

DOI: 10.22034/AS.2021.37982.1547

بررسی تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بلدرچین ژاپنی بر عملکرد تولیدمثلی و فراسنجه‌های خونی

صالح طباطبائی وکیلی^{۱*}، صدیقه دارابی^۲، علی آقائی^۱ و محمدمین مهرنیا^۳

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۳

تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۸

^۱ به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم دامی دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
^۲ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
^۳ استادیار گروه صنایع غذایی دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

* مسئول مکاتبه: Email: tabatabaei@asnruk.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: تزریق عوامل محرک رشد به تخم نطفه‌دار پرندگان به منظور بهبود فراسنجه‌های تولیدمثلی و عملکردی مورد توجه می‌باشد. **هدف:** این تحقیق به منظور بررسی تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بلدرچین ژاپنی بر فراسنجه‌های تولیدمثلی و خونی انجام شد. **روش کار:** آزمایش با استفاده از ۶۰۰ عدد تخم بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۳۰ عدد تخم بلدرچین در هر تکرار انجام شد. گروه‌های آزمایشی شامل: گروه شاهد منفی (بدون تزریق)، شاهد مثبت (تزریق درون تخمی مخلوط آب و امولسیفایر) و تزریق درون تخمی اسانس آویشن نانوامولسیون شده در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام بود. تزریق محلول‌های آزمایشی به درون کیسه هوایی تخم‌ها در قبل از انکوباسیون آن‌ها انجام شد. پس از پایان انکوباسیون تخم‌ها در داخل دستگاه جوجه‌کشی، درصد هچ و تلفات رویانی در هر کدام از گروه‌های تیماری بررسی شد. سپس جوجه‌های هچ شده برای ارزیابی فراسنجه‌های خونی و خصوصیات دستگاه تناسلی به مدت ۸ هفته در بستر پرورش داده شدند. **نتایج:** نه تنها تیمارهای آزمایشی موجب بهبود درصد هچ کلی، هچ تخم‌های بارور و کاهش تلفات رویانی تخم‌ها نشدند ($P > 0.05$)، بلکه بالاترین دوز از نانوامولسیون آویشن (۱۵۰ پی‌پی‌ام) اثر مخربی بر این فراسنجه‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد داشت ($P < 0.05$). در پایان دوره پرورش، وزن و طول لوله‌های رحمی، وزن تخمدان، وزن و قطر فولیکول‌های F1 تا F3 در پرنده‌های ماده و نیز غلظت تستوسترون در پرنده‌های نر، تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P > 0.05$). غلظت استروژن سرم خون پرنده‌های ماده در اثر تزریق درون تخمی بالاترین دوز بالاتر اسانس آویشن نانوامولسیون شده در مقایسه با گروه شاهد مثبت بالاتر بود ($P < 0.05$). تری‌گلیسرید کل سرم در گروه تیماری دریافت‌کننده ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس نانوامولسیونی کمتر از گروه‌های شاهد بود ($P < 0.05$)، ولی میانگین مقادیر سایر فراسنجه‌های خونی در سایر گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه‌های شاهد معنی‌دار نبود. **نتیجه‌گیری نهایی:** به‌طور کلی، تزریق نانوامولسیون اسانس آویشن به کیسه هوای تخم بلدرچین ژاپنی به منظور بهبود عملکرد تولیدمثلی در این پرنده توصیه نمی‌شود.

واژگان کلیدی: آویشن، تولیدمثلی، فراسنجه‌های خونی، بلدرچین ژاپنی

مقدمه

برای دستیابی به حداکثر عملکرد جوجه‌درآوری در طیور، باید توجه زیادی به رشد و نمو جنین نمود (نوی و اسکالان ۱۹۹۹). عوامل متعددی از جمله باروری تخم، مواد مغذی تخم، شرایط دستگاه جوجه‌کشی و مدیریت هچری بر قابلیت جوجه‌درآوری موثر هستند (آراجو و همکاران ۲۰۱۶). در مراحل پایانی نمو جنینی منابع مغذی موجود در مایع آمنیوتیک به وسیله جنین مورد استفاده قرار می‌گیرند و پس از هضم از طریق روده جنین جذب می‌شوند. جنین جوجه‌ی گوشتی برای تامین احتیاجات خود به مواد مغذی و به منظور تکمیل مراحل مختلف رشد و نمو جنینی، وابستگی زیادی به مرغ مادر دارد. کمبود منابع مغذی در مرغ مادر طی تشکیل تخم‌مرغ نطفه‌دار، اثرات منفی‌ای بر رشد و نمو جنینی تخم‌های آن خواهد داشت (موران ۲۰۰۷). تغذیه اگزوزنوس جنین با استفاده از مکمل‌های مغذی، می‌تواند به تامین احتیاجات جنین در طی دوره جوجه‌کشی به خصوص در شرایط کمبود منابع مغذی تخم مرغ کمک نماید. گزارش شده است که تزریق مکمل‌های غذایی به داخل تخم پرندگان، باعث بهبود نرخ جوجه‌درآوری، کاهش نرخ مرگ و میر، کوتاه شدن طول مدت پرورش، سرعت رشد بالا و افزایش وزن پایان دوره‌ای جوجه‌ها می‌شود (جانسون و همکاران ۱۹۹۷). تحقیقات زیادی به منظور بهبود رشد و نمو جنین از طریق دستکاری مواد مغذی تخم مرغ صورت گرفته است.

