الفصل الثالث

3- المواد وطرائق العمل Material and Methods

أجريت هذه الدراسة في حقل الطيور الداجنة في قاعة طائر السمان التابع لقسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة جامعة تكريت للمدة من 2012/12/18 ولغاية2013/2/21 إذ سبقتها مدة تمهيدية (prexperment) لتعويد الطيور على بيئتها الجديدة لمدة أربعة عشر يوماً لم تجمع البيانات فيها. وتهدف التجربة إلى دراسة تأثير استخدام نبات إكليل الجبل في عددٍ من الصفات الإنتاجية والفلسجية فضلاً عن دراسة صفات الخصية النسيجية لذكور طائر السمان الياباني *Coturnix coturnix japonica*.

1-3 الطيور المستخدمة في التجربة:

استخدم في هذه الدراسة 200 طيراً من طيور السمان الياباني البني *Coturnix coturnix japonica* بعمر يوم واحد تم الحصول عليها من قطيع الهيئة العامة للبحوث الزراعية – أبو غريب التابعة لوزارة الزراعة. غذيت على عليقة بادئ لغاية عمر (21) يوماً جدول رقم (1) ، وبعد هذا العمر تم تجنيس الأفراخ عن طريق لون الريش إذ ميزت الذكور عن الإناث عن طريق لون ريش الصدر الذي يكون بنياً محمراً وهذا الفارق المميز يجعل تمييز الجنس ممكناً عند عمر ثلاثة أسابيع أما الإناث فيكون فيها ريش هذه المنطقة رمادياً أو أبيضاً ويكون أطول وأكثر لمعاناً من ريش الذكور، فضلاً عن وجود الغدة التي تقع في مؤخرة الذكور وتسمى غدة المجمع(Cloacal) (Sanford،1957) ، وبعد التجنيس استخدم 72 طيراً (ذكر) وزنت فردياً ووزعت عشوائياً في أقفاص فردية بأبعاد(40×20×40سم) معدة للتربية على ست معاملات وبواقع 12 طيراً/معاملة إذ وزعت على 72 قفصاً وكان عمر الطيور عند البدء بالمعاملة ثمانية أسابيع. إذ جهز كل قفص من هذه الأقفاص بمنهل ومعلف خاص به.

جدول رقم(1) يوضح النسب والتركيب الكيميائي لعليقتي البادئ والإنتاجية لطائر السمان

المواد العلفيـــــة	عليقة البادئ (%)	العليقة الإنتاجية %
ذرة صفراء	53.6	58.2
كسبة فول الصويا (44 %)	37	30
*مركز بروتين حيواني	5	—
**بريمكس	—	2.5
زيت زهرة الشمس	3	2
حجر كلس	1.1	7
ملح طعام	0.3	0.3
المجموع	100	100
طاقة ممثلة (كيلوسعرة طاقة ممثلة/كغم علف)	2727	2618
بروتين خام(%)	22.83	18.14
الألياف الخام (%)	3.86	3.38
لايسين (%)	1.31	0.99
ميثايونين (%)	0.49	0.43
ميثايونين+ سستين(%)	0.86	0.78
كالسيوم(%)	0.39	2.66
الفسفور المتيسر (%)	0.47	0.47

* في ملحق (1)

** في ملحق (2)

2-3 إدارة الطيور:

