



توليدات دامی

دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸

صفحه‌های ۴۱۸-۴۰۹

اثر انجماد با رقیق‌کننده‌های مختلف بر کیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین با تکنیک Real-time qPCR

سپیده رستمی^{۱*}، محمدتقی بیگی نصیری^۲، محمود نظری^۳، صالح طباطبایی وکیلی^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.

۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.

۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.

۴. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰

چکیده

اثر دو رقیق‌کننده مختلف تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر کیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین در طول فرآیند رقیق‌سازی و انجماد با استفاده از تکنیک real-time qPCR بررسی شد. این آزمایش با استفاده از چهار گاو نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی و به مدت چهار هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ژن‌های PLP و SRY به ترتیب برای جداسازی قطعات خاصی از توالی‌های کروموزوم X- و Y- تکثیر شدند. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد در مقایسه با تریس- زرده تخم‌مرغ، کیفیت منی در انجماد و یخ‌گشایی را بهبود داد. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن PLP ($1/43 \pm 0/16$)، ($P= 0/01$) و کاهش معنی‌دار بیان ژن SRY ($0/64 \pm 0/11$)، ($P= 0/009$) در حالت مایع و فرایند انجماد شد. استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن PLP ($0/3 \pm 0/06$)، ($P < 0/0001$) و افزایش معنی‌دار بیان ژن SRY ($1/19 \pm 0/05$)، ($P= 0/001$) در حالت انجماد شد. بر اساس نتایج، استفاده از منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده آندرومد و منی منجمد شده با تریس- زرده تخم‌مرغ به ترتیب سبب افزایش ماده‌زایی و نر‌زایی در گله گاو شیری می‌شود.

کلید واژه‌ها: آندرومد، زرده تخم‌مرغ، ژن PLP، ژن SRY، کروموزوم Y.

Effect of freezing with different extenders on the semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique

Sepideh Rostami^{1*}, Mohammad Taghi Beigi Nassiri², Mahmood Nazari³, Saleh Tabatabaei Vakili⁴

1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.

2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

4. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.

Received: February 19, 2019

Accepted: June 22, 2019

Abstract

The effects of two different extenders were investigated (Tris- egg yolk and Andromed extenders) on semen quality and sex ratio during the dilution and freezing process in Holstien bull by using the real-time qPCR technique. The experiment was conducted using four 4-years old Holstien bulls for a period of four weeks in a completely randomized design and t-test. The PLP and SRY genes were amplified to isolate the specific fragments of X- and Y- chromosome sequences, respectively. Using Andromed diluent in comparison with Tris- eggs yolk improved semen quality during freezing and thawing. Using Andromed extender significantly increased the PLP gene expression (1.43 ± 0.16), ($P= 0/01$) and reduced SRY gene expression (0.64 ± 0.11), ($P= 0/009$). Using Tris- egg yolk extender led to a significant reduced in expression of PLP gene (0.3 ± 0.06), ($P < 0/0001$) and s increased SRY gene expression during freezing (1.19 ± 0.05), ($P= 0/001$). Based on the results, sperm dilution with Andromed extender and frozen semen with Tris-egg yolk increase birth of female and male in dairy cow herd, respectively.

Keywords: Andromed, PLP gene, SRY gene, Y- chromosome, egg yolk.

مقدمه

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای پیشرفت تکنولوژی انجماد اسپرم انجام شده است، با این وجود موفقیت این فناوری با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و جنبایی بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مواجه است، زنده‌مانی و جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی متأثر از عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی و نوع و غلظت ترکیبات موجود در رقیق‌کننده می‌باشد [۳]. بنابراین، استفاده از رقیق‌کننده مناسبی که اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های انجماد و یخ‌گشایی محافظت کرده و زنده‌مانی و جنبایی آن‌ها را بعد از یخ‌گشایی حفظ کند، بسیار حائز اهمیت است [۵]. نوع رقیق‌کننده مورد استفاده طی فرآیند انجماد، با آسیب DNA اسپرم در ارتباط است، اساساً انجماد به‌عنوان عامل آسیب به DNA مطرح می‌شود و انجماد بهینه می‌تواند توانایی اسپرم در طی فرایند انجماد و شوک سرمایی را افزایش داده و منجر به بهبود کیفیت اسپرم در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی شود [۱۲]. نقش ترکیبات زرده تخم‌مرغ بر کیفیت اسپرم و سلامت DNA ثابت شده است [۲۵]. اجزای زرده تخم‌مرغ حفاظت خوبی را در فرایند انجماد برای اسپرم ایجاد می‌کند. زرده تخم‌مرغ دارای لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) است که اثرات مفیدی بر کیفیت اسپرم و سلامت DNA بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی دارد [۲۳]. مشکلات رقیق‌کننده‌های حاوی منابع حیوانی منجر به افزایش تمایل برای استفاده از منابع گیاهی شده است، آندرومید، رقیق‌کننده‌ای بر پایه بافر تریس بوده و حاوی لسیتین سویا، سیتریک اسید، قند و گلیسرول می‌باشد و برای انجماد منی استفاده می‌شود [۸].

