری مورد استفاده قرار گرفت (Lake, 1983; Donoghue and Wishart, 2000).

به علت وجود غده کفی در مخرج بلدرچین (Mohan et al., 2010; Shit et al., 2002) و مرغ شاخدار (Mohan et al., 2013) تلقیح مصنوعی به راحتی مورد استفاده نمی‌باشد. در غاز و اردک بر خلاف مرغ و بوقلمون، به دلیل عدم خروج اویداکت برای انجام تلقیح، استفاده از این روش دارای محدودیت است (Cooper, 1977). تلقیح مصنوعی به طور موفقیت‌آمیزی در مرغان ماهی‌خوار^۳ و دیگر پرندگان وحشی (Gee, 1995; Blanco et al., 2009) که از نظر حفاظت از گونه‌های در معرض خطر اهمیت دارند برای دستیابی

1 . Artificial Insemination (AI)

2 . All India Coordinated Research Project on Poultry

3 . cranes

به جمعیت پایدار و زنده استفاده شده است. بالغ بر ۱۰,۰۰۰ گونه پرنده شناخته شده است که ۱۳ درصد آن‌ها در خطر می‌باشند. این بدین معنی است که حدود ۱۳۷۵ گونه در خطر جدی انقراض قرار دارند (International Union for Conservation of Nature and Resources, 2018).

جمع‌آوری منی

برای دستیابی به یک تلقیح مصنوعی موفق آمیز داشتن نمونه منی تمیز با مقدار مناسب مورد نیاز است. در روش قدیمی جمع‌آوری منی، خروس با مرغ به طور طبیعی جفت‌گیری می‌کرد و به دنبال آن مرغ ذبح شده و منی از مجرای تخم‌بر برداشته می‌شد. به دلیل آن‌که این روش ناخوشایند بود روش ماساژ شکمی توسط باروز و کویین (۱۹۳۷) توسعه پیدا کرد. در این روش سفت‌شدن^۴ اندام جفت‌گیری^۵ و انزال در بوقلمون، پرندگان اهلی، مرغ شاخدار (Lake and Stewart, 1978)، بلدرچین (Marks and Lepore, 1965) و قرقاول (Spiller et al., 1977) به طور خود به خود در پاسخ به ماساژ شکم صورت می‌گیرد و بخش عمده اسپرماتوزوآ در اولین انزال خارج می‌شود. روش ماساژ شکمی برای دیگر گونه‌های پرندگان مثل اردک نر^۶ که اندام جفت‌گیری مشابه آلت تناسلی دارند نیز استفاده شد (Nishiyama et al., 1976). جمع‌آوری منی در بلدرچین ژاپنی توسط شیت و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد که لازم بود قبل از جمع‌آوری منی، ماده کفی که از غده کلوآک خارج می‌شد حذف گردد. در شترمرغ سانان برای جمع‌آوری منی با کیفیت مطلوب به جای روش ماساژ شکمی که حالت آزمایشگاهی دارد و برای این پرندگان غیر قابل اطمینان است از کلوآک مصنوعی استفاده می‌شود (Malecki et al., 2008). روش‌های مختلف جمع‌آوری منی در شترمرغ توسط روزنبوئیم و همکاران (۲۰۰۳) توضیح داده شده است.

عوامل مختلفی چون سن، فصل، برتامه نوری، وزن بدن، تغذیه، مدیریت و فرایند تولید اسپرم بر نحوه جمع‌آوری و کیفیت منی و باروری پرنده اثرگذار است (Maule, 1962; Sturkie, 1986; Mohan et al., 2016). جمع‌آوری منی از خروس‌ها ممکن است توسط نحوه گرفتن پرنده و سطح تجربه شخص تحت تأثیر قرار گیرد (Cooper, 1965). از خروس‌های لگهورن سفید در سن ۱۶ هفته (Lorenz and Lerner, 1946) و از بوقلمون‌ها در ۲۸ هفتگی (Carson et al., 1955) می‌توان منی جمع‌آوری کرد ولی برای داشتن منی با قدرت باروری بالاتر بهتر است جمع‌آوری منی در خروس در سن ۲۶ تا ۲۸ هفتگی و در بوقلمون‌ها ۳۲ تا ۳۶ هفتگی انجام شود. بالاترین میزان منی در بعد از ظهر که منطبق با رفتار جفت‌گیری پرنده است به دست می‌آید (Lake and Wood-Gush, 1956). در خروس‌ها میانگین حجم منی در نژادهای سبک ۰/۰۵ تا ۰/۵ میلی‌لیتر و در نژادهای سنگین ۰/۱ تا ۰/۹ میلی‌لیتر است. در بوقلمون‌های با وزن سبک این میزان ۰/۰۸ تا ۰/۳ و در سنگین وزن‌ها ۰/۱ تا ۰/۳۳ میلی‌لیتر می‌باشد (Lake and Stewart, 1978). توانایی باروری اسپم در خروس‌های بالای سه سال مشابه است ولی حجم منی با افزایش سن کاهش می‌یابد. بنابراین نگهداری نرهای با ارزش برای چندین فصل به منظور افزایش تولیدات طیور می‌تواند مفید باشد (Cooper, 1965). برای اطمینان از داشتن منی با کیفیت باید پرندگان نر چند روز قبل از انجام تلقیح مصنوعی، برای جمع‌آوری منی آموزش ببینند و به آن عادت کنند. زمانی که

4 . erection

5 . copulatory organ

6 . drakes

فالوس پرنده به مقعد خیلی نزدیک شود احتمال آلوده شدن منی با فضولات افزایش پیدا می‌کند. از این رو برای داشتن منی تمیز و عاری از فضولات، خوراک باید ۱۲ ساعت قبل از جمع‌آوری منی از دسترس پرنده خارج شود.

دفعات جمع‌آوری منی

تعداد دفعاتی که منی جمع‌آوری می‌شود تعیین کننده موفقیت تلقیح مصنوعی است و از طرفی کیفیت مطلوب اسپرم یک عامل مهم در تعیین سطح باروری می‌باشد (Tabatabaei, 2010; Beulah, 2017). باید توجه کرد که نسبت تحلیل رفتن اسپرم در مجرای واژدفرانس با طولانی شدن دوره بین جمع‌آوری منی افزایش می‌یابد. دلیل آن بازجذب اسپرم‌ها توسط سلول‌های آستری ویژه است و به این فرایند "واژولیگاسیون"^۷ می‌گویند (Tingari and Lake, 1972). بنابراین به منظور پایدار بودن کیفیت منی در خلال فصل جفت‌گیری، منی باید به دفعات مشخصی از نرها جمع‌آوری شود هر چند که این دفعات بین نژادها و گونه‌ها، متفاوت است. جمع‌آوری منی به میزان سه بار در هفته در حفظ اسپرم مطلوب و در نتیجه باروری کمک می‌کند (Lake and Stewart, 1978) این در حالی است که در اردک پکین^۸ جمع‌آوری منی به میزان دو بار در هفته نتیجه بهتری به همراه دارد (Nahak et al., 2015).