تم تربية الأفراخ وتغذيتها بصورة جماعية من عمر يوم واحد لغاية عمر 3 أسابيع في حجرة بأبعاد(3×3 م²) معقمة، وتم استخدام نشارة الخشب فرشة للأرضية وبسمك 3-5 سم بعد وضع حاجز خشبي دائري في وسط الحجرة بارتفاع 40 سم وبقطر 180 سم، وبعد سبعة أيام من عمر الأفراخ وضع السلك المشبك على الحاجز الخشبي لمنع قفز وطيران الطيور واستخدمت الحاضنات الغازية لتدفئة الأفراخ في الأعمار المبكرة، وجهزت الحجرة بمحارير زئبقية لقياس درجة الحرارة وزعت في بداية ونهاية الحجرة وعلى ارتفاع 35-40 سم من الأرضية وجهزت الأفراخ بمعالف الأطباق البلاستيكية لوضع العلف فيها وكذلك بالمناهل المقلوبة فئة لتر إذ تم وضع الحصى في المنهل في الثلاثة أيام الأولى لمنع غرق الأفراخ فيه وبعد أسبوع تم استبدال المعالف الطبقية بمعالف معلقة مقلوبة حجم 5 كغم علف. وبعد وصول الطيور لعمر 21 يوماً نقلت إلى قاعة التربية بعد تجنيسها ووزنها بصورة فردية، إذ وزعت الطيور في أقفاص مؤلفة من ثلاثة طوابق ومقسمة على أقفاص بأبعاد (40 ×20 ×40) سم معدة لهذا الغرض ، وتم تقديم العلف في معالف خاصة مصنوعة محلياً إذ لا يمكن للطائر بعثرة العلف إذ إن طائر السمان يُعرَف بسلوكه الغريزي ببعثرة العلف ، وقدم الماء بمناهل مقلوبة سعة 1 لتر لكل قفص. وتم توزيع الطيور عشوائياً على المعاملات بعد ستة أسابيع وكالآتي:

1- المعاملة الأولى (T1) تمثلت بمعاملة السيطرة أي بدون إضافة أوراق إكليل الجبل.

2- المعاملة الثانية (T2) تم إضافة مسحوق أوراق إكليل الجبل بتركيز 1غم/كغم علف.

3- المعاملة الثالثة (T3) تم إضافة مسحوق أوراق إكليل الجبل بتركيز غم/كغم علف.

4- المعاملة الرابعة (T4) تم إضافة مسحوق أوراق إكليل الجبل بتركيز 4 غم/كغم علف.

5- المعاملة الخامسة (T5) تم إضافة مسحوق أوراق إكليل الجبل بتركيز غم/كغم علف .

6- المعاملة السادسة (T6) تم إضافة مسحوق أوراق إكليل الجبل بتركيز 16غم/كغم علف.

جدول (2) البرنامج الصحي الذي تم إتباعه لإجراء جميع التلقيحات المطلوبة لطائر السمان

العمر (بالأيام)	الإجراءات الوقاية والصحية
1	إعطاء ماء يحتوي على سكر بنسبة 50 غم/لتر
5-2	إعطاء مضاد حيوي Enrosol-s بمقدار 1 مل/1 لتر ماء
7	لقاح نيوكاسل مع ماء الشرب
10-7	إعطاء فيتامين C مع ماء الشرب بمقدار1.2 غم/10 لتر ماء
13-10	إعطاء فيتامين AD3 مع ماء الشرب بمقدار 5 مل /10 لتر ماء
17	لقاح نيوكاسل مع ماء الشرب
20-17	إعطاء فيتامين C مع ماء الشرب بمقدار 1.2 غم/10 لتر ماء
27	لقاح نيوكاسل مع ماء الشرب
30-27	إعطاء فيتامين C مع ماء الشرب بمقدار 1.2 غم/10 لتر ماء

3-3 الإضاءة:

تم تعريض الطيور إلى (24 ساعة) إضاءة خلال الأيام الثلاثة الأولى من التربية وبعدها تم خفض عدد ساعات الإضاءة إلى16 ساعة / يوم وبشكل تدريجي بمعدل27 دقيقة/ يوم نهاية الأسبوع الثالث، وباستخدام مصابيح ذات قوة 60 واط.

4-3 التغذية:

استخدمت في تغذية الطيور عليقة إنتاجية حسب الجدول رقم (1) عملت على تجهيز طاقة ممثلة مقدارها (2618) كيلو كلوري/كغم علف ونسبة البروتين (18.14%) وحسبت قيم العلائق وفق ما جاء في تقارير(NRC، 1994) وكان تقديم العلف والماء للطيور بشكل حر .وتم خلط مسحوق أوراق إكليل الجبل إذ جرى الخلط باستخدام خلاط كهربائي سعة (1 لتر) وبعد ذلك جرى تجنيس الكمية بشكل تام حسب النسب المضافة إلى كل معاملة وكانت هذه العملية تجرى كل أسبوعين.