امروزه پیش انتخاب جنسیت، نشان‌دهنده یک پتانسیل بزرگ در جهت پیشرفت ژنتیکی و رضایت تقاضای بازار است. بسیاری از تکنیک‌های گذشته انتخاب جنسیت، بر

جداسازی فیزیکی اسپرم X و Y تمرکز داشتند که این روش‌های جداسازی، بر اساس اختلاف در تحرک، محتوای DNA و آنتی‌ژن سطح اسپرم‌ها بوده و اغلب اثرات نامطلوبی بر کیفیت منی داشتند [۱۸]. هم‌چنین روش‌های دیگری برای جداسازی اسپرم گزارش شده است که شامل شیب غلظت، گرادیان آلبومین، شنا به سمت بالا و گرادیان پرکل (جداسازی بر پایه تفاوت در چگالی اسپرم‌ها) می‌باشد، نتایج این روش‌ها بجز فلوسایتومتری رضایت‌بخش نبوده‌است. امروزه استفاده از روش Real time qPCR، برای ارزیابی نسبت جنسیت اسپرم‌های مایع منی پیشنهاد شده است، با استفاده از این تکنیک می‌توان نسبت جنسیت را به‌طور آسان‌تر و با دقت ۹۹ درصد ارزیابی کرد [۶].

یکی از ژن‌های موجود در کروموزوم Y، ناحیه کدکننده جنسیت کروموزوم Y یا ژن SRY (Sex-related Y) می‌باشد، این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم Y نزدیک به سانترومر قرار دارد. ژن SRY بر زنده‌مانی کروموزوم Y مؤثر است، لذا می‌توان نقش آن بر نسبت جمعیتی کروموزوم‌های X و Y را بررسی نمود [۱۸]. اخیراً پروتئولپید پروتئین یا ژن PLP (Proteolipid protein) برای شناسایی کروموزوم X پیشنهاد شده است. این ژن در همه بافت‌های عصبی و غیرعصبی بیان می‌شود و در تمام بافت‌های غیرعصبی در طی تکثیر طبیعی، مانع آپویتوز می‌شود [۲۰]. با توجه به این‌که انجماد موجب تخریب DNA و تغییر در نسبت جنسیت اسپرم می‌شود، این تغییر در نسبت جنسیت ممکن است تحت تأثیر رقیق‌کننده‌ها یا فرایند انجماد قرار گیرد [۱۹]. هدف از این پژوهش، بررسی اثر انجماد با استفاده از رقیق‌کننده‌های آندرومید و تریس- زرده تخم‌مرغ بر نسبت جنسیت اسپرم در گاو هلشتاین بود.

تولیدات دامی

مواد و روش‌ها

تمام مواد مورد استفاده برای استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدها از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. جهت انجام واکنش time qPCR-Real از کیت تجاری Amplicon (Cat. NO: 5000830-1250) استفاده شد. نمونه‌گیری و انجماد منی در مرکز تولید مواد ژنتیکی دام و طیور خوزستان، واقع در شهر ملاتانی در ۳۷ کیلومتری شمال شرقی اهواز انجام شد. مراحل مربوط به استخراج DNA و سایر مراحل آزمایشگاهی، در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. از چهار گاو بالغ نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی به مدت چهار هفته، به تعداد یک بار در هفته با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. پس از اسپرم‌گیری نمونه‌ها به سرعت به داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد و نمونه‌های دارای بیش‌تر از ۷۰ درصد تحرک برای ادامه آزمایش انتخاب و با هم مخلوط شدند [۹].

سپس نمونه‌های منی جمع‌آوری شده به دو بخش تقسیم شدند، یک بخش با استفاده از رقیق‌کننده آندرومد (مینی‌تب، آلمان) و بخش دیگر با استفاده از بافر تریس رقیق شدند. رقیق‌کننده آندرومد حاوی ترکیب چربی‌های با منشأ گیاهی، فسفولیپیدها، اسید سیتریک، قند، آنتی‌اکسیدان‌ها، بافرها و گلیسرول بود. رقیق‌کننده تریس حاوی تریس (۳۰/۲۵ گرم در لیتر)، اسیدسیتریک (۱۷ گرم در لیتر) و فروکتوز (۱۲/۵ گرم در لیتر) بود [۲] و مقدار ۱۶ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، ۵/۳ درصد گلیسرول، پنی سیلین ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، استرپتو مایسین ۱۰۰ میلی‌گرم، آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد. پس از رقیق‌سازی، بخشی از نمونه‌ها در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری بسته‌بندی شده، سپس پایوت‌ها به مدت