فن‌آوری تزریق داخل تخم مرغ نه تنها روشی برای واکسیناسیون پرندگان بر علیه برخی از بیماری‌ها است، بلکه روشی عملی در تزریق برخی از مواد مغذی مورد نیاز جنین در حال رشد است (فوی و همکاران ۲۰۰۵ و یونی و همکاران ۲۰۰۵). تجویز عوامل محرک رشد تکمیلی به داخل تخم پرندگان می‌تواند به رشد و نمو بهتر جنین و غلبه بر محدودیت‌های موجود در تخم کمک نمایند (کادام و همکاران ۲۰۰۸ و تاکو و همکاران ۲۰۰۴).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) یکی از شناخته‌ترین گیاهان دارویی و از تیره نعنائیان می‌باشد. آویشن گیاهی درختچه‌ای، کوتاه و پرشاخه است و شاخه‌های علفی آن پوشیده از برگ‌های متقابل و نازک می‌باشد. محل رویش اولیه آن مدیترانه بوده و در حال حاضر در باغ‌ها و مزارع به عنوان گیاهی معطر و دارویی کشت می‌شود. اسانس‌ها (روغن‌های ضروری) شامل مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فرار و غیرفرار تولید شده توسط گیاهان معطر به عنوان متابولیت‌های ثانویه می‌باشند (باکالی و همکاران ۲۰۰۸). اجزای اصلی روغن‌های ضروری تجاری را می‌توان به سه دسته فنل‌ها، ترپن‌ها و آلدئیدها تقسیم‌بندی کرد (بارت ۲۰۰۴ و سیلان و فانگ ۲۰۰۴). اسانس آویشن مایعی است زرد یا قهوه‌ای مایل به قرمز تیره با بوی مطبوع قوی و طعم تند و پایدار و خنک کننده، که از تقطیر برگ‌ها و سرشاخه‌های گل‌دار آن استخراج می‌شود و ترکیبی از مواد شیمیایی مختلف است (مومنی و شاهرخی ۱۹۹۲). اسانس این گیاه، به دلیل دارا بودن ترکیبات مونوترپنی فنلی، یکی از مؤثرترین اسانس‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به شمار می‌رود (ساعی دهکردی ۲۰۱۰). در غربالگری فیتوشیمیایی از عصاره اتانولی این گیاه، فلاونوئیدهایی شناسایی شده است که عمدتاً تیمول، کارواکرول، پی‌سیمن و گاماترپینن می‌باشند (داکان و عبدالله ۲۰۱۷). ترکیب اصلی روغن استخراج شده از آویشن تیمول است. تیمول جزء اصلی فنولی این اسانس است که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیرومندی می‌باشد (داکان و عبدالله ۲۰۱۷). لذا با توجه به خاصیت آنتی-اکسیدانی اسانس آویشن و نقش آن در بهبود رشد رویانی و عملکرد پرند، مطالعه حاضر برای اولین بار در بلدرچین ژاپنی اجرا شد.

استفاده از نانوامولسیون می‌تواند یک انتخاب عالی برای استفاده از اسانس‌ها در مواد غذایی باشد (جو و همکاران ۲۰۰۵). تغییر اندازه ذرات به نانو ذره (اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر) سبب افزایش نسبت سطح به حجم و افزایش

مدت ۳ دقیقه جهت خرد کردن اجزا و تهیه محلول همگن قرار گرفت تا امولسیون درشت اولیه‌ای به دست آید. سپس امولسیون اولیه به مدت ۱ دقیقه تحت هم‌ژنایز اولتراسونیک قرار گرفت (هشتجین و عباسی ۲۰۰۵) تا محلول‌های نانوامولسیونی شده‌ای از اسانس آویشن آماده شود. این محلول‌ها قبل از تزریق به درون تخم بلدرچین با فیلتر سرسرنگی و اشعه UV سترون شدند. تحقیق حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۴ تکرار و ۳۰ عدد تخم بلدرچین در هر تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: بدون تزریق (شاهد منفی)، تزریق آب و امولسیفایر به ترتیب با نسبت‌های ۹۸٪ و ۲٪ وزنی- وزنی (شاهد مثبت)، نانوامولسیون اسانس آویشن (در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام) به درون کیسه هوای تخم بلدرچین‌ها. تزریق تیمارها بلافاصله قبل قرار دادن تخم‌ها به درون دستگاه جوجه‌کشی انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا پوسته تخم در محل کیسه هوا با پنبه آغشته به الکل ضدعفونی شده و سپس محلول‌های مربوط به تیمارها در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به وسیله سرنگ انسولین به کیسه‌هوای تخم بلدرچین‌ها تزریق و محل سوراخ پوسته با پارافین مذاب مسدود شد. سپس تخم‌ها به درون دستگاه جوجه‌کشی منتقل شدند. پس از پایان انکوباسیون، میزان باروری (تعداد تخم‌های هچ نشده دارای رویان به‌علاوه تعداد تخم‌های هچ شده تقسیم بر تعداد تخم‌های انکوبه شده ضرب در ۱۰۰)، هچ کلی (تعداد تخم‌های هچ شده تقسیم بر تعداد کل تخم‌های انکوبه شده ضربدر ۱۰۰)، هچ تخم-های بارور (تعداد تخم‌های هچ شده تقسیم بر تعداد تخم-های دارای رویان ضربدر ۱۰۰)، تلفات رویانی و سن تلفات رویانی تعیین شد. جهت بررسی درصد مرگ و میر رویانی در طول دوره انکوباسیون، تخم بلدرچین‌هایی که هچ نشده بودند شکسته و تخم‌های دارای تلفات رویانی جدا شدند. سپس برای تعیین مرحله‌ای از تلفات رویان،