5-3 استهلاك العلف:

تم حساب مقدار العلف المستهلك عن طريق وزن العلف المتبقي في نهاية كل اسبوعين وطرحه من العلف المقدم في بداية الأسبوعين لاستخراج معدل استهلاك العلف اليومي للطير الواحد (غم/طير/يوم) .

6-3 وزن الجسم:

تم حساب وزن الطيور كل أسبوعين بواسطة ميزان حساس نوعه (Acs price–computing scale) يقيس مرتبتين بعد الفارزة وذلك لمعرفة الزيادة الوزنية .

7-3 حساب أوزان الأحشاء الداخلية:

بعد مرور أربعة أسابيع من بدء التجربة تم ذبح أربعة طيور من كل معاملة وبعد ثمانية أسابيع من التجربة كرر العمل نفسه إذ كان مجموع الطيور الذبوحة ثمانية طيور إذ وزنت قبل وبعد عملية الذبح تم حساب وزن الخصيتان للطيور بواسطة ميزان حساس نوعه ستزن موديل Fr-H1200 وبدقة 1 . (مرتبتين بعد الفارزة) إذ تم الحفظ بالتجميد(–0 م°) خصية واحدة لغرض 1 الفحوصات المختبرية والخصية الأخرى فقد تم تثبيتها بمحلول الفورمالين (10%) لمدة يومين لغرض عمل المقاطع النسيجية عليه(علما أن عمل المقاطع النسيجية جرى بعد مرور ثمانية أسابيع على البدء بالمعاملة).

8–3 جمع نماذج الدم :

لغرض دراسة صفات الدم الفسلجية و الكيموحيوية جرى قطع الوريد الوداجي Jugular vein لأربعة ذكور من كل معاملة في نهاية كل مدة من مدد التجربة(بعد مرور 4 أسابيع و أسابيع) وجمع الدم في نوعين من الأنابيب الأولى تحتوي على مادة مانعة للتخثر(Potassium EDTA) كانت معدة لغرض دراسة كل من العدد الكلي لخلايا الدم الحمر RBC)Red blood cells) و الخلايا البيض White blood cells (WBC)، وحجم خلايا الدم المضغوطة Packed cells volume (PCV) وهيموكلوبين الدم Hemoglobin (Hb) o rro تقديرها على وفق ما أشار إليه (Campbell، 1995) أما الثانية فكانت

خالية من أي مادة وبعد تخثر الدم فيها وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة ربع ساعة لغرض الحصول على مصل الدم لإجراء الفحوصات الكيموحيوية للدم.

3-8-1 فحوصات الدم:

تحضير Natt and Herrick solution حسب الملحق رقم(3)

3-8-2 حساب عدد خلايا الدم الحمر(RBC):

تم تقدير العدد الكلي لخلايا الدم الحمر وفقاً لما جاء في Campbell (1995) باستخدام شريحة جهاز Haemocytometer إذ جرت عملية حساب عدد خلايا الدم الحمر باستخدام الماصة الخاصة لعد خلايا الدم الحمر، إذ تم سحب الدم إلى العلامة 5. وخفف مرة بسحب محلول Natt and Herrick إلى العلامة 101 ثم رجت الماصة بهدوء لمدة دقيقتين لخلط الدم مع المحلول بداخل الغرفة بعد ذلك تم التخلص من القطرات الأولى للمزيج، توضع قطرة من المزيج على شريحة العد(Haemocytometer chamber) تحت غطاء الشريحة وتترك على منصة الفحص لمده 2-5 دقائق وتم حساب عدد الخلايا باستعمال مجهر ضوئي، وجرى العد في المربع الكبير الوسطي المقسم بدوره على 5 مربعاً متوسط كل مربع يحتوي على 16 مربعاً صغيراً فعند العد تعد الخلايا الحمر بداخل 5 مربعات الوسطية (الأربعة في الأركان والمركزي) من مجموع ال25 مربعاً، ويتم حساب العدد الكلي لخلايا الدم الحمر وفق المعادلة الآتية :-

عدد الخلايا في 1مل^3 من الدم = عدد خلايا الدم الحمر في 5 مربعات × 10000

$$X = \frac{X}{80} \times 400 \times 200 \times 10$$

X= عدد خلايا الدم الحمر المحسوبة .