چهار ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس به تانک ازت (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. پس از دو هفته، پایوت‌ها از تانک ازت خارج و در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) یخ‌گشایی شدند.

pH نمونه‌های منی و خصوصیات کیفی اسپرم نظیر جنبائی، زنده‌مانی و سلامت غشا در طی سه مرحله قبل رقیق‌سازی، بعد از رقیق‌سازی و بعد یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی (زنده‌مانی) از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. در این روش، اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی نمونه ده میکرولیتر اسپرم به وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم تمیز قرار داده شد. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی، زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 1000$ ارزیابی شدند. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ‌نشده (زنده)، محاسبه شد.

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و پس از تهیه اسمیر (گسترش) روی لام و خشک شدن آن، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ ، ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد. دو هفته پس از انجماد، پایوت‌های منجمد در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه قرار گرفته و خصوصیات کیفی اسپرم مطابق با مرحله پیش از انجماد تعیین شد. در این تحقیق به منظور شست‌وشوی منی و حذف سلول‌های مرده و سایر مواد اضافی اسپرم در

تولیدات دامی

اسپرمتوزوئید با دو تکرار آزمایشی برای ژنهای PLP، SRY، و ژن مرجع PAR با استفاده از دستگاه (Step one Real Time PCR System Plus، کشور آمریکا) در پلت‌های مجزا انجام شد. (جدول ۱) مراحل انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز را نشان می‌دهد.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real-time PCR ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Step-one ABI، یک گزارش از کلیه اطلاعات موجود به صورت فایل Word (نسخه 2013) استخراج شده و سپس به نرم‌افزار Excel (نسخه 2013) انتقال داده شد. برای بررسی و تحلیل مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (CT) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه وارد نرم‌افزار Excel شد. به منظور محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY در اسپرمتوزوئیدهای جمع‌آوری شده، میانگین CT برای تکرارهای تکنیکی محاسبه شد (روابط ۱، ۲ و ۳) و پس از تعیین میزان ΔCT برای تمامی نمونه‌ها، میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر (Foldchange) با استفاده از (رابطه ۴) محاسبه شد.

$$\Delta CT = CT_{(Target)} - CT_{(Reference)} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\Delta CT = CT_{(PLP)} - CT_{(PAR)} \quad \text{رابطه ۲}$$

$$\Delta CT = CT_{(SRY)} - CT_{(PAR)} \quad \text{رابطه ۳}$$

$$\text{Fold change} = \quad \text{رابطه ۴}$$

$$\frac{2^{-(ct_{target} - ct_{reference})_{sample}}}{2^{-(ct_{target} - ct_{reference})_{control}}} =$$

$$2^{-(\Delta ct_{sample} - \Delta ct_{control})}$$

مرحله قبل رقیق‌سازی، بعد رقیق‌سازی و بعد یخ‌گشایی، از تکنیک Swim up (شنا به سمت بالا) استفاده شد [۱۰]. سپس جهت استخراج DNA از اسپرمتوزوئیدهای زنده جداسازی شده با تکنیک Swim up، از پروتکل استخراج نمکی استفاده شد [۱۵]، و برای تعیین خلوص DNA از ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

در پژوهش حاضر، ژن SRY به عنوان ژن نرزاری روی کروموزوم Y با طول قطعه ۸۹ بیس پیر و توالی رفت F:5'CTCAGACATCAGCAAGCAGC-3' و برگشت R:5'-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3' و با شماره بانک ژنی AJ009913-1 انتخاب شد. هم‌چنین ژن PLP به عنوان ژن ماده‌زایی با طول قطعه ۹۰ بیس پیر و توالی رفت F:5'GAGGGAGGGTGGATCATAGA-3' و برگشت R:5'-CCTCTGGGACCTTCAACAAT-3' و با شماره بانک ژنی EU581861-1 انتخاب شد، از ژن گیرنده پروتئیناز فعال (PAR) به عنوان ژن مرجع استفاده شد. این ژن دارای طول قطعه ۷۹ بیس پیر و توالی رفت F:5'-GCCATCACATCTGAGACCAC-3' و برگشت R:5'-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3' و با شماره بانک ژنی AC234910-2 مورد استفاده قرار گرفت [۱].

به منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، ابتدا واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermalcycler Mini، کشور آلمان) انجام گرفت. پس از طی مراحل ذکر شده، واکنش Real-time PCR برای نمونه‌های DNA حاصل از

جدول ۱. چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش Real-time PCR

مراحل	تعداد چرخه‌ها	دما	زمان
مرحله اول	۱	۹۵	۱۵ دقیقه
مرحله دوم	۴۰	۹۵	۱۵-۳۰ ثانیه
		۶۰	۳۰ ثانیه
مرحله سوم		۷۲	۳۰ ثانیه
		۵۵-۵۹	۱۰ ثانیه

سلامت غشای اسپرم و pH منی هنگام استفاده از رقیق‌کننده آندرومید بالاتر و میزان ناهنجاری آن کم‌تر از رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ بود ($P < 0/05$).

ژن‌های SRY، PLP، و PAR به شکل مناسبی تکثیر شدند (شکل ۱). همچنین آنالیز منحنی ذوب که یکی از مراحل اصلی در بررسی داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR می‌باشد، در (شکل ۲)، نمودارهای الف، ب و ج مشاهده می‌شود. نمودار قله ذوب ژن SRY، PLP و PAR تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را نشان می‌دهد.

نتایج آنالیزهای آماری اطلاعات حاصل از Real time PCR در تحقیق حاضر در جدول‌های ۴ و ۵ ارائه شده است، نتایج ارائه‌شده در جدول ۴ نشان داد که تکنیک Swim up منجر به افزایش معنی‌دار ژن SRY ($P = 0/01$) و کاهش معنی‌دار ژن PLP ($P = 0/04$) شد. علاوه بر این، افزودن زرده تخم‌مرغ به رقیق‌کننده تریس در حالت مایع، اثر معنی‌داری روی بیان ژن SRY و PLP نداشت، اما افزودن رقیق‌کننده آندرومید به منی در حالت مایع منجر به کاهش معنی‌دار ژن SRY ($P = 0/009$) و افزایش معنی‌دار ژن PLP ($P = 0/01$) شد.

تجزیه داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و با استفاده از رویه آماری GLM انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند، داده‌های مربوط به real time به روش t-test مقایسه شدند (رابطه ۵).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij} \quad (\text{رابطه ۵})$$

در این رابطه، Y_{ij} مقدار هر مشاهده؛ μ میانگین کل؛ T_i اثر تیمار؛ و e_{ij} اثر خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

نتایج بررسی اثر دو رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و آندرومید بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین بعد از رقیق‌سازی در (جدول ۲) ارائه شده است. تحرک اسپرم، زنده‌مانی و سلامت غشا تحت تأثیر رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0/05$). مقایسه اثر رقیق‌کننده آندرومید و زرده تخم‌مرغ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مانند تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشا و ناهنجاری و PH در (جدول ۳) گزارش شده است. تحرک، زنده‌مانی،

جدول ۲. اثر دو رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و آندرومید بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین (خطای استاندارد \pm میانگین)

pH	ناهنجاری (درصد)	سلامت غشا (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	تحرک (درصد)	
۶/۹۶ \pm ۰/۰۱	۴/۷۵ \pm ۰/۴۷ ^{ab}	۷۴/۲۵ \pm ۱/۱۰ ^c	۸۴/۰۰ \pm ۲/۱۶ ^b	۷۲/۲۵ \pm ۱/۱۰ ^b	شاهد
۶/۹۸ \pm ۰/۰۰۹	۵/۷۵ \pm ۰/۴۷ ^a	۸۱/۲۵ \pm ۲/۲۸ ^b	۹۱/۵۰ \pm ۱/۴۴ ^a	۸۰/۵ \pm ۱/۰۴ ^a	تریس-زرده تخم‌مرغ
۶/۹۶ \pm ۰/۰۰۷	۳/۷۵ \pm ۰/۴۷ ^b	۹۱/۰۰ \pm ۱/۶۸ ^a	۹۱/۲۵ \pm ۱/۴۹ ^a	۹۲/۰۰ \pm ۱/۰۳ ^a	آندرومید

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است ($P < 0/05$).

جدول ۳. اثر دو رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و آندرومید بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین بعد از فرایند یخ‌گشایی