ارزیابی کیفیت منی

در طیور کیفیت منی تعیین کننده باروری و جوجه درآوری است (Peters et al., 2004) و پایه اصلی سودآوری شرکت‌های سرمایه‌گذار می‌باشد. دو علت عمده برای ارزیابی کیفیت منی وجود دارد یکی اطمینان از وجود نرهای تولیدکننده منی با کیفیت در گله و دیگری سنجش غلظت اسپرماتوزوآ و حجم منی است. این مورد امکان محاسبه رقت مناسب برای دستیابی به ۸۰ تا ۱۰۰ میلیون اسپرم به ازای هر تلقیح را فراهم می‌کند. در دهه‌های ۱۹۶۰ و ۱۹۷۰ تلقیح بر اساس حجم منی بود در دهه ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ پایه آن تعداد اسپرم به ازای هر تلقیح و در اواخر دهه ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ بر پایه تعداد اسپرم زنده در نظر گرفته می‌شد (Van Wambeke and Huyghebaert, 1989). تعیین غلظت اسپرم مزایایی دارد که از آن جمله می‌توان به فراهم کردن پایه‌ای برای محاسبه تعداد اسپرم به ازای هر تلقیح و ارزیابی کیفیت منی اشاره کرد (Bakst, 1993; Senger, 2003). منی جمع‌آوری شده در خروس‌های اهلی به طور میانگین حاوی ۵ میلیارد سلول اسپرم در هر میلی‌لیتر است (Gordon, 2005) که حافظ و حافظ (۲۰۰۰) این عدد را ۳ تا ۷ میلیارد به دست آورده‌اند. جنبایی اسپرم شاخصی از زنده بودن اسپرم و کیفیت نمونه منی است. ارزیابی جنبایی با استفاده از منی تازه و رقیق شده و بوسیله میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰) صورت می‌گیرد (Hafez and Hafez, 2000). جنبایی اسپرم در ابتدا برای تعیین باروری در پرندگان اهلی انجام شد (Donoghue et al., 1998). با این حال ارزیابی جنبایی به صورت چشمی را نمی‌توان نادیده گرفت (Peters et al., 2008). منی با کیفیت خوب ضخیم بوده و دارای رنگ سفید مرواریدی است (Cole and Cupps, 1977) و وجود رنگ‌های دیگر بیانگر وجود آلودگی است مثلاً رنگ زرد یا سبز نشان‌دهنده وجود ادرار یا مدفوع در نمونه منی است (Lake, 1983). وجود رنگ قرمز متمایل به قهوه‌ای یا رنگ قرمز بیانگر وجود خون است (Etches, 1996). با این حال منی پرندگان اهلی به لحاظ ظاهری از مات متراکم تا مایع آبکی شفاف متغیر است (Hafez, 1978; Mohan and Moudgal, 1996). وجود مایع شفاف بیش

7 . vasoligation

8 . Pekin duck

از حد در منی برای اسپرم ضرر دارد زیرا حاوی یون کلسیم بالا بوده و موجب جمع شدن اسپرم می شود (Mohan and Moudgal, 1996).

ریخت شناسی^۹ اسپرم می تواند به عنوان ابزاری برای ارزیابی کیفیت اسپرم به کار رود. بلسبوتیز (۲۰۰۷) روش رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین^{۱۰} را برای آزمون ریخت شناسی منی خروس توضیح داد. تنها اسپرم هایی که به لحاظ ریخت شناسی مطلوب هستند می توانند از طریق واژن مرغ ها به سمت لوله های ذخیره اسپرم^{۱۱} (SSTs) حرکت کنند (Bakst et al., 1994). آزمون های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای ارزیابی منی وجود دارند (Peters et al., 2008; Biswas et al., 2009; Mohan et al., 2013). به طور مرسوم ارزیابی منی با روش های آزمایشگاهی و بوسیله میکروسکوپ انجام می شود که در آن تعداد اسپرم، جنبایی پیش رونده (امتیاز ۱) (ضعیف) تا ۴ (بهرتر) و ریخت شناسی (آسیب دیده و ناقص) مورد آزمون قرار می گیرد. این مشاهدات کاملاً ذهنی هستند و برای رفع مشکلات ناشی از این نوع مشاهدات یک سامانه عکس برداری الکترونیکی سطح بالا برای مشاهده اسپرم و ارتباط آن با یک برنامه نرم افزاری پیشرفته برای ارزیابی تعداد بالای فراسنجه های اسپرم توسعه یافته است که تحت عنوان تجزیه و تحلیل اسپرم با کمک رایانه^{۱۲} (CASA) نامیده می شود. تجزیه و تحلیل اسپرم با استفاده از CASA دقیق و تکرار پذیر و برای تخمین توان باروری خروس ها بسیار کمک کننده است. در ابتدا CASA برای ارزیابی منی گونه های مختلف پستانداران که اسپرم آن ها کروی و دارای سر کوتاه است استاندارد سازی شد ولی برای ارزیابی ریخت شناسی اسپرم پرندگان که رشته ای شکل و دارای سر طویل و باریک هستند مناسب نبود (Santiago-Moreno et al., 2016). ویلاورد-مورسیلو و همکاران (۲۰۱۵) خصوصیات سر اسپرم خروس و کبک نر را با استفاده از میکروسکوپ نوری متصل به رایانه مورد بررسی قرار دادند. در خروس جنبایی و غلظت اسپرم با روش سنتیالگو-مورنو و همکاران (۲۰۱۲) و با استفاده از سامانه CASA همراه با میکروسکوپ فاز مخالف^{۱۳} و به کار بردن نرم افزار تحلیل کننده دسته اسپرم^{۱۴} ارزیابی شد. با روش مشابهی در خروس، داویلا و همکاران (۲۰۱۵) درصد جنبایی اسپرم، اسپرم غیر متحرک، جنبایی غیر پیش رونده (اسپرم-هایی که دور خود می چرخند ولی حرکت رو به جلو ندارند یا به آهستگی حرکت می کنند) و جنبایی پیش رونده (اسپرم هایی که با سرعت بالا و در یک خط مستقیم به جلو حرکت می کنند) را ثبت کردند. خصوصیات حرکتی اسپرم مثل سرعت حرکت در خط مستقیم^{۱۵} (VSL)، سرعت در مسیر خط-منحنی^{۱۶} (VCL) و میانگین سرعت مسیر^{۱۷} (VAP) نیز توسط CASA ارزیابی می شود. بر اساس سرعت کلی آن ها، اسپرم ها به سه دسته آهسته (کمتر از ۱۰ میکرومتر در ثانیه)، متوسط (۱۰ تا ۵۰ میکرومتر در ثانیه) و سریع (بیشتر از ۵۰ میکرومتر در ثانیه) طبقه بندی می شوند.