80 = عدد المربعات التي تم الحساب بها .

400 = عدد المربعات الكلية.

200 = نسبة التخفيف 1-200 .

1 = مقلوب ارتفاع المنصة الخاصة بجهاز العد ؛ يضرب العدد الناتج بهذا الرقم ليمثل عدد خلايا الدم الحمراء في 1 مل^3 من الدم.

3-8-3 حساب عدد خلايا الدم البيض(WBC):

تم تقدير العدد الكلي لخلايا الدم البيض وفق ما جاء في Campbell (1995) ، ولا تختلف طريقة عد الخلايا البيض عن طريقة عد الخلايا الحمر والطريقة المباشرة للحصول على العدد الكلي لخلايا الدم البيض هي أن تستخدم محلول Natt and Herrick للعينة نفسها التي استخدمت للحصول على العدد الكلي لخلايا الدم الحمر بالعد إلاَ إن العد يكون في المربعات التسع الكبيرة الموجودة في شريحة Haemocytometer ومن ثم نقوم باستخدام المعادلة الآتية:-

العدد الكلي لخلايا الدم البيض من الدم = {عدد الخلايا في 9 مربعات كبيرة + 10% من مجموع الخلايا البيض }×200 .

4-8-3 فحص حجم خلايا الدم المضغوطة(PCV):

تم استخدام الأنابيب الشعرية لتقدير حجم الخلايا المضغوطة إذ تم ملء الأنابيب إلى ما يعادل ثلثي الأنبوب ثم غلق الأنبوب باستخدام الطين الصناعي، ووضعت الأنابيب بصورة أفقية في جهاز الطرد المركزي الخاص لهذا الغرض Micro-hematocit centrifugeبسرعة 12000دورة لمدة 15 دقيقة بعدها تقاس النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المضغوطة باستخدام مسطرة خاصة Haematocrit Reader بحسب ما أشار إليه Campbell (1995).

5-8-3 تقدير هيموكلوبين الدم (Hb):

قيس تركيز هيموكلوبين الدم باستخدام عدة التحليل Kit المقدمة من شركة Syrbio Paris France وهي طريقة أنزيمية لونية وتمت قراءة النماذج عند طول موجي543ɳm باستخدام جهاز الطيف الضوئي وحسب تركيز الهيموكلوبين وفق المعادلة الآتية :

Hemoglobin concentration (g/ dL) with out standard = OD sample × 36.8

3-9 فحوصات الدم الكيموحيوية :

3-9-1 قياس فعالية الأنزيم الناقل لمجموعة الأمين (ALT) بالدم:

استخدمت عدة التحليل الجاهزة (Kit) المصنعة من شركة Spectrum المصرية إذ تم قياس فعالية أنزيمALT بوساطة جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي ɳm546 وتم تحديد الفعالية الأنزيمية عند درجة حرارة37°م لمدة 30 دقيقة واحتسبت معبراً عنها بوحدة عالمية / لتر IU/L و حسب طريقة العمل المرفقة من الشركة المصنعة.

3-9-2 قياس فعالية الأنزيم الناقل لمجموعة الأمين (AST):

استخدمت عدة التحليل الجاهزة (Kit) المصنعة من شركة Spectrum المصرية إذ تم قياس فعالية أنزيم AST بوساطة جهاز الطيف الضوئي عند طول موجي ɳm 546 وقد تم تحديد الفعالية الأنزيمية عند درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة واحتسبت معبراً عنها بوحدة عالمية / لتر IU /L و حسب طريقة العمل المرفقة من الشركة المصنعة.