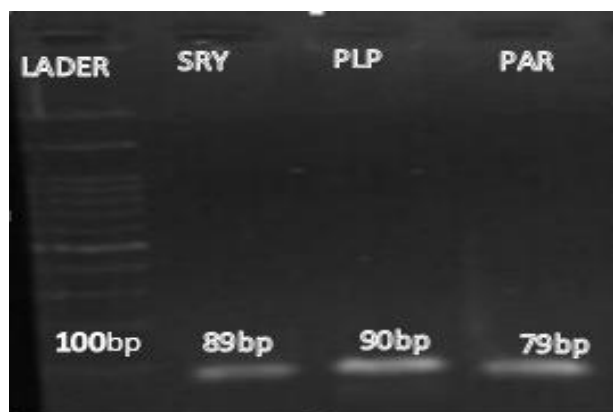
(خطای استاندارد \pm میانگین)

pH	ناهنجاری (درصد)	سلامت غشاء (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	تحرک (درصد)	
۷/۰۲ \pm ۰/۰۱ ^a	۱۰/۷۵ \pm ۰/۶۲ ^b	۵۹/۷۵ \pm ۱/۶۵ ^b	۶۲/۲۵ \pm ۱/۶۵ ^b	۴۳/۷۵ \pm ۱/۳۲ ^b	تریس-زرده تخم‌مرغ
۶/۸۷ \pm ۰/۰۰۲ ^b	۶/۵۰ \pm ۰/۶۴ ^a	۷۷/۰۰ \pm ۱/۲۹ ^a	۷۴/۰۰ \pm ۱/۳۲ ^a	۵۷/۰۰ \pm ۲/۲۱ ^a	آندرومید

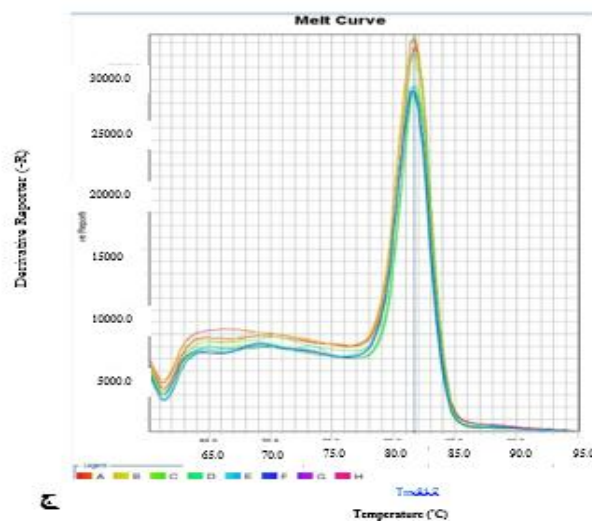
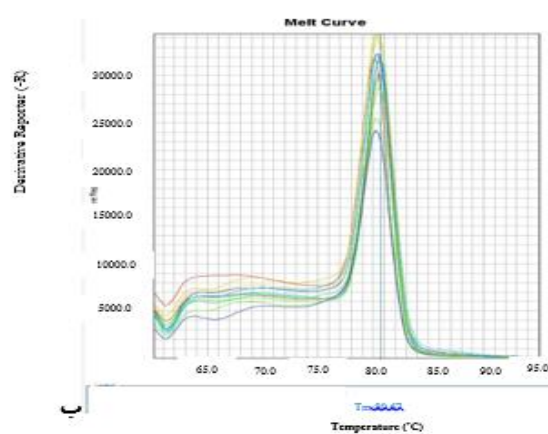
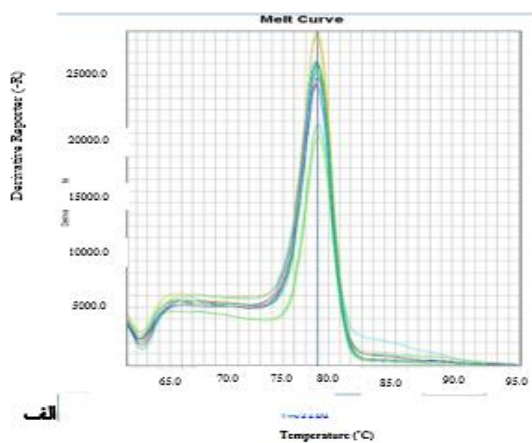
a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است ($P < 0/05$).

تولیدات دامی

دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸



شکل ۱. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز دو درصد



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های PLP (نمودار الف)، SRY (نمودار ب) و PAR (نمودار ج)

تولیدات دائمی

دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸

کاهش درصد اسپرم حامل کروموزم X می‌شود که دلیل آن را می‌توان این‌گونه بیان کرد که اسپرم حامل کروموزم Y بدلیل اندازه کوچک‌تر آنها، شنای سریع‌تری دارند و حرکت آنها به سمت بالای لوله سریع‌تر است، درحالی‌که اسپرم حامل کروموزم X تمایل دارند در قسمت پایین لوله قرار گیرند، اسپرم حامل کروموزم X حاوی DNA بیش‌تری نسبت به اسپرم حامل کروموزم Y است که منجر به مهاجرت کندتر می‌شود و سرعت اسپرم حامل کروموزم Y بیش‌تر از اسپرم حامل کروموزم X است [۴].