واکنش‌پذیری شده و این امر سبب می‌شود تا اثربخشی مواد بعد از کوچکتر شدن به ابعاد نانو بیشتر شود (هرناندز سایر و همکاران ۲۰۰۸). اندازه بسیار کوچک نانولیپوزوم سنتز شده از ترکیبات اسانسی می‌تواند با افزایش اثر ضد میکروبی همراه باشد (کریشنا و همکاران ۲۰۱۱). با توجه به احتمال رشد عوامل عفونی در دوره انکوباسیون تخم‌ها و امکان ورود آن‌ها به درون تخم، به نظر می‌رسد اسانس‌های گیاهی بخصوص با ذرات نانو، با خاصیت ضد میکروبی خود در کنار اثر آنتی‌اکسیدانی بتوانند سبب رشد و نمو بهتر جنین پرندگان شوند. با توجه به این نکات، هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تزریق اسانس آویشن نانوامولسیون شده به تخم بلدرچین ژاپنی بر فراسنجه‌های تولیدمثلی و خونی در این پرنده بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در ایستگاه تحقیقاتی دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۵ کیلومتری شهر اهواز انجام شد. نسبت بلدرچین نر به ماده در گله مادر، ۱ به ۳ بود و در تمام مراحل آزمایش پرندگان دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. در مرحله تولید، طول روشنایی در شبانه‌روز به ۱۶ ساعت و طول تاریکی به ۸ ساعت تنظیم شده بود. تعداد ۶۰۰ تخم بلدرچین ژاپنی از پرندگان ۲ تا ۳ ماهه در طی مدت ۵ روز جمع‌آوری شد. تخم‌های جمع‌آوری شده در هر روز، در اتاقی با دمای پایین‌تر از ۱۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اسانس آویشن از شرکت طبیب داروی کاشان خریداری شد. به منظور تهیه نانوامولسیون، ابتدا اسانس و امولسیفایر توین ۸۰ را به نسبت‌های مساوی (۲٪ وزنی- وزنی) با آب مقطر (۹۶٪ وزنی- وزنی) مخلوط کرده و سپس محلول حاصل تحت دستگاه هم‌ژنایزر دور بالا (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) به

مرگ و میرهای صورت گرفته در دوره انکوباسیون به سه مرحله: ۱ تا ۹ روزگی (پیدا بودن سیاهی چشم و عدم وجود پر)، ۱۰ تا ۱۷ روزگی (رویای دارای پر و زرده نمایان) و ۱۷ تا ۱۸ روزگی (رویای رشد یافته کامل بدون زرده در خارج بدن) تقسیم شدند (آیگان و سرت ۲۰۱۲). جوجه‌های تفریخ شده مربوط به هر تیمار و تکرار پس از شمارش، توزین شده و سپس به پن‌های مخصوص خود در سالن پرورش منتقل شدند. جیره مورد استفاده برای تمام گروه‌ها در طول دوره آزمایشی یکسان و بر

اساس توصیه انجمن ملی تحقیقات (۱۹۹۴) تنظیم شد (جدول ۱). در پایان هفته هشتم پرورش، از هر تکرار یک پرنده نر و یک پرنده ماده به صورت تصادفی انتخاب و بعد از خونگیری و جداسازی پلاسما، برخی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی و هورمونی (غلظت استروژن، تستوسترون، گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین کل، HDL و LDL) تعیین گردید. سپس پرندگان منتخب برای بررسی خصوصیات مورفومتریک دستگاه تناسلی کشتار شدند.

Table 1- The nutrients and chemical composition of the japanese quail diets

جدول ۱- مواد مغذی و ترکیب شیمیایی جیره‌های بلدرچین ژاپنی

Nutrients (%)	
Corn	52.00
Soybean meal	39.40
Fish meal	3.40
Vegetable oil	2.04
Oyster	1.43
Di-calcium phosphate	0.70
Salt	0.30
Methionin	0.18
Lysine	0.05
Vitamin supplement ¹	0.25
Mineral supplement ²	0.25
Composition (%)	
Metabolic energy (Kcal/kg)	2900
Protein	20.00
Calcium	0.95
P available	0.63
Lysine	1.40
Methionine	0.57
Sodium	0.16
Methionine+Cysteine	0.7

1. vitamin supplements (values per kg of diet): Vitamin A, 3300 IU; vitamin E, 25 IU; vitamin K3, 1 mg; vitamin B1, 2 mg; vitamin B2, 9 mg; vitamin B5, 10 mg; vitamin B3, 45 mg; vitamin B6, 4mg; vitamin B9, 1.2 mg; vitamin B12, 0.015 mg; vitamin H2, 0.13 mg. 2. Mineral supplements (Values per kg diet): manganese, 60 mg; zinc, 50 mg; iron, 60 mg; copper, 5 mg; iodine, 0.3 mg and selenium, 0.2 mg.

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + E_{ij}$$

Y_{ij}: مشاهدات مربوط به صفات

μ: میانگین کل مشاهدات

T_i: اثر تیمار

E_{ij}: اثر خطا

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه واریانس قرارگرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. مدل آماری طرح به شرح زیر می‌باشد:

نتایج و بحث

تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون کیسه هوای تخم بلدرچین ژاپنی بر فراسنجه‌های تولیدمثلی در جدول ۲ ارائه شده است. درصد باروری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ($P > 0.05$). تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد بدون تزریق، نه تنها موجب بهبود هیچ کلی، هیچ تخم‌های بارور و زنده‌مانی رویان نشدند، بلکه تیمار تزریق ۱۵۰ پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس آویشن باعث کاهش درصد این فراسنجه‌ها شد ($P < 0.05$) که احتمالاً مرتبط با به هم خوردن تعادل مواد مغذی تخم و فعال شدن مسیره‌های آپوپتوتیک در صورت استفاده از سطح بالای نانوامولسیون اسانس باشد (آیگان ۲۰۰۶ و جمالی و همکاران ۲۰۱۸). همچنین، جنین طیور در تنظیم فشاراسمزی محیط بسته تخم، با محدودیت مواجه است. لذا، تغییرات فشاراسمزی ناشی از تزریق محلول با غلظت زیاد به داخل تخم می‌تواند برای بقای جنین تهدیدکننده باشد (یونی و همکاران ۲۰۰۵). میزان تلفات اوایل رویانی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نداشت ($P > 0.05$). با این حال، تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس آویشن بیشترین تلفات واسط و اواخر رویانی را موجب شد ($P < 0.05$). کمترین تلفات اواخر رویانی به لحاظ عددی، مربوط به تیمار نانوامولسیون ۵۰ ppm اسانس آویشن است که با