سید و همکاران (۲۰۱۷) جنبایی و سرعت حرکت اسپرم را در خروس های بومی مصر با استفاده از سامانه جدید CASA ارزیابی کردند. یک سامانه تجزیه و تحلیل کننده کیفیت اسپرم (sperm quality analyser (SQA)) می تواند به طور عملی و با هزینه کم برای ارزیابی و ایجاد شاخص کیفیت اسپرم (sperm quality index (SQI)) به کار رود. این شاخص بیانگر حرکت یا فعالیت اسپرم در نمونه

9 . morphology

10 . eosin-nigrosin staining technique

11 . sperm storage tubules (SSTs)

12 . computer assisted semen analysis (CASA)

13 . phase contrast microscope

14 . Sperm Class Analyzer software

15 . straight-line velocity (VSL)

16 . curvilinear velocity (VCL)

17 . average path velocity (VAP)

منی است (McDanielet al., 1998a) و جنبایی پیش‌رونده، غلظت و ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم را در نظر می‌گیرد. بر اساس تفسیر SQI، SQA به اعداد تافیق‌شده انفرادی اشاره دارد که پیش‌بینی کیفیت و کمیت کلی منی پرندگان را فراهم می‌کند (Wishart and Wilson, 1997; McDanielet al., 1998a; 1998b). آکاشی و همکاران (۲۰۰۵) یک همبستگی بالا بین غلظت، جنبایی و ریخت-شناسی اسپرم با سه روش SQA، CASA و روش دستی مشاهده کردند.

آزمایش بیوشیمیایی منی بوقلمون نشان‌دهنده فعالیت کمتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در آن نسبت به خروس است که دلیل آن می‌تواند حساسیت بیشتر این آنزیم به سمیت اکسیژن در مراحل برون‌تنی باشد (Froman and Thurston, 1984). براون و همکاران (۱۹۷۱) آنزیم‌های اسپرم‌ها را آزمایش کردند و در آن آزادسازی گلوتامیک اگزوالواستات ترانس‌آمیناز که بهترین شاخص برای آسیب سلول است انتخاب شد. اخیراً رونوشت‌های RNA به عنوان نشانگرهای زیستی ذاتی در باروری گونه‌های پستانداران توسعه پیدا کرده است و به دستورالعملی برای جداسازی و خالص‌سازی RNA اسپرم خروس نیز استانداردسازی شده است (Shafeequeet al., 2014). کیفیت باروری اسپرم‌ها می‌تواند به طور مستقیم بوسیله اسپرم‌های موجود در غشای پری‌ویتلین (Wishart, 1987) یا به طور غیرمستقیم با شمارش تعداد سوراخ‌های موجود در لایه داخلی پری‌ویتلین (Wishart and Wood, 1994) تعیین کرد.

رقیق‌سازی و دمای نگهداری منی

منی خروس بسیار غلیظ، ویسکوز و دارای حجم کم است و اگر به صورت رقیق نشده باقی بماند به سرعت تجزیه می‌شود (Lake and Stewart, 1978). رقیق‌کننده‌های منی^{۱۸} محلول‌های نمکی بافری هستند که برای افزایش حجم منی طراحی شده‌اند و محیط بهینه‌ای را برای اطمینان از زنده‌مانی، افزایش تعداد تلقیح در هر بار جمع‌آور (Vasicek et al., 2015) و توزیع یکنواخت اسپرم در رقیق‌کننده فراهم می‌کنند. ترکیب رقیق‌کننده‌ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی منی طیور استوار است (Lake, 1995) و فشار اسمزی (۳۳۰ تا ۴۰۰ میلی‌اسمول) و pH (۷/۰ تا ۷/۴) مشابه پلاسمای منی را (Thurston 1995; Miškejeet al., 2013) فراهم می‌کند. در ابتدا رقیق‌کننده‌ها از محلول سدیم کلراید تشکیل شده بودند که پس از آن ترکیباتی چون تنظیم‌کننده فشار اسمزی، مواد انرژی‌زا و بافرها نیز مورد استفاده قرار گرفتند (Bootwalla and Miles, 1992). برخی از رقیق‌کننده‌ها که تا ۲۴ ساعت می‌توانند اسپرم را ذخیره کنند شامل رقیق‌کننده لیک^{۱۹} (Lake, 1960)، رقیق‌کننده بلتسویل^{۲۰} (BPSE) (Sexton (1977)، رقیق‌کننده EK (Lukasiewicz, 2002) و رقیق‌کننده سلوتین^{۲۱} (Tselutinet al., 1995) هستند. علی‌رغم موفق بودن این روش‌ها در صنعت طیور طبق گزارشات تنوع زیادی در مورد باروری بوسیله این روش‌ها مشاهده شده است. اخیراً رقیق‌کننده CARI (Mohanet al., 2017b) معرفی شده است که بوسیله آن باروری در دیگر گونه‌های طیور بهتر بوده است. علاوه بر این محصولات، رقیق‌کننده‌های تجاری مثل گلو تاک^{۲۲} و لاگو^{۲۳} نیز به طور وسیعی در تلقیح مصنوعی پرندگان به کار می‌رود.

18. Semen diluents

19 . Lake diluent

20 . Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE)

21 . Tselutin extender

22 . Glutac (IMV Technologies, France)

23 . Lago avian semen extender (Hygieia Biological Laboratories, California)

به طور کلی دمای پایین (۵ درجه سانتی‌گراد یا کمتر) برای ذخیره منی به کار می‌رود. در این دما میزان سوخت و ساز اسپرم افت پیدا می‌کند و با توجه به اینکه دمای یخچال ۲ تا ۵ درجه سانتی‌گراد است بنابراین از لحاظ کاربردی این دما می‌تواند منطقی باشد (Sexton, 1977; Van Wambeke, 1978). بریلارد (۲۰۰۹) بیان کرد که برای ذخیره طولانی مدت، منی باید در دمای کم و در دامنه ۴ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار بگیرد. با این حال باید توجه کرد که دمای ذخیره‌سازی به صفر نرسد. دونوگو و ویشارت (۲۰۰۰) اظهار داشتند که برای داشتن باروری خوب منی ذخیره شده در شرایط برون‌تنی، نمونه‌ها باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. اسلانینا و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که می‌توان اسپرم بوقلمون را در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. موهان و همکاران (۲۰۱۷a, ۲۰۱۷b, ۲۰۱۷c) منی خروس را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و گزارش کردند که باروری خیلی خوب بوده است.