با توجه به نتایج ارائه‌شده در جدول ۴، در بین دو رقیق‌کننده استفاده شده در حالت مایع، فقط رقیق‌کننده آندرومید منجر به تغییر نسبت جنسیت شد. رقیق‌کننده آندرومید دارای ویژگی‌های خاص نسبت به زرده تخم‌مرغ است که عبارت است از عاری‌بودن از مواد حیوانی که می‌تواند منبع آلودگی باشد و عاری‌بودن از هرگونه هورمون، باکتری و داروهای مختلف است، همچنین تفاوت ترکیبات آن با رقیق‌کننده‌های دیگر و اثر محافظتی بالای آن نسبت به دیگر رقیق‌کننده‌ها می‌تواند دلیل تفاوت مشاهده شده در نتایج به‌دست آمده باشد. برخی از محققین طی آزمایش روی اسپرم انسان گزارش دادند، که اسپرم‌های حامل کروموزم X دارای دانسیته بیش‌تری در ناحیه سر نسبت به اسپرم‌های حامل کروموزم Y هستند، بنابراین این اسپرم‌ها در لایه تحتانی بعد از سانتریفیوژ قرار گرفته، در صورتی‌که اسپرم‌های حامل کروموزم Y به‌دلیل مقدار DNA کم‌تر، بیش‌تر در لایه رویی قرار می‌گیرند [۲۱].

انجماد اسپرم می‌تواند بر مکان و توزیع پروتئین‌ها اثرگذار باشد، اگرچه این اثرات پس از پایان انجماد از بین می‌روند اما تعامل پل‌های دی سولفیدی سیستمین با پروتئین‌ها به منزله اسکلت استخوانی کروماتین پس از فرایند یخ‌گشایی نیز مختل می‌شود [۲۵]. میزان آسیب واردشده به اسپرم، به توانایی خود اسپرم نیز بستگی دارد، با

جدول ۴. اثر رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومید بر

بیان ژن SRY و PLP (خطای استاندارد \pm میانگین)

PLP	SRY	شاهد ^۱
^۱ b	^۱ b	
۰/۷۵ \pm ۰/۱۱ ^c	۱/۳۷ \pm ۰/۱۳ ^a	Swim up ^۲
۰/۹۴ \pm ۰/۱۲ ^b	۰/۹۱ \pm ۰/۱۶ ^b	تریس- زرده تخم‌مرغ
۱/۴۳ \pm ۰/۱۶ ^a	۰/۶۴ \pm ۰/۱۱ ^c	آندرومید

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است ($P < 0/05$).

۱. AU) Arbitray unit به‌طور اختیاری عدد ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته می‌شود [۱۴].

۲. به‌منظور شست‌وشوی منی و حذف سلول‌های مرده انجام شد.

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۵، انجماد منی با استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ منجر به افزایش معنی‌دار در ژن SRY ($P = 0/001$) و کاهش معنی‌دار ژن PLP شده است ($P < 0/0001$)، برخلاف نتایج حاصل از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ، استفاده از رقیق‌کننده آندرومید، موجب کاهش معنی‌دار ژن SRY ($P = 0/006$) و افزایش معنی‌دار ژن PLP ($P = 0/002$) بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی گردید.

جدول ۵. اثر افزودن رقیق‌کننده آندرومید و تریس- زرده

تخم‌مرغ بر بیان ژن SRY و PLP بعد از فرایند انجماد-

یخ‌گشایی (خطای استاندارد \pm میانگین)

PLP	SRY	شاهد ^۱
^۱ b	^۱ b	
۰/۳۰ \pm ۰/۰۶ ^c	۱/۱۹ \pm ۰/۰۵ ^a	تریس- زرده تخم‌مرغ
۱/۷۳ \pm ۰/۱۹ ^a	۰/۶۱ \pm ۰/۱۲ ^c	آندرومید

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است ($P < 0/05$).

۱. AU) Arbitray unit به‌طور اختیاری عدد ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته می‌شود [۱۴].

نتایج مندرج در جدول ۴ نشان داد که تکنیک Swim

up منجر به افزایش درصد اسپرم حامل کروموزم Y و

در تیمار منجمدشده با آندرومید مطابقت داشته اما با نتایج نمونه‌های منجمدشده با زرده تخم مرغ مطابقت ندارد. طبق پژوهش حاضر استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف طی فرایند انجماد اثرات متفاوتی روی نسبت جنسیت دارد. دلایل تفاوت نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y، بین منی تازه و منجمد شناخته شده نیست، اگر اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y دارای حساسیت متفاوت نسبت به انجماد باشند، می‌تواند تفاوت مشاهده شده در نسبت جنسیت را توضیح دهد [۲۴].