اختلاف غیرمعنی‌دار، کمتر از گروه‌های شاهد منفی و مثبت مشخص بود ($P > 0.05$). در تحقیقی، تزریق سطوح مختلف نانوسیلور و عصاره آویشن به تخم مرغ تأثیر معنی‌داری بر میزان جوجه‌درآوری نداشت (ساکو و همکاران ۲۰۱۵) که مخالف با یافته‌های پژوهش حاضر در بلدرچین ژاپنی می‌باشد. پریزادیان و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش کردند که تزریق درون تخم مرغی عصاره مرزه خوزستانی با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مشابه با آویشن، بر قابلیت جوجه‌درآوری تأثیر معنی‌داری نداشت. همچنین با تزریق غلظت‌های مختلف عصاره برگ زیتون به تخم مرغ‌های گوشتی در روز هجدهم جوجه‌کشی، تأثیری بر نرخ جوجه‌درآوری مشاهده نشد (کشاورز معتمدی و همکاران ۲۰۰۸). در گزارش دیگر، تزریق درون تخم مرغی عصاره بره‌موم که از لحاظ دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی مشابه با آویشن است، موجب کاهش نرخ جوجه‌درآوری در بلدرچین ژاپنی شد. همچنین، تزریق دوز بالای این عصاره در مقایسه با سطح پایین آن، افزایش نرخ تلفات اواخر رویانی را به دنبال داشت که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد (آیگان ۲۰۱۶). گذشته از عواملی مانند سن گله مادری، نطفه‌دار بودن تخم‌مرغ‌ها و شرایط بهداشتی و محیطی دستگاه جوجه‌کشی، عواملی مانند ماهیت ماده تزریقی، محل تزریق و میزان ماده تزریقی نیز می‌توانند بر میزان جوجه‌درآوری تخم مرغ‌ها موثر باشند (قائم ۲۰۱۵).

Table 2- Effect of intra egg injection of different levels of Thyme essential oil nanoemulsion on fertility, hatchability and embryonic death in Japanese quail

جدول ۲- تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بر میزان باروری، هج و تلفات رویانی در بلدرچین ژاپنی

Parameters (%)	Thyme essential oil nanoemulsion (ppm)				SEM	P-value
	E ¹	50	100	150		
Fertility ³	93.92	94.93	91.66	91.90	95.44	0.86
Total hatchability ⁴	70.70 ^a	71.72 ^a	57.54 ^{ab}	26.27 ^b	68.93 ^a	4.91
Hatch of fertilized eggs ⁵	75.55 ^a	75.47 ^a	62.68 ^a	28.68 ^b	72.13 ^a	5.15
Embryonic mortality	24.44 ^b	24.53 ^b	37.31 ^b	71.32 ^a	27.87 ^b	5.14
Early embryonic mortality	9.49	6.42	7.48	9.97	7.98	1.12
Mid embryonic mortality	4.34 ^b	9.61 ^b	14.87 ^b	33.81 ^a	8.77 ^b	2.95
Late embryonic mortality	10.60 ^b	8.49 ^b	14.95 ^{ab}	27.54 ^a	11.11 ^b	2.16

SEM: Standard error of means. In each row, means with non-similar letters are different (P<0.05).

¹Emolifier injection, ²Control (without injection), ³Fertility: number of fertile eggs/number of total eggs set in the incubator; ⁴Total hatchability: number of eggs hatched out/number of eggs set in the incubator; ⁵Hatch of fertilized eggs: number of eggs hatched out/number of fertile eggs.

غلظت هورمون استروژن سرم خون بلدرچین‌های ماده در سطح ۱۵۰ پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس آویشن به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد مثبت آب و امولسیفایر بود (P<۰/۰۵). فلاونوئیدهای گیاهی از جمله آویشن دارای خواص فیتواستروژنی هستند که عملکردی مشابه استروژن دارند (زائو و مو ۲۰۱۰). فیتواستروژن-ها توانایی اتصال به گیرنده‌های استروژنی در بدن را دارند. گزارش شده است که گیاهان فیتواستروژنیک در دوزهای پایین می‌توانند اثر تحریکی بر گیرنده‌های استروژنی داشته باشند. به نظر می‌رسد با افزایش این اثر استروژنیکی، تولید و ترشح استروژن داخلی تحت تأثیر قرار گیرد (یانگ و همکاران ۲۰۱۸). فیتواستروژن‌ها دارای اثرات استروژنیکی یا ضد استروژنیکی بسته به غلظت استروژن داخلی بوده و محور مغز-هیپوفیز-گناد و همچنین اندام‌های تولیدمثل محیطی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (زائو و مو ۲۰۱۰). دوز بالای عصاره یک گیاه محتوی فیتواسترون، با اثر فیدبک (بازخورد) منفی سبب کاهش ترشح هورمون محرک فولیکولی (FSH) از هیپوفیز می‌شود (تریسومبون و همکاران ۲۰۰۷).

تأثیر تزریق درون تخمی نانوامولسیون اسانس آویشن بر میزان هورمون‌های جنسی در بلدرچین‌های نر و ماده در بعد از دوره پرورش در جدول ۳ مشاهده می‌شود. غلظت سرمی هورمون تستوسترون پرندگان نر در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵)، هر چند از نظر عددی غلظت تستوسترون سرمی نرها در تیمار دریافت کننده ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس آویشن نانوامولسیون شده نسبت به تیمار شاهد بدون تزریق بالاتر بود. در پژوهشی، تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی آویشن کوهی باعث افزایش غلظت سرمی هورمون تستوسترون در موش شد (قربانی‌رنجبری و همکاران ۲۰۱۴). فیتواستروژن‌های گیاهی با ممانعت از آروماتاز و کاهش تبدیل تستوسترون به استروژن به عنوان ممانعت کننده تولید استروژن، می‌توانند سطح تستوسترون را بالا ببرند (میلز و بون ۲۰۰۰). علاوه بر این، عصاره آویشن کوهی با افزایش تعداد گیرنده‌های سلول‌های لایدیگ و تأثیر روی غلظت هورمون LH باعث افزایش تستوسترون بدن می‌شود (آریزا نایتو و همکاران ۲۰۱۱). ماده سینئول موجود در عصاره آویشن باعث افزایش تبدیل کلسترول به پرگنولون در میتوکندری می‌شود که موجب افزایش سنتز استروئید از جمله تستوسترون می‌شود (آریزا نایتو و همکاران ۲۰۱۱).