تلقیح مصنوعی مرغ‌ها

طی جفت‌گیری طبیعی در پرندگان، منی به طور معمول در قسمت کم عمقی از واژن ذخیره می‌شود. در زمان تلقیح مصنوعی لازم است که قسمت پشتی مجرای تخم‌بر (واژن) خارج شده و منی تا عمق ۲ تا ۴ سانتی‌متری (یا تا حد امکان نزدیک به لوله ذخیره اسپرم) تخلیه گردد تا از باروری مطلوب تخم مرغ تولیدی طی روزهای آینده اطمینان حاصل شود. در خروس معمولاً منی تا عمق ۲ الی ۳ (Artemenko and Tereshchenko, 1992) و گهگاه تا عمق ۳ تا ۴ سانتی‌متری واژن قرار می‌گیرد (Kurbatov et al., 1984). تخلیه منی تا عمق ۵ تا ۶ سانتی‌متری نیازمند استفاده از سرنگ تا رسیدن به رحم است که این نوع تلقیح برای سلامتی پرنده مضر بوده و باروری را کاهش می‌دهد (Artemenko and Tereshchenko, 1992).

بعد از بدست آوردن منی با کیفیت فرآیند تلقیح باید توسط دو نفر انجام گیرد (Quinn and Burrows, 1936). یک نفر با وارد آوردن فشار مناسب در سمت چپ شکم مرغ موجب خارج شدن واژن از کلوآک می‌شود. در همین زمان شخص دیگر منی را تا عمق ۲ تا ۴ سانتی‌متری واژن وارد کرده و همزمان فشار وارده بر شکم مرغ برداشته می‌شود. تلقیح می‌تواند توسط نی تلقیح^{۲۴}، سرنگ یا لوله پلاستیک استریل‌شده انجام گیرد. در مقیاس بزرگ‌تر از دستگاه‌های خودکار که حاوی نی‌های انفرادی است و غلظت مناسب منی وارد آن‌ها می‌شود استفاده می‌گردد. اگر مرغی به خوبی تخم‌گذاری را انجام دهد، خارج شدن مجرای تخم‌بر کار راحتی است. عمق وارد کردن منی به گونه پرنده و طول واژن بستگی دارد. اسپرم پرندگان به طور طبیعی در بخشی از واژن که کمتر از ۱ درصد اسپرم‌ها وارد SSTs می‌شوند تلقیح می‌گردند. SSTs در محل اتصال رحم- واژن^{۲۵} قرار دارند (Bakst et al., 1994). اسپرم‌ها در این مکان به مدت چند روز یا هفته ذخیره می‌شوند تا در فرآیند بارورسازی بعدی مشارکت کنند. بر طبق گفته حافظ و حافظ (۲۰۰۰) در پستانداران اسپرم مدت زمان نسبتاً کمی را در مسیر تولیدمثلی ماده سپری می‌کند در حالی که در خروس و بوقلمون اسپرم قبل از بارورسازی سلول زرده تخم مرغ مدت زمان بیشتری در مجرای تخم‌بر قرار دارد (بیش از ۳۲ روز در خروس و ۷۰ روز در بوقلمون). از SSTs اسپرم‌ها به سمت بخش‌های بالایی مجرای تخم‌بر تا دومین جایگاه ذخیره اسپرم (لانه اسپرم) واقع در محل اتصال مگنوم و اینفاندیبولوم مهاجرت می‌کنند. عبور تخمک از اینفاندیبولوم موجب تحریک آزاد شدن اسپرم از لانه اسپرم و انجام عمل لقاح می‌شود (Aisha and Zain, 2010).

24 . straw

25 . utero-vaginal junction

زمان تلقیح مصنوعی

زمان مناسب تلقیح (طبیعی یا مصنوعی) نقش مهمی در باروری ایفا می‌کند. در موقع عصر به دلیل آن که تشکیل پوسته تخم مرغ در رحم به ندرت انجام می‌شود از این رو تلقیح در بعد از ظهر یا عصر بازده باروری بالاتری نسبت به صبح دارد (Christensen and Johnston, 1977; Aisha and Zain, 2010). وجود تخم مرغ حاوی پوسته آهکی در رحم در نزدیکی زمان تلقیح موجب کاهش میزان باروری می‌شود. بیشتر اسپرم‌های تلقیح شده به مرغ یا بوقلمون ۱ تا ۳ ساعت پیش یا دقیقاً بعد از تخمگذاری به دلیل انقباض واژن از بین می‌روند (Brillard and Bakst, 1990). در مورد شترمرغ‌سانان، تلقیح ماده‌ها (۴۰۰ میلیون اسپرم به ازای هر ماده) در روز بعد از تخمگذاری طی صبح (ساعت ۰۹:۰۰ تا ۱۰:۰۰) موجب دوره باروری طولانی مدت (دو هفته) می‌شود (Malecki and Martin, 2004; Malecki et al., 2008). با این حال زمان مطلوب تلقیح مصنوعی همچنان نامشخص است (Malecki et al., 2008).

میزان اسپرم و تعداد تکرار تلقیح

برای حفظ سطح بالا و ثابتی از باروری طی فصل تولیدمثل باید تعداد حداقلی اسپرم با کیفیت خوب طی فاصله‌های منظمی تلقیح شود. این فاصله‌ها به نوع پرند بستگی دارد ولی به طور کلی در شرایط مزرعه‌ای حدود یک هفته است. اگر فاصله تلقیح بیش از یک هفته باشد باروری به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Sexton, 1977). میزان جوجه‌درآوری به دلیل وجود تخم‌های نابارور و افزایش تدریجی تلفات اولیه جنینی، کاهش می‌یابد (Lodge et al., 1971; 1974). طباطبائی (۲۰۱۰) گزارش کرد که با ۱۰۰ میلیون اسپرم ۸۸ درصد باروری در خروس‌ها مشاهده شد در حالی که بئولا (۲۰۱۷) این میزان را با ۸۹ میلیون اسپرم در لگهورن سفید ۹۴ درصد گزارش کرد. در نژادهای بومی (مثل گردن لخت)، موهان و همکاران (۲۰۱۸) ۸۹ درصد باروری با ۸۰ میلیون اسپرم را مشاهده کردند. هیچ مزیتی در تلقیح ۱۰۰ میلیون اسپرم ناز و با کیفیت به ماده‌ها در یک زمان گزارش نشد (Lake, 1983). زمانی که منی به مدت ۶ ساعت در دمای پایین ذخیره شد، ۱۲۵ تا ۱۵۰ میلیون اسپرم باید به هر پرند در هر هفته تلقیح گردد. بعد از ۲۴ ساعت ذخیره‌سازی منی پرندگان در دمای ۲ تا ۵ درجه سانتی‌گراد برای ایجاد سطوح بالای باروری به ۲۰۰ الی ۲۵۰ میلیون اسپرم نیاز است (Van Wambeke, 1987). موهان و همکاران (۲۰۱۷) میزان باروری بالا (۹۱/۰۷ درصد) بعد از ۲۴ ساعت ذخیره اسپرم با تلقیح تعداد ۸۹/۱۰ میلیون اسپرم به ازای هر تلقیح به دست آوردند. با انجماد عمیق منی^{۲۶} برای اطمینان از حد ایمن باروری به تعداد بیشتر (۲۵۰ میلیون) اسپرم نیاز است (Van Wambeke, 1986).