در پژوهش حاضر این نتیجه به دست آمد که علاوه بر فرایند انجماد، نوع رقیق‌کننده مورد استفاده جهت انجماد بر نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y مؤثر بوده است. رقیق کردن منی موجب کاهش غلظت‌های ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم شده، در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند، وقتی اسپرماتوزوآ طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند، شرایط برای تولید (رادیکال‌های آزاد اکسیژن) ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق شده اسپرم‌ها را آسیب‌پذیرتر می‌نماید [۱۳]. به دلیل تفاوت در ترکیبات رقیق‌کننده‌های استفاده شده و تفاوت در تحمل اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y در محیط اسپرم، مرگ‌ومیر در محیط‌های مختلف، متفاوت بوده که نتیجه آن تغییرات متفاوت در نسبت جنسیت منی است. احتمال داده می‌شود که در نتایج مربوط به رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ به دلیل اثر محافظتی کم آن نسبت به رقیق‌کننده آندرومید، افزایش خطر آلودگی میکروبی و عدم استفاده از آنتی‌اکسیدان در این رقیق‌کننده، درصد بیش‌تری از اسپرم‌های حامل کروموزوم X نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y طی فرایند انجماد از بین رفته که منجر به کاهش معنی‌دار نسبت ژن PLP و افزایش معنی‌دار نسبت ژن SRY شده باشد. با توجه به نتایج ارائه

توجه به آن که قطعه‌قطعه شدن DNA یک نگرانی محسوب می‌شود، تأثیر آن بر عملکرد تولیدمثلی اسپرم بارز می‌باشد، از جمله علل اصلی آسیب DNA اسپرم، می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو، کمبود پروتامین در طی بسته‌بندی کروماتین و نیز آپوپتوز اشاره نمود و این نقایص می‌تواند با میزان لقاح و باروری در افراد نابارور مرتبط باشد [۲۲]. مطالعات انجام شده در این زمینه، مکانیسم اثر انجماد بر هسته اسپرم به‌ویژه کروماتین را بررسی می‌کنند، کروماتین اسپرم از DNA و نوکلئوپروتئین‌ها، عمدتاً پروتامین (P1 و P2) و درصد کمی هیستامین تشکیل شده است [۲۳]. نوع پروتامین‌ها و هم‌چنین نسبت P1 به P2 بین گونه‌های مختلف یکسان نیستند که می‌تواند بر میزان مقاومت هسته نسبت به فرایند انجماد و یخ‌گشایی اثرگذار باشد، تاکنون مکانیسم‌هایی که علت افزایش قطعه‌قطعه شدن DNA را پس از انجماد توضیح دهد، مشخص نشده اما به نظر می‌رسد که در ارتباط با افزایش آسیب اکسیداتیو DNA باشد. انجماد اسپرم باعث تغییر در ساختار کروماتین، اختلال در ژن‌های مهم دخیل در لقاح و رشدونمو جنین و هم‌چنین آسیب غلاف اطراف هسته اسپرم و تغییر در ثبات پروتئین اکتین‌ها و در نهایت اختلال در بین غلاف و اسکلت اکتینی می‌شود [۲۵].

گزارش شده است که فرایند انجماد موجب تغییر نسبت جنسیت اسپرم به صورت حداقل ۳۰ درصد کاهش در ژن SRY و حداکثر ۶۹ درصد افزایش در ژن ZFX (ژن ماده‌زایی) می‌شود. این تنوع و اختلاف در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y ممکن است به دلیل استفاده از رقیق‌کننده‌ها و یا تحت تأثیر عملیات مختلف روی مایع منی در طی فرایند انجماد، ایجاد شود، انجماد منجر به کاهش اسپرم حامل کروموزوم Y می‌شود که بیان‌کننده حساسیت بالای اسپرم حامل کروموزوم Y نسبت به فرایند انجماد است [۱۱] که با نتایج پژوهش ما

ایجاد شده در نتایج نسبت جنسیت را می‌توان تا حدودی به اختلاف ترکیبات دو رقیق‌کننده نسبت داد. به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که رقیق‌کننده‌های مختلف اثرات متفاوتی روی نسبت جنسیت اسپرم در حالت مایع و پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی دارند و این‌که، استفاده از منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده آندروم و منی منجمدشده با تریس-زرده تخم‌مرغ بتواند به‌ترتیب سبب افزایش ماده‌زایی و نر‌زایی در گله گاوشیری گردد.