Table 3- Effect of intra egg injection of different levels of Thyme essential oil nanoemulsion on concentrations of steroid hormones in Japanese quail

جدول ۳- تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بر غلظت هورمون‌های استروئیدی در بلدرچین ژاپنی

	Thyme essential oil nanoemulsion (ppm)				C ²	SEM	P-value
	E ¹	50	100	150			
Estrogen in female (pg/ml)	237.25 ^b	480.50 ^b	355.50 ^b	1662.40 ^a	1296.01 ^a	142.59	0.007
Testosterone in males (ng/ml)	2.43	3.90	3.63	3.40	3.75	0.24	0.540

SEM: Standard error of means. In each row, means with non-similar letters are different (P<0.05).

¹Emolisifier injection, ²Control (without injection).

اکسیدان‌های فعال موجود در فولیکول‌های تخمدانی، در قبل از تخمک‌گذاری، برای رشد و نمو این فولیکول‌ها و عمل تخمک‌گذاری ضروری‌اند و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن در تخمدان‌ها از رشد فولیکول‌های تخمدانی و عمل تخمک‌گذاری ممانعت می‌نمایند (برانو و همکاران ۲۰۰۹ و شکولنیک و همکاران ۲۰۱۱). در پژوهش ابوالوردی و همکاران (۲۰۱۸)، افزودن سطوح مختلف پودر آویشن در جیره بلدرچین ژاپنی موجب افزایش تعداد فولیکول‌های تخمدانی شد. علت اختلاف نتایج را می‌توان به نوع گیاه به‌کار رفته، دوزهای مصرفی، روش تجویز و گونه حیوانی ارتباط داد.

در جدول ۴ اثرات تزریق درون‌تخمی اسانس آویشن نانوامولسیون‌شده بر ریخت‌شناسی تخمدان نشان داده شده است. کمترین تعداد فولیکول سفید (۱۵ عدد) مربوط به تیمار ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس آویشن نانوامولسیون‌شده بود (P<۰/۰۵). وزن و قطر فولیکول‌های F1، F2 و F3 تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (P>۰/۰۵). بزرگ‌ترین وزن فولیکول F4 (۱/۸۹ گرم) را تیمار شاهد مثبت (آب+امولسیفایر) به خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). بزرگ‌ترین قطر فولیکول تخمدانی (۱۴/۲۳ گرم) در تیمار آب+امولسیفایر و کمترین قطر (۸/۳۴ گرم) در تیمار شاهد بدون تزریق مشاهده شد. علت دقیق این نتیجه معلوم نیست. به هر حال، امولسیفایرها در پایداری چربی در محیط مایع و نیز توانایی ارتباط با دیگر مواد غذایی از جمله تعامل با پروتئین‌ها یا کربوهیدرات‌ها نقش دارند. در تحقیقی، با بررسی اثر تغذیه‌ای سطوح مختلف اسانس گیاه اسطوخدوس بر ریخت‌شناسی تخمدان در مرغ‌های تخم‌گذار، تعداد فولیکول‌های سفید تحت تأثیر این اسانس قرار نگرفتند. اما وزن و قطر فولیکول‌های زرد بزرگ تحت تأثیر اسانس اسطوخدوس افزایش یافتند (تاکی و همکاران ۲۰۱۵).

در مطالعه دیگر، تغذیه با عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه در موش سبب کاهش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های تخمدانی نسبت به تیمار شاهد شد که به کاهش ترشح گونادوتروپین‌ها از هیپوفیز نسبت دادند (میرزاخانی و همکاران ۲۰۱۷). تحقیقات جدید عوارض جانبی و غیر منتظره آنتی‌اکسیدان‌ها را نشان داده و بیان می‌کنند که

Table 4- Effect of intra egg injection of different levels of Thyme essential oil nanoemulsion on characteristics of ovarian follicles in Japanese quail

جدول ۴- تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بر ویژگی‌های فولیکول‌های تخمدانی در بلدرچین ژاپنی

	Thyme essential oil nanoemulsion (ppm)				C ²	SEM	P-value
	E ¹	50	100	150			
F1 follicle weight (gr)	3.27	4.93	2.73	4.54	3.25	0.34	0.43
F2 follicle weight (gr)	2.58	3.11	1.84	2.67	1.93	0.21	0.55
F3 follicle weight (gr)	2.10	2.01	1.06	1.52	1.19	0.20	0.59
F4 follicle weight (gr)	1.89 ^a	0.96 ^b	0.37 ^b	0.49 ^b	0.55 ^b	0.16	0.03
F1 follicle diameter (mm)	17.52	20.46	16.54	21.25	21.25	0.94	0.60
F2 follicle diameter (mm)	15.25	17.11	14.47	15.71	14.69	0.58	0.84
F3 follicle diameter (mm)	14.24	13.76	11.70	13.80	10.82	0.71	0.81
F4 follicle diameter (mm)	14.23 ^a	10.95 ^{ab}	8.77 ^b	10.52 ^{ab}	8.34 ^b	0.70	0.05
White follicle numbers	46.50 ^a	15.00 ^c	36.00 ^{ab}	39.25 ^{ab}	39.00 ^{ab}	2.88	0.04

SEM: Standard error of means. In each row, means with non-similar letters are different (P<0.05).

¹Emolisifier injection, ²Control (without injection).