در پرندگان اهلی عواملی چون سن پرند، تعداد اسپرم و نوع مرغ (جوجه گوشتی یا مرغ تخمگذار) بر باروری تخم مرغ اثرگذار است (Talebi et al., 2009). دوار و همکاران (۲۰۰۳) اثر سن بر کیفیت منی را بررسی کردند و بیان داشتند که در سن ۴۷ هفتگی زنده‌مانی اسپرم ۱۵ درصد افت پیدا کرد. در ۵۲ هفتگی ۲۰ درصد کاهش جنبایی در بوقلمون گزارش شد. این محققین بالاترین میزان باروری را در زمان تلقیح مصنوعی بین سنین ۳۲ تا ۳۵ و ۳۹ تا ۴۲ هفته در مقایسه با ۴۴ تا ۴۷ هفتگی نرها نشان دادند (به ترتیب ۹۳/۹۰ و ۹۷/۵۰ درصد در برابر ۸۱/۸۰ درصد). با افزایش سن خروس‌ها (۴۴ تا ۵۲ هفته) افت کیفیت منی مشاهده شد. اسلانی و همکاران (۲۰۱۵) کیفیت بهتر منی بوقلمون‌های نر در سنین ۳۵ تا ۴۲ هفته نسبت به ۶۳ تا ۷۳ هفته را گزارش کردند. درویرز و بریلارد (۱۹۸۴) بیان داشتند که برای دستیابی به حداکثر باروری در مرغ‌های ۴۹ تا ۵۲ هفته به اسپرم بیشتری نسبت به مرغ‌های ۲۸ تا ۳۱ هفته نیاز است. بریلارد و مک‌دانیل (۱۹۸۶) اظهار کردند که باروری بالا (۹۳/۳ درصد) در مرغ‌های جوان که به

فاصله هر هفته تلقیح شدند تا تعداد متوسط (۱۲۵ میلیون) اسپرم حاصل می‌شود در حالی که در مرغ‌های مسن تعداد بیشتر اسپرم (۲۵۰ میلیون) برای حفظ این سطح از باروری نیز ناکافی است. بنابراین می‌توان گفت که در مرغ‌های مسن نسبت به مرغ‌های جوان اسپرم بیشتری در محل ذخیره اسپرم از بین می‌رود.

جوینر و همکاران (۱۹۸۷) بیان کردند که کاهش تولید تخم مرغ در پرندگان اهلی با افزایش سن می‌تواند به دلیل نازک شدن و شکستگی پوسته تخم مرغ باشد. مرغ‌های مسن تعداد تخم مرغ کمتری تولید می‌کنند ولی اندازه آن‌ها از تخم مرغ پرندگان جوان بزرگ‌تر است. سن به طور معنی‌داری بر میزان تخمگذاری (۷۵/۴ درصد برای مرغ‌های جوان و ۶۲/۶ درصد برای مرغ‌های مسن) و توالی تولید که به ترتیب ۷/۷ و ۲/۶ روز برای پرندگان جوان و مسن است اثر می‌گذارد. ویژگی مرغ‌های تخمگذار نسبت به مرغ‌های مادر گوشتی تولید تخم مرغ بیشتر با توالی طولانی‌تر است (Tumova and Gous, 2012).

اهمیت تلقیح مصنوعی نسبت به جفت‌گیری طبیعی

با استفاده از رقیق‌کننده‌های منی، نرهای برتری که قادر به جفت‌گیری طبیعی نیستند تا حد امکان توسط تلقیح مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از دیدگاه اقتصادی کاهش تعداد نر برای تلقیح، صرفه‌جویی در هزینه خوراک، حفظ فضای بیشتر پرورش و صرفه‌جویی در هزینه‌های کلی از مزایای تلقیح مصنوعی است. در جفت‌گیری طبیعی تعداد بالایی از نرها نسبت به ماده به میزان ۱ به ۱۰ مورد نیاز است ولی در تلقیح مصنوعی از یک خروس می‌توان برای تلقیح ۱۰۰ قطعه مرغ استفاده کرد. این مسئله موجب استفاده بیشتر از نرها، تشخیص مرغ‌های نامناسب برای تولید (۱۰ تا ۳۰ درصد) طی تلقیح مصنوعی و ابزرا کارآمد برای کاهش هزینه‌ها (حداقل ۲۰ درصد) می‌باشد (Hammerstedt, 1996). اخیراً موهان و شارما (۲۰۱۷) گزارش کردند که منی تازه (۵/۳۴ میلیارد اسپرم در هر میلی‌لیتر) به دست آمده از خروس (۰/۵ میلی‌لیتر) پس از رقیق‌سازی با CARI (۱ به ۶) که ۳۸ میلیون اسپرم به ازای هر تلقیح حاصل می‌کند (۰/۵ میلی‌لیتر منی رقیق‌شده) می‌تواند در هر روز به ۷۰ پرند تلقیح شود. با این روش بیش از ۹۰ درصد باروری حاصل شد. با استفاده از نر انفرادی در روزهای جایگزین (چهار بار در هفته) می‌توان ۲۸۰ پرند را تحت پوشش قرار داد در حالی که در شرایط طبیعی نسبت خروس به مرغ باید ۱ به ۸ باشد. در پرندگان، تلقیح مصنوعی نسبت به جفت‌گیری طبیعی باروری بهتری حاصل می‌کند (Brillard, 2003; Mohanet al., 2016). اگرچه جفت‌گیری طبیعی ممکن است موجب باروری خوبی شود ولی با استفاده از تلقیح مصنوعی در برنامه‌های تولیدمثلی می‌توان تعداد آن‌را به سادگی افزایش داد (Gee et al., 2004). مزایای باروری و جوجه‌درآوری کلی منجر به کاهش هزینه به ازای هر جوجه یک‌روزه متولد شده می‌شود (Brillard, 2003).

References

- AISHA, K. and ZAIN, U.A.(2010) Artificial Insemination in Poultry. Department of Pathology, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan.
- AKASHI, T., MIZUNO, I., OKUMURA, A. and FUSE, H.(2005) Usefulness of sperm quality analyzer-V (SQA-V) for the assessment of sperm quality in infertile men. Archives of Andrology 51 (6): 437-442.
- ARTEMENKO, A.B. and TERESHCHENKO, A.V.(1992) Dependence of hen fertility of the depth of AI with frozen sperm. Nauchno-tekhnicheskii bulletin of the Ukrainian Poultry Research Institute 32: 7-10.
- BAKST, M.R.(1993) Future developments in artificial insemination technology. Journal of Applied Poultry Research 2: 373-377.

BAKST, M.R., WISHART, G.J. and BRILLARD, J.P.(1994) Oviductal sperm selection transport and storage in poultry. *Poultry Science Review*5: 117-143.

BENOFF, F.H., ROWE, K., FUGUAY, J.I., RENDEN, J.A. and SCOTT, A.R.(1981). Effect of semen collector on semen volume and sperm concentration in broiler breeder males. *Poultry Science*60: 1062-1065.