3-9-3 قياس تركيز الكولستر :

استخدمت عدة الفحص الجاهزة (Kit) المصنعة من شركة Biolabo SA الفرنسية والرقم التسلسلي لعدة الفحصREF 80106 وREF87356 وREF87656 وهي طريقة إنزيمية لونية، وتمت قراءة النماذج عند طول موجي قدره (ɳm 500) باستخدام جهاز المطياف الضوئي وحسب تركيز الكولسترول وفق المعادلة الآتية :-

$$\text{Cholesterol concentration(mg/dL)} = \frac{\text{OD sample}}{\text{OD Standard}} \times \text{standard concentration (200mg/dL)}$$

3-9-4 قياس تركيز الكلوكوز:

استخدمت عدة الفحص الجاهزة (Kit) والمصنعة من شركة (Biolabo SA) الفرنسية والرقم التسلسلي لعدة الفحصREF87409) إذ جرى قراءة النماذج عند طول موجي قدره (ɳm505)، وتم حساب تركيز الكلوكوز على وفق المعادلة الآتية:

$$\text{Glucose concentration(mg/dL)} = \frac{\text{(A) sample}}{\text{(A) Standard}} \times \text{standard concentration (100 mg/dL)}$$

3-9-5 قياس البروتين الكلي:

استخدمت عدة الفحص الجاهزة (Kit) والمصنعة من شركة (Biolabo SA) الفرنسية والرقم التسلسلي لعدة الفحص REFLP87016، إذ جرى قراءة النماذج عند طول موجي قدره(550 ɳm)) وتم حساب تركيز البروتين الكلي وفق المعادلة الآتية:

$$\text{Total protein} = \frac{\text{(A) sample}}{\text{(A) standard}} \text{ X standard concentration (6gm/100ml)}$$

3-9-6 قياس تركيز الألبومين:

استخدمت عدة الفحص الجاهزة (Kit) والمصنعة من شركة (Biolabo SA) الفرنسية والرقم التسلسلي لعدة الفحص REF80002 ، إذ جرى قراءة النماذج عند طول موجي قدره(ɳm630)، وتم حساب تركيز الألبومين وفق المعادلة الآتية:

$$\text{Albumin(g/100ml)} = \frac{\text{(A)sample}}{\text{(A)standard}} \text{ X(5) standard concentration}$$

3-9-7 حساب تركيز الكلوبيولين:

تم حساب تركيز الكلوبيولين بمصل الدم حسب طريقة Bishop وآخرين (2000) وذلك بطرح الألبومين من تركيز البروتين الكلي في مصل الدم من خلال المعادلة الآتية :

globulin(gm/100ml)= Totalprotein _ Albumin

3-9-8 قياس حامض البولـ- :

استخدمت عدة الفحص الجاهزة (Kit) والمصنعة من شركة (Biolabo SA) الفرنسية ،إذ جرى قراءة النماذج عند طول موجي قدره (ɳm520)، وتم حساب تركيز حامض البوليك وفق المعادلة الآتية:

$$\text{Ureicaced(mg/100ml)} = \frac{\text{(A) sample}}{\text{(A)standard}} \text{ X6(mg/100ml)}$$

3-9-9 قياس هرمون التستستيرون:

تم حساب تركيز الهرمون باستخدام عدة الفحص الجاهزة المصنعة من شركة Bi0Check، Inc.323 Vintage park Drive Foster City.CA94404 في جهاز الايلايزا Enzyme_Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) وحسب طريقة العمل الخاصة بعدة الفحص.

3-10 قياس حالة مضادات الأكسدة:

3-10-1 تقدير مستوى بيروكسيدة الدهن في مصل الدم:

استخدمت طريقة تفاعل حامض الثايوباربيتيوريك Thiobarbituric acid (TBA) المحورة من قبل الباحثين Guidet و Shah (1989) وحسب هذه الطريقة تم قياس مستوى المالون داي الدهايد Malondialdehyde(MDA) الذي يمثل أحد النواتج الرئيسة لعملية بيروكسيدة الدهن ويعد مستواه مؤشراً لهذه العملية إذ يعتمد مبدأ التفاعل بين بيروكسيدات الدهون وخاصة المالون داي الدهايد مع TBA وطريقة العمل حسب ما جاء في الملحق رقم(4).