و همکاران (۲۰۱۸). در مطالعه دیگر، غلظت کلسترول خون جوجه‌های گوشتی در نتیجه تیمار خوراکی با اسانس ریزپوشانی شده آویشن کاهش یافت، ولی غلظت تری-گلیسرید، HDL و LDL سرم خون در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند (روزمهر و همکاران ۲۰۱۷). فانی‌مکی و همکاران (۲۰۱۳) اثر تغذیه‌ای آویشن بر برخی فراسنجه‌های خونی در جوجه‌های گوشتی را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که غلظت پروتئین، گلوکز، LDL و HDL سرم خون تحت تأثیر تیمارهای آویشن قرار نگرفت. در مطالعه حاضر، بالاترین سطح نانوامولسیون اسانس آویشن باعث کاهش غلظت کلسترول سرم خون در مقایسه با تیمار شاهد شد. بسیاری از روغن‌های ضروری مثل تیمول و کارواکرول که جزو ترکیبات آویشن هستند، قادرند با اثر بر آنزیم‌های HMG-CoA ردوکتاز باعث کاهش ساخت کلسترول در بدن پرندگان شوند. این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم واکنش‌های ساخت کلسترول دارا می‌باشد و زمانی که مقدار LDL و ترکیبات غیراسترولی محصول عمل آن افزایش یابد، ساخت کلسترول را کاهش می‌دهد (لوسکی ۱۹۸۷).

در جدول ۵ تأثیر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون مشاهده می‌شود. گلوکز خون در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری با شاهد بدون تزریق نداشت (p>۰/۰۵). کمترین غلظت تری‌گلیسرید سرم خون در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی مربوط به ۱۰۰ ppm پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس آویشن بود (P<۰/۰۵). میزان کلسترول و LDL سرم خون در تیمار شاهد آب + امولسیفایر به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار ۱۵۰ پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس بود. اختلاف معنی‌داری در غلظت HDL و پروتئین کل سرم خون بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ساکی و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که با تزریق عصاره آویشن به درون تخم مرغ در روز هفدهم جنینی، غلظت گلوکز خون جوجه‌های هچ شده افزایش یافته اما میزان تری‌گلیسرید، LDL و HDL تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند.

در تحقیقی، افزودن اسانس آویشن به جیره بلدرچین ژاپنی ماده، باعث کاهش میزان تری‌گلیسرید خون پرنده-ها نسبت به گروه شاهد شد اما غلظت کلسترول سرم خون تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (دهقانی

Table 5- Effect of intra egg injection of different levels of Thyme essential oil nanoemulsion on blood parameters (mg/dl) in Japanese quail

جدول ۵- تأثیر تزریق سطوح مختلف نانوامولسیون اسانس آویشن به درون تخم بر فراسنجه‌های خونی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در بلدرچین

	Thyme essential oil nanoemulsion (ppm)				SEM	P-value	
	E ¹	50	100	150			C ²
Glucose	326	336.25	314.50	283.75	294.00	7.30	0.047
Triglyceride	70.70 ^a	71.72 ^a	26.27 ^b	57.54 ^{ab}	68.93 ^a	4.91	0.049
Cholesterol	236.50 ^a	161.00 ^{ab}	193.75 ^{ab}	142.50 ^b	181.25 ^{ab}	11.87	0.046
LDL	86.50 ^a	52.00 ^{ab}	52.75 ^{ab}	44.00 ^b	51.50 ^{ab}	5.01	0.020
HDL	82.00	77.50	76.00	76.00	82.00	2.41	0.840
Total protein	3.70	3.33	3.10	3.38	3.43	0.14	0.670

SEM: Standard error of means. In each row, means with non-similar letters are different (P<0.05).

¹Emulsifier injection, ²Control (without injection).**نتیجه‌گیری کلی**

به‌طور کلی، تزریق سطوح نانوامولسیون اسانس آویشن به کیسه هوای تخم بلدرچین ژاپنی علاوه بر این که موجب بهبود فراسنجه‌های تولیدمثلی در این پرنده نشد، بلکه غلظت بالای آن (۱۵۰ پی‌پی‌ام)، اثر منفی بر این شاخص‌ها داشت. تغییرات خصوصیات مورفومتریک دستگاه تناسلی و فراسنجه‌های خونی نیز تغییرات چشمگیر و قابل بحثی نداشت. هر چند، غلظت تری-گلیسرید در سطح ۱۰۰ پی‌پی‌ام نانوامولسیون اسانس

آویشن در مقایسه با گروه‌های شاهد مثبت و منفی کاهش یافت. در کل، تزریق نانوامولسیون اسانس آویشن به کیسه هوای تخم بلدرچین به منظور بهبود عملکرد تولیدمثلی قابل توصیه نیست.

سیاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به سبب فراهم ساختن امکانات تحقیق، قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abolverdy M, Chaji M, Tabatabaei S, Mohammadabadi T and Ghorbani M, 2018. Effect of different dietary levels of thyme powder (*Zataria multiflora Boiss*) in diet on productive traits, internal organs and meat quality characteristics of Japanese quail. *Veterinary Journal (Pajouhesh and sazandegi)* 114: 21-31.
- Araújo ICS, Leandro NSM, Mesquita MA, Café MB, Mello HHC and Gonzales E, 2016. Effect of incubator type and broiler breeder age on hatchability and chick quality. *Brazilian Journal of Poultry Science* 18: 17-25.
- Ariza-Nieto C, Bandrick M, Baidoo SK, Anil L, Molitor TW and Hathaway MR, 2011. Effect of dietary supplementation of oregano essential oils to sows on colostrum and milk composition, growth pattern and immune status of suckling pigs. *Journal of Animal Science* 89(4): 1079-1089.
- Aygun A, 2016. The effects of in-ovo injection of propolis on egg hatchability and starter live performance of Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science* 18: 83-89.
- Aygun A and Sert D, 2012. Effects of ultrasonic treatment on eggshell microbial activity, hatchability, tibia mineral content, and chick performance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science* 91: 732-738.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils a review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2): 446-475.
- Bruno JB, Matos MHT, Chaves RN, Celestino JJH, Saraiva MVA, Lima-Verde IB and Figueiredo JR, 2009. Angiogenic factors and ovarian follicle development. *Animal Reproduction* 6(2): 371-379.