BEULAH, P.V.(2017) Effect of different semen extenders on fertility of chicken spermatozoa during short term preservation. M.V.Sc Thesis, ICAR-Indian Veterinary Research Institute, India.

BEULAH, P.V.(2017) Effect of different semen extenders on fertility of chicken spermatozoa during short term preservation. M.V.Sc Thesis, ICAR-Indian Veterinary Research Institute, India

BISWAS, A., MOHAN, J. and SASTRY, K.V.H.(2009) Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. *British Poultry Science*50: 733-738.

BLANCO, J.M., WILDT, D.E., HOLFE, U., VOELKER, W. and DONOGHUE, A.M. (2009) Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*71: 200-213.

BLESBOIS, E.(2007) Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*63: 213-221.

BOOTWALLA, S.M. and MILES, R.D.(1992) Development of diluents for domestic fowl semen. *World's Poultry Science Journal*48: 121-128.

BRILLARD, J.P. and BAKST, M.R.(1990) Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. *Biology of Reproduction*43: 271-275.

BRILLARD, J.P. and McDANIEL, G.R.(1986) Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. *Poultry Science*65 (12): 2330-2334

BRILLARD, J.P.(2003) Practical aspects of fertility in poultry. *World's Poultry Science Journal*59: 441-446.

BRILLARD, J.P.(2009) Practical aspects of fertility in poultry. *Avian Biology Research*2: 41-45.

BROWN, K.I. GRAHAM, E.F. and CAROO, B.G.(1971) Some factors affecting loss of intracellular enzymes from spermatozoa. *Cryobiology*8: 220-224.

BURROWS, W.H. and QUINN, J.P.(1937) Artificial insemination of chicken and turkeys. *Poultry Science* 14: 251-254

CARSON, J.D., LORENZ, F.W. and ASMUNDSON, V.S.(1955) Semen production in the turkey male. 2. Age at sexual maturity. *Poultry Science*34: 344.

CHRISTENSEN, V.L. and JOHNSTON, N.P.(1977) Effect of time of day of insemination and the position of the egg in the oviduct on the fertility of turkeys. *Poultry Science*56: 458-462.

COLE, H. and CUPPS, P.T.(1977) Reproduction in domestic animals. 3rd Edition. Academic Press. New York. pp. 195.

COOPER, D.M.(1965) Artificial insemination in poultry. *World's Poultry Science Journal*21: 12-22.

COOPER, D.M.(1977) Artificial insemination, in: Gordon, R.F. (Eds)Poultry Disease, pp. 302-307 (Bailliere Tindall, London).

DAVILA, M.P., MUÑOZ, M.P., TAPIA, J.A., FERRUSOLA, O.C., DA SILVA, B.C.C. and PEÑA, F.J. (2015) Inhibition of mitochondrial complex i leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced atp production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility.PLoS ONE10 (9): e0138777.

DE REVIERS, M. and BRILLARD, J.P.(1984) Variations in the sperm production, the sperm output and in the number of sperms to be inseminated in aging broiler breeders. In: Proceedings of Abstract XVII World's Poultry Congress, Helsinki.

DONOGHUE, A.M. and WISHART, G.J.(2000) Storage of poultry semen.Animal Reproduction Science62: 213-232.

DONOGHUE, A.M. and WISHART, G.J.(2000) Storage of poultry semen.Animal Reproduction Science62: 213-232.

DONOGHUE, A.M., HOLSBERGER, D.R., EVENSON, D.P. and FROMAN, D.P.(1998) Semen donor selection by in vitro sperm mobility increases fertility and semen storage in the turkey hen. Journal of Andrology19: 295-301.

DOUARD, V., HERMIER, D., MAGISTRINI, M. and BLESBOIS, E.(2003) Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in Turkeys. Theriogenology59: 753-764.

ETCHES, R.J.(1996) Artificial insemination, in:Reproduction in poultry,pp: 234-262 (CAB International, Wallingford, UK).

FROMAN, D.P. and THURSTON, R.J. (1984) Decreased fertility resulting from treatment of fowl spermatozoa with neuraminidase or phospholipase C.Poultry Science63: 2479-2482.

GEE, G.F.(1995) Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds.Proceedings of the 1st International Symposium of AI in Poultry, Savoy, IL, pp. 262-279.

GEE, G.F., BERTSCHINGER, H., DONOGHUE, A.M., BLANCO, J.M. and SOLEY, J.(2004) Reproduction in nondomestic birds: Physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation.Avian Poultry Biology Reviews15: 47-101.

GORDON, I.(2005) Reproductive technologies in farm animals. CABI Publishing UK. Chapter: 1, pp.16 28

HAFEZ, B. and HAFEZ, E.S.E.(2000) Reproduction in Farm Animals. 7th ed. New York. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

HAFEZ, E.S.E.(1978). Reproduction in farm animal. 2nd edition, pp. 237.

HAMMERSTEDT, R.H.(1996) Artificial insemination using extended liquid semen: An old technology of great value to modern industry.USDA88: 3742- 3752

ISHIKAWA, H.(1930) Life duration of cock spermatozoa outside the body.Proceedings of 4th World's Poultry Congress,pp: 9.

IVANOW, E.I. (1922) On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia.Journal of Agricultural Science12: 244-256.

IVANOW, E.I.(1907) De la fécondation artificielle chez les mammifères. Archives of Biological Sciences12: 377-511.

JOYNER, C.J., REDDIE, M.J. and TAYLOR, T.G.(1987) The effect of age on egg production in domestic hens. General and Comparative Endocrinology65 (3): 331-336.

KURBATOV, A., NARUBINA, L., BUBLAYEVA, G. and TSELUTIN, K.(1984) Cryopreservation of cock sperm. Ptitsevodstvo(Moscow) 11: 28-29.

LAKE, P.E. and STEWART, J.M.(1978) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen- an improved method. British Poultry Science19: 187-194.

LAKE, P.E. and STEWART, J.M.(1978) Preservation of fowl semen in liquid nitrogen- an improved method. British Poultry Science19: 187-194.

LAKE, P.E. and WOOD-GUSH, D.G.M.(1956) Diurnal rhythms in semen yields and mating behaviour of the domestic cock. Nature London178: 853.

LAKE, P.E.(1960) Studies on the dilution and storage of fowl semen. Journal of Reproduction and Fertility1: 30-35.

LAKE, P.E.(1983) Factors affecting the fertility level in poultry, with special reference to artificial insemination. World's Poultry Science Journal39 (2): 106-117.

LAKE, P.E.(1983) Factors affecting the fertility level in poultry, with special reference to artificial insemination. World's Poultry Science Journal39 (2): 106-117.

LAKE, P.E.(1983) Factors affecting the fertility level in poultry, with special reference to artificial insemination. World's Poultry Science Journal39 (2): 106-117

LAKE, P.E.(1995) Historical perspective of artificial insemination technology, in: BAKST, M.R. & WISHART, G.J. (Eds) Proceedings of First International Symposium Artificial Insemination of Poultry, pp. 1-20 (Poultry Science Association Savoy, Illinois).