3-10-2 قياس حالة مضادات الأكسدة في نسيج الخصية و الكبد:

تم قياس حالة مضادات الأكسدة في نسيجي الخصية والكبد من خلال قياس مستوى الكلوتاثايون (GSH) وفقاً لطريقة Morno وآخرين(1979) في الملحق رقم (5) وقياس مستوى بيروكسيد الدهن كنواتج للأكسدة معبراً عنها بقياس مستوى المالون داي الديهايد (MDA) وفقا لطريقة Gilbert وآخرين (1984) في الملحق رقم (6).

3-11 طريقة تحضير المقاطع النسيجية:

بعد ذبح الطيور تم استئصال الخصية اليسرى وحفظت بالفورمالين (10%) لحين الثبات لغرض تحضير المقاطع النسيجية حسب طريقة Luna(1968)ملحق رقم(7).

3-11-1 قراءة المقاطع النسيجية:

تم اختيار أربع شرائح زجاجية تمثل الصورة النسيجية لخصية أربعة طيور من كل معاملة للمدة الثانية وتمت القراءة باستخدام مجهر مزود بعدسة خاصة معدة لهذا الغرض

مكونة من100 تدريجة تثبت في العدسة العينية للمجهر. ولأجل استخراج القياس بالمايكروميتير تم إيجاد معامل تحويل لكل عدسة من عدسات المجهر بالاستعانة بشريحة زجاجية تثبت على منصة المجهر مكونة من 100 تدريجة (مايكرون / تدريجة) وتم قياس الصفات الآتية:

(قطر النبيب المنوي(و قطر تجويف النبيب المنوي و سمك الطبقة الجرثومية و مساحة الطبقة الجرثومية ومساحة تجويف النبيب المنوي). جرى تقسيم المقطع النسيجي على أربعة حقول مجهرية وتم قياس أربعة نبيبات منوية من كل حقل وبواقع (16) نبيب/شريحة وبمعدل أربعة شرائح لكل معاملة.

وتم استخراج مساحة الطبقة الجرثومية (GA) ومساحة تجويف النبيب المنوي (LA) وفق المعادلتين الآتيتين:(طه،2008)

$$GA = \frac{\pi}{4} * \left(DS^2 - DL^2\right)$$

$$LA = \frac{\pi}{4} * DL^2$$

إذ إن DS= قطر النبيب المنوي.

DL^2= قطر تجويف النبيب المنوي

7/22 =π

12-3 قياس غدة الرغوة:

تم قياس الغدة يدوياً بواسطة قدمة قياس متحركة (فرنية) الكترونية وبوحدة قياس المليمتر(mm) وبواقع مرة كل أسبوعين إذ تم مسك الطائر باليد اليسرى ومسك الفرنية باليد اليمنى وبعد إزالة الريش المحيط بالغدة تم قياس المحور الطويل والمحور القصير للغدة و حسب حجم الغدة من خلال المعادلة الرياضية التي بينها الباحث (Chaturvedi وآخرون، 1993) وهي:−

حجم الغدة =3/4×3.5414 ×A×$(B)^2$

حيث أن A= (0.5 × المحور الطويل)

B= (0.5 × المحور القصير)

13-3 التحليل الإحصائي:

تم التحليل الإحصائي لنتائج التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل(CRD) وباستخدام طريقة النموذج الخطي العام (General Linear Mode) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز(SAS،2005)لدراسة تأثير العوامـ) وجرى اختبار دنكن (Duncan،1955) لتحديد معنوية الفروقات ما بين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى احتمالية ($p< 0.05$).

$$\mathbf{Y_{ij} = M + T_i + e_{ij}}$$

إذ إن :

Y_{ij}: قيمة المشاهدة (j) للصفة المدروسة العائدة لتأثير نبات الإكليل.

M : المتوسط العام للمجتمع .

T_i: تأثير المعاملة (i) (الأولى ، الثانية ، الثالثة ، الرابعة الخامسة السادسة).

e_{ij}: الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعاً طبيعياً مستقلاً بمتوسط قدره صفر وتباين $\delta^2 e$.