- Burt S, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223-253.
- Ceylan E and Fung DY, 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 12(1): 1-55.
- Dauqan EM and Abdullah A, 2017. Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris L.*) herb. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 5: 17-22.
- Dehghani N, Afsharmanesh M, Salarmoini M, Ebrahimnejad H and Bitaraf A, 2018. Effect of pennyroyal, savory and thyme essential oils on Japanese quail physiology. *Heliyon* 4(10): e00881.
- Fanimakki O, Ebrahimzade A, Ansarinik H and Ghazaghi M, 2013. Effect of milk thistle (*Silybum marianum L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) herbs on immunity and some blood metabolites in broiler chicks. *Veterinary Clinical Pathology* 26: 1836-1843.
- Foye O, Ferket P and Uni Z, 2005. The effects of in ovo feeding of arginine and/or beta-hydroxybeta-methylbutyrate (HMB) on glycogen metabolism and growth in turkey poults. *Poultry Science* 84: 9.
- Ghaemi F, 2015. The effect of estrogen injection on fertile eggs on sex ratio of hatched chicks in Lorestan native chicken. Master's thesis. Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan 58-59.
- Ghorbani-Ranjbari A, Ghorbani Ranjbari N, Ghorbani Ranjbari Z and Jouibar F. 2014. Effects of intraperitoneal injection of extracts of *origanum vulgare* on gonadotropin and testosterone hormones in male Wistar rats. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 16(4): 57-63.
- Hashtjin AM and Abbasi S, 2015. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocolloids* 44: 40-48.
- Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, Tapia-Pérez H and Castañón GM, 2008. The antimicrobial sensitivity of streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. *Nanomedicine* 4(3): 237-240.
- Jamali T, Kavooosi G, Safavi M and Ardestani S, 2018. In-vitro evaluation of apoptotic effect of OEO and thymol in 2D and 3D cell cultures and the study of their interaction mode with DNA. *Scientific Reports* 8: 1-19.
- Jo YJ, Chun JY, Kwon YJ, Min SG, Hong GP and Choi MJ, 2015. Physical and antimicrobial properties of trans-cinnamaldehyde nanoemulsions in water melon juice. *LWT-Food Science and Technology* 60(1): 444-451.
- Kadam MM, Bhanja SK, Mandal AB, Thakur R, Vasan P, Bhattacharyya A and Tyagi JS, 2008. Effect of *in ovo* threonine supplementation on early growth, immunological responses and digestive enzyme activities in broiler chickens. *British Poultry Science* 49(6): 736-741.
- Keshavarz-Motamedi M, Mohammadi M and Mottaghitlab M, 2008. Effects of in ovo injection of olive leaf extracts on broiler performance. *Iranian Journal of Animal Science* 39 (1): 2008.
- Krishna R, Raghupathi RTK and Adhar CM, 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir*, 27(7): 4020–4028.
- Luskey KL, 1987. Regulation of cholesterol synthesis: mechanism for control of HMG-CoA Reductase. *Recent Progress in Hormone Research* 44: 35-51.
- Mills S and Bone K, 2000. Principles and practice of phytotherapy. *Modern herbal medicine*. Churchill Livingstone.
- Mirzakhani Z and Hosseini SE, 2017. Effects of Chamomile hydro alcoholic extract (*Matricaria chamomilla*) on the aborted fetuses, serum sex hormones and ovarian follicles in adult female rats. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 17(1): 22-31.
- Momeni T and Shahrokhi N, 1992. *Herbal Essences and their therapeutic effects*. University of Tehran Publications. 168.
- Moran Jr ET, 2007. Nutrition of the developing embryo and hatchling. *Poultry Science* 86(5): 1043-1049.
- Noy Y and Sklan D, 1999. Different types of early feeding and performance in chicks and poults. *Journal of Applied Poultry Research* 8(1): 16-24.

- Parizadian Kavan B, Karimirad R and Khosravinia H, 2019. Effects of in ovo feeding of L-carnitine and Satureja khuzistanica extract on hatchability, post-hatch performance and carcass characteristics in broiler chickens. *Research on Animal Production* 10(23): 35-44.
- Rouzmehr F, Chashnidel Y, Rezaei M, Mohiti Asli M and Mottaghi Talab M, 2017. The effect of thyme and cinnamon microencapsulated essential oils on performance, some blood parameters and carcass characteristic in boiler chicks. *Research on Animal Production* 8(17): 34-42.
- Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M and Khalighi-Sigaroodi F, 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora Boiss.* from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 48(6): 1562-1567.
- Saki AA, Salary J, Aliarabi H, Vatanchian M and Abbasinezhad M, 2015. The effect of silver nanoparticles, thyme and savoury extracts injection to egg on the hatchability, digestive and immunity parameters at hatchability. *Iranian Journal of Animal Science Reaserch* 6(3): 218-226.
- Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D and Dekel N, 2011. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(4): 1462-1467.
- Taki A, Salari S, Boujarpour M, Sari M and Taghizadeh M. 2015. Effects of feeding various levels of *Lavandula stoechas* essence on quantitative and qualitative characteristics of egg, some blood parameters, and morphological changes of ovary in laying hens. *Scientific Research Iranian Veterinary Journal* 11(1): 43-55.
- Tako E, Ferket PR and Uni Z, 2004. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poultry Science* 83(12): 2023-2028.
- Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G and Taya K, 2007. Assessment of urinary gonadotropin and steroid hormone profiles of female cynomolgus monkeys after treatment with *Pueraria mirifica*. *Journal of Reproduction and Development* 53(2): 395-403.
- Uni Z, Ferket PR, Tako E and Kedar O, 2005. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science* 84(5): 764-770.
- Yang JX, Chaudhry MT, Yao JY, Wang SN, Zhou B, Wang M, Han CY, You Y and Li Y, 2018. Effects of phyto-oestrogen quercetin on productive performance, hormones, reproductive organs and apoptotic genes in laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal* 102(2): 505-513.
- Zhao E and Mu Q, 2010. Phytoestrogen biological actions on mammalian reproductive system and cancer growth. *Scientia Pharmaceutica* 79(1): 1-20.