LODGE, J.R. FECHHEIMER, N.S. and JAAP, R.G.(1971) The relationship of in vivo sperm storage interval to fertility and embryonic survival in the chicken. Biology of Reproduction5: 252.

LODGE, J.R., AX, R.L. and FECHHEIMER, N.S.(1974) Chromosome aberrations in embryos from in vivo aged chicken sperm. Poultry Science53: 1816

LORENZ, F.W. and LERNER, I.M.(1946) Inheritance of sexual maturity in male chickens and turkeys. Poultry Science25:188-189.

ŁUKASZEWICZ, E.(2002) An effective method for freezing white Italian gander semen. Theriogenology58: 19-27.

MALECKI, I.A. and MARTIN, G.B.(2004) Artificial insemination in the emu (*Dromaius novaehollandiae*): effects of numbers of spermatozoa and time of insemination on the duration of the fertile period. Animal Science Papers and Reports22 (3): 315-323.

MALECKI, I.A., RYBNIK, P.K. and MARTIN, G.B.(2008) Artificial insemination technology for ratites: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture48: 1284-1292.

MALECKI, I.A., RYBNIK, P.K. and MARTIN, G.B.(2008) Artificial insemination technology for ratites: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*48: 1284-1292.

MARKS, H.L. and LEPORE, P.D.(1965) A procedure for artificial insemination of Japanese quail. *Poultry Science*44: 1001-1003.

MAULE, J.P.(1962) The semen of animals and artificial insemination. Common Wealth Agricultural Bureau, England.

MCDANIEL, C.D., HANNAH, J.L., PARKER, H.M., SMITH, T.W., SCHULTZ, C.D. and ZUMWALT, C.D.(1998a) Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. 1. Effects of altering sperm quality and quantity on the sperm motility index. *Poultry Science*77: 888-893.

MCDANIEL, C.D., PARKER, H.M., YEATMAN, J.B., SCHULTZ, C.D. and ZUMWALT, C.D.(1998b) Selection of young broiler breeder roosters for the sperm motility index increases the percentage of fertilized eggs produced for weeks. *Poultry Science*77 (1): 124 (Abstract).

MIŠKEJE, M., SLANINA, T., PETROVIČOVÁ, I. and MASSÁNYI, P.(2013) The effect of different concentration of fallopian tubes (oviducts) secretion extract on turkey spermatozoa motility in vitro. *Journal of Microbiology Biotechnology Food Science*2: 13.

MOHAN, J. and MOUDGAL, R.P.(1996) Biochemical characteristics of transparent fluid and its effect on in vitro storage of spermatozoa. *Indian Journal of Poultry Science* 31: 96-100.

MOHAN, J. and SHARMA, S.K.(2017) Recent advances in poultry semen diluents. *Proceedings of 26th Annual Conference of Society of Animal Physiologists of India*, Bidar, India, pp. 103-108.

MOHAN, J., KHANDAY, J.M., SINGH, R.P. and TYAGI, J.S.(2013) Effect of storage on the physico-biochemical characteristics and fertility of guinea fowl semen. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*1: 65-68.

MOHAN, J., KHANDAY, J.M., SINGH, R.P. and TYAGI, J.S.(2013) Effect of storage on the physico-biochemical characteristics and fertility of guinea fowl semen. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*1: 65-68.

MOHAN, J., MOUDGAL, R.P., SASTRY, K.V.H. and SINGH, R.(2002) Effects of hemicastration and castration on foam production and its relationship with fertility in male Japanese quail. *Theriogenology*58: 29-39.

MOHAN, J., SASTRY, K.V.H. and KATARIA, J.M.(2017b) A Process for the Preparation of CARI Poultry Semen Diluent in patent office New Delhi. Patent filed on 28/02/2017, Application number 201711007119.

MOHAN, J., SHARMA, S.K., KOLLURI, G., GOPI, M., TYAGI, J.S. and KATARIA, J.S.(2017a) Effect of different semen dilutors on fertilizing capacity of chicken semen stored for 24h. *Proceedings of XXVIII Annual Australian Poultry Science Symposium*, Sydney, Australia, pp. 260-263.

MOHAN, J., SHARMA, S.K., KOLLURI, G., GOPI, M., TYAGI, J.S. and SINGH, R.P.(2017c) Effect of various dilution rates on fertilizing ability of chicken spermatozoa using CARI diluent. *Proceedings of 34th Indian Poultry Science Association Conference*, Bengaluru, India. pp. 61.

MOHAN, J., SHARMA, S.K., KOLLURI, G., SINGH, R.P., TYAGI, J.S. and KATARIA, J.M.(2016) Semen quality characteristics and seasonality in different varieties of male guinea fowl. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*4 (6): 320-326.

MOHAN, J., SHARMA, S.K., KOLLURI, G., SINGH, R.P., TYAGI, J.S. and KATARIA, J.M.(2016) Semen quality characteristics and seasonality in different varieties of male guinea fowl. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 4 (6): 320-326.

MOULTRIE, F.(1956) A new technique for the artificial insemination of caged hens. *Poultry Science* 35: 1230.

NAHAK, A.K., GIRI, S.C., MOHANTY, D.N., MISHRA, P.C. and DASH, S.K.(2015) Effect of frequency of collection on seminal characteristics of White Pekin duck. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 4 (1): 70-73.

NISHIYAMA, H., NAKASHIMA, N. and FUJIHARA, N.(1976) Studies on the accessory reproductive organs in the drake, 1. Addition to semen on the fluid from the ejaculatory groove region. *Poultry Science* 55 (1): 234-242.

PETERS, S.O., OMIDIJI, E.A., IKEOBI, C.O.N., OZOJE, M.O. and ADEBAMBO, O.A.(2004) Effect of naked neck and frizzled genes on egg traits, fertility and hatchability in local chicken. *Proceedings of the 9th Annual Conference of Animal Science Association, Nigeria*, pp. 262-264.

PETERS, S.O., SHOYEBO, O.D., LLORI, B.M., OZOJE, M.O., IKEOBI, C.O.N. and ADEBAMBO, O. A.(2008) Semen quality traits of seven strain of chickens raised in the humid tropics. *International Journal of Poultry Science* 7: 949-953.

QUINN, J.P. and BURROWS, W.A.(1936) Artificial insemination in fowls. *The Journal of Heredity* 27 (1): 31-37.

REDDY, R.P.(1995) Artificial insemination of broilers economics and management implication. *Proceedings of the 1st International Symposium on the Artificial Insemination*, Savoy, I.L. pp. 73-89.

ROZENBOIM, I., NAVOT, A., SNAPIR, N., ROSENSHTRAUCH, A., EL HALAWANI, M.E., GVARYAHU, G. and DEGEN, A.(2003) Methods for collecting semen from the ostrich (*Struthio camelus*) and some of its quantitative and qualitative characteristics. *British Poultry Science* 44: 607-611.

SANTIAGO-MORENO, J., CASTANO, C., TOLEDANO-DIAZ, A., COLOMA, M.A., LOPEZSEBASTIAN, A., PRIETO, M.T. and CAMPO, J.L.(2012) Influence of season on the freezability of free-range poultry semen. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 578-583.

SANTIAGO-MORENO, J., ESTESO, M.C., VILLAVERDE-MORCILLO, S., TOLEDANO-DÍAZ, A., CASTAÑO, C., GIMENO MARTÍNEZ, J., VELÁZQUEZ, R., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. and LÓPEZ GOYA, A.(2016) Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology* 18 (6): 882-888.

SAYED, M.A.M., ABOUELEZZ, F.M.K., AMIRA, A. and ABDEL-WAHAB, M.(2017) Analysis of sperm motility, velocity and morphometry of three Egyptian indigenous chicken strains. *Egypt Poultry Science* (37) (IV): 1173-1185.

SENGER, P.L.(2003) *Pathways to pregnancy and Parturition*. (99164-6332) 2nd Ed. Pullman, Washington, USA. Siudzinska A and Lukaszewicz E (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology.

SEXTON, T.J.(1977) A new poultry semen extender 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Science* 56: 1443-1446.

SHAFEEQUE, C.M., SINGH, R.P., SHARMA, S.K., MOHAN, J., SASTRY, K.V.H., KOLLURI, G., SAXENA, V.K., TYGAI, J.S., KATARIA, J.M. and AZEEZ, P.A.(2014) Development of new method for sperm RNA purification in the chicken. *Animal Reproduction Science* 149: 259-265.

SHIT, N., SINGH, R.P., SASTRY, K.V.H., PANDEY, N.K., MOHAN, J. and MOUDGAL, R.P.(2010) Development of artificial insemination technology in Japanese quail. *Indian Journal of Poultry Science* 45: 50-54.

SHIT, N., SINGH, R.P., SASTRY, K.V.H., PANDEY, N.K., MOHAN, J. and MOUDGAL, R.P.(2010) Development of artificial insemination technology in Japanese quail. *Indian Journal of Poultry Science* 45: 50-54.

SINGH, R.P., SHAFEEQUE, C., SHARMA, S., SINGH, R., MAHARAJAN, M., SINGH, R., SASTRY, K. V.H., SAXENA, V.K., MOHAN, J. and AZEEZ, P.(2016) Effects of bisphenol-a on male reproductive success in adult kadaknath chicken. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 128: 61-66.

SKALLER, F.(1951) Artificial insemination applied on a large scale to poultry breeding research. *Official Report of 9th World's Poultry Congress, Paris*, pp.124.

SLANINA, T., PETROVIČOVÁ, L., MIŠKEJE, M., KŇÍŽAT, L., MIRDA, J., LUKÁČ, N., TRANDŽÍK, J., PETROVIČOVÁ, I. and MASSÁNYI, P.(2015) The effect of diluent, temperature and age on turkey spermatozoa motility in vitro, *Journal of Applied Animal Research* 43 (2): 131-136.

SPILLER, N., GRAHAME, I. and WISE, D.R.(1977) Experiments on artificial insemination of pheasants. *World Pheasant Association Journal* 2: 89-96.

STURKIE, P.D.(1986) *Avian Physiology*, 3rd Edition Springer-Verlag, New York, USA.

TABATABAEI, S. (2010) The effect of spermatozoa number of fertility rate of chicken in artificial insemination programs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (12): 1717-1719.

TABATABAEI, S. (2010) The effect of spermatozoa number of fertility rate of chicken in artificial insemination programs. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9 (12): 1717-1719.

TALEBI, A.R., BATAVANI, R.A. and TABATABAEI, S.(2009) Comparison of oviductal sperm age on fertility, hatchability and embryonic death rates in Iranian indigenous and Ross-308 broiler breeder chicken. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8: 85-89

THUMIN, A.(1951) Improvement in the technique of artificial insemination of chickens. *Official Report of 9th World's Poultry Congress, Paris*, pp.154.

THURSTON, R.(1995) Storage of poultry semen above freezing for twenty-four to forty-eight hours. *Proceeding of the First International Symposium on Artificial Insemination of Poultry*; 1994 June 17-19; Savoy (IL): Bakst and Wishart; pp. 107-122.

TINGARI, M.D. and LAKE, P.E.(1972) Ultrastructural evidence for resorption of spermatozoa and testicular fluid in the excurrent ducts of the testis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 31 (3): 373-381.

TSELUTIN, K., NARUBINA, L., MAVRODINA, T. and TUR, B.(1995) Comparison of cryoprotectants and method of cryopreservation of fowl spermatozoa. *British Poultry Science* 36: 805-811.

TUMOVA, E. and GOUS, R.M.(2012) Interaction of hens production type, age and temperature on laying pattern and egg quality. *Poultry Science* 91 (5): 1269-1275.

VAN WAMBEKE, F. and HUYGHEBAERT, G.(1989) Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. *British Poultry Science* 30: 461-469.

VAN WAMBEKE, F.(1978) The effect of storage time, dilution rate and number of spermatozoa on fertility and hatchability obtained with broiler breeders.Proceedings of 16th World's Poultry Congress,Brazil, pp. 148.

VAN WAMBEKE, F.(1986) Workshop on artificial insemination. Proceedings of 7th European Poultry Conference,Paris, pp.153-157

VAN WAMBEKE, F.(1987) Dilution and storage of fowl semen. Poultry Science87: 18-19.

VASICEK, J., KUZELOVA, L., KULIKOVA, B. and CHRENEK, P.(2015) Effect of diluent and storage time on sperm characteristics of rooster insemination doses. Avian Biology Research8 (1): 41-26.

VILLAYERDE-MORCILLO, S., ESTESO, M.C., CASTAÑO, C., TOLEDANO DÍAZ, A., LÓPEZSEBASTIÁN, A., CAMPO, J.L. and SANTIAGO-MORENO, J.(2015) Influence of staining method on the values of avian sperm head morphometric variables.Reproduction in Domestic Animals50: 750-755.

WISHART, G.J. and WILSON, Y.I.(1997) Sperm motility and metabolism IV. Sperm motility analysis using the ‘Semen Quality Analyzer’, in: BAKST, M.R. & CECIL, H.C. (Eds) Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination, pp. 54-55 (Poultry Science Association, Savoy, IL).

WISHART, G.J. and WOOD, L.K.(1994) Quantitation of holes hydrolyzed by spermatozoa in the perivitelline layer of laid eggs as a means of evaluating fertility. 9th International Poultry Breeders Conference, pp. 312-314. Glasgow, Scotland, U.K.

WISHART, G.J.(1987) Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviducal spermatozoa, as reflected by those trapped in laid eggs.Journal of Reproduction and Fertility80: 493-498.