The Effect of intra egg nanoemulsion thyme essential oil injection on reproductive and blood parameters of Japanese quail

S Tabatabaei Vakili^{1*}, S Darabi², A Aghaei¹ and MA Mehrniya³

Received: December 24, 2019

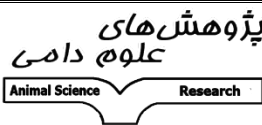

Accepted: September 8, 2020

¹Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

²M.Sc. graduate, Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

³Assistant Professor, Department of Animal Science, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

* Corresponding Author: Email: tabatabaei@asnrukh.ac.ir

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p>	<p>Journal of Animal Science/vol.31 No.2/ 2021/pp 87-99 https://animalscience.tabrizu.ac.ir</p>	
<p>© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2021.37982.1547</p>		

Introduction: In the recent years, injection of stimulant solutions into fertilized eggs has been practiced to improve the reproductive and functional parameters of birds. Egg injection technology is not only a way to vaccinate birds against certain diseases, but it is also a practical way of injecting some of the nutrients needed by the developing embryo (Foye et al. 2005 and Uni et al. 2005). To date, numerous studies have manipulated egg nutrients for the improvement of embryonic development in birds. Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) is well-known medicinal plant and its essential oil (EO) could be obtained by distillation of leaves and flowering shoots of the herb (Momeni and Shahrokhi 1992). Commonly, the yellow or dark reddish brown EO of the shirazi thyme has strong spicy smell and its flavor is long-lasting and cooling (Momeni and Shahrokhi 1992). Essential oils generally are complex mixture of volatile and non-volatile plant secondary metabolites produced by aromatic plants (Bakkali et al. 2008). The main constituents of thyme EO are flavonoids, glycosids, tannins, saponins, steroids (e.g., cytosterol), triterpenoids (e.g., oleanolic acid and ursolic acid), and monoterpene rich volatile oils (Martínez-Vázquez et al., 1996). Essential oils can be used in the food industry as nanoemulsions (Jo et al. 2005). In general, particle size reduction to nanoparticles (size less than 100 nm) increases the surface-to-volume ratio as well as the reactivity thus making it possible to use smaller amounts of these materials than materials with larger particles (Hernández-Sierra et al. 2008). The very small size of the synthesized nanoparticles can be effective in enhancing its antimicrobial effect (Krishna et al. 2011). This study was conducted to investigate the effect of in-ova injection of different levels of nanoemulsion of thyme EO on reproductive (fertility, total hatchability, hatch of fertile eggs and embryonic mortality rates) and blood parameters (estrogen, testosterone, glucose, triglyceride, cholesterol, LDL, HDL, total protein) in Japanese quail.

Material and methods: The experiment was done using 600 Japanese quail eggs in a completely randomized design with 5 treatments (negative control (without injection), positive control (with water and emulsifier injection) and intra ova injection of 50, 100 and 150 ppm nanoemulsified thyme EO), 4 replications (30 eggs per replicate). The experimental solutions were injected into the air sac of the eggs before incubation. The daily collected eggs were kept in a room at a temperature of about 17-18 °C. The male to female quail ratio was 1:3 in the flock and the birds had free access to water and feed at all stages of the experiment. Lighting length was set at the production stage, 16 hours

brightness and 8 hours dark. Experimental solutions were injected into the egg sac immediately before incubation. At the end of incubation, fertility or embryonic development, hatchability, embryonic mortality rates and age of embryonic mortality were determined. To investigate the percentage of embryonic mortality during the incubation period, the eggs that had not been hatched were broken and the eggs with embryonic losses were selected. To determine the stage of embryonic mortality, the incubation period was divided into three stages: (I) 1 to 9 days old (black eye and feather absent), (II) 10 to 17 days old (embryo with feather and yellow sac visible) and (III) 17 to 18 days old (grown embryos without yolk visible externally) (Aygun and Sert 2012). The hatched chicks from each treatment and replicate were weighed and then transferred to their own pan. Hatched chicks were reared for 8 weeks to evaluate blood parameters and genital characteristics. The ration used for all groups was similar throughout the trial period according to the recommendations of the National Research Association (NRC 1994).

Results and discussion: Results showed that not only the experimental treatments did not improve fertility, total hatchability, hatch of fertile eggs and embryonic mortality rates, but the highest concentration of thyme nanoemulsion (150 ppm) had a detrimental effect on the selected parameters compared with the control groups ($P < 0.05$). At the end of the breeding period, uterine weight and length, ovarian weight, weight, and diameter of F1 to F3 follicles in female birds as well as testosterone concentration in male birds were not affected by none of the tested thyme EO concentrations ($P > 0.05$). Sera estrogen concentration of female birds due to intra ova injection of higher dose of nanoemulsified thyme EO was higher compared with the positive control group ($P < 0.05$). Blood glucose in experimental treatments was not significantly different from the untreated control group ($P > 0.05$). Total serum triglyceride was lower in the treatment group receiving 100 ppm nanoemulsion EO than the control groups ($P < 0.05$). The highest cholesterol and LDL levels were in the water plus emulsifier group and the lowest levels of these parameters numerically belonged to the 150 ppm emulsion treatment. There was no significant difference in sera HDL and total protein levels between experimental treatments ($P > 0.05$). Therefore, no significant changes were observed on the blood parameters, except for triglyceride, which was lower at 100 ppm concentration, compared with the controls.

Conclusion: Injection of different concentrations of thyme EO nanoemulsions into the air sac of Japanese quail egg, not only did not improve the reproductive parameters, but also at high concentration (150 ppm) had a negative effect on the tested parameters. Changes in the morphometric characteristics of the reproductive system and blood parameters were also not significant. However, the concentration of triglyceride at 100 ppm level of thyme EO decreased compared with the control group. In general, in-ova injection of thyme EO nanoemulsion is not recommended to improve reproductive performance in Japanese quail.

Key words: Blood parameters, Japanese quail, Reproduction, Thyme