منابع

1. خلقی م، حیدری ف، رستم‌زاده ج و رزم کبیر م (۱۳۹۳) بررسی نسبت جمعیت کروموزوم‌های جنسی X و Y در انزال گاوهای نر هلشتاین و نقش غلظت تستوسترون خون بر نسبت جمعیتی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱ (۲۹): ۷۹-۷۲.
2. موسوی م، توحیدی ا، ژندی م، محمدی سنگ چشمه ع. و عموغابدینی ق (۱۳۹۵) اثر سطوح مختلف فشار اسمزی و گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد. مجله تولیدات دامی. ۳ (۱۸): ۶۰۱-۵۹۳.
3. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S and Ashiq M (2016) Optixcell improves the post thaw quality and fertility of buffalo bull sperm. Theriogenology 85(3): 528-532.
4. Azizeddin A, Ashkar FA, King WA and Revay T (2014) Enrichment of Y-Chromosome-Bearing Bull Spermatozoa by Swim-up through a Column. Reproduction in domestic animals 49(1): 1-4.
5. Barbas JP and Mascarenhas RD (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking 10(1): 49-62.
6. Delgado PA, Lester TD, and Rorie RW (2010) Variation in the Ratio of X-to Y-Chromosome Bearing Spermatozoa in Ejaculates of Semen Collected Weekly from Beef Bulls. Animal Science Arkansas Animal Science. 28-30.

شده در جدول ۳، استفاده از رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ منجر به افزایش pH منی شده است، با افزایش pH درصد زنده‌مانی اسپرم حامل کروموزوم X کاهش می‌یابد که منجر به کاهش نسبت زن PLP شده است.

نتایج مربوط به رقیق‌کننده آندروم در جدول ۳، نشان داد که درصدی از اسپرم‌های حامل کروموزوم Y در طی فرایند انجماد از بین رفته است، چرا که اسپرم حامل کروموزوم Y نسبت به اسپرم حامل کروموزوم X در محیط اسیدی آسیب‌پذیرتر است [۱۷]. استفاده از رقیق‌کننده آندروم طی فرایند انجماد منجر به کاهش pH و به‌دنبال آن افزایش مرگ و میر اسپرم‌های حامل کروموزوم Y شد. احتمالاً دلیل دیگر کاهش نسبت اسپرم‌های حامل کروموزوم Y حساسیت بالای آن‌ها نسبت به فرایند انجماد باشد. اسپرم به‌علت تغییراتی که طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی متحمل می‌شود، مستعد آسیب‌های اسمزی، مکانیکی و اکسیداتیو است. راهکاری که امروزه پیشنهاد شده است، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده منی می‌باشد تا از این آسیب‌ها جلوگیری نماید [۱۶]. با توجه به این‌که اثر اصلی زرده تخم‌مرغ در حفظ انجمادی سلول‌ها مربوط به بخش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم مانند لسیتین می‌باشد، لذا استفاده از لسیتین سویا در ترکیب رقیق‌کننده تجاری آندروم به‌عنوان ماده تجاری قابل دسترس در محیط رقیق‌کننده منی می‌تواند کیفیت محیط انجمادی را تا حد قابل‌قبولی افزایش دهد [۷].

با توجه به مطالب ارائه‌شده می‌توان گفت که احتمالاً آنتی‌اکسیدان موجود در رقیق‌کننده آندروم منجر به کاهش اکسیداسیون و آپوپتوز اسپرماتوزوئیدهای حساس شده ولی در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ آنتی‌اکسیدان استفاده نشده، پس درصد مرگ‌ومیر در آن هم بالاتر بوده است. هم‌چنین با توجه به تفاوت فسفولیپید موجود در رقیق‌کننده آندروم با فسفولیپید موجود در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ، اختلاف

7. Forouzanfar, M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, and Nasr-Esfahani MH (2010) In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73(4): 480-487.
8. Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, and Okabe K (2008) Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development* 54(4): 286-289.
9. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, and Rodríguez-Martínez H (2003) Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59(5-6): 1241-1255.
10. Hansen PJ (2013) Alternative Sperm Purification Proce. University of Florida. Animal Science.
11. Hassan BJ, Hossain SO, and Jebur MSh (2016) Evaluation of semen sex ratio in cooled and frozen semen straws by real-time PCR. *Journal of Veterinary Research* 15(3): 225-235.
12. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, and Li WY (2008) Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 57(3): 257-262.
13. Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, and Rehman H (2009) Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71(8): 1326-1329.
14. Larionov A, Krause A, and Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC bioinformatics* 6(1): 62.
15. Miller SA, Dykes DD, and Polesky, HFRN (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16(3): 12-15.
16. Najafi A, Asadi E, Moawad AR, Mikaeili S, Amidi F, Adutwum E, and Sobhani AG (2016) Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. *Fertility and sterility* 106(7): 1658-1665.
17. Papa F, Henrion R, and Breart G (1983) Preconceptional selection of sex using the ionic method. Dietary regime. Results of a 2 years' prospective clinical study. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 12(4): 415-422.
18. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, and Galli A (2006) Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology* 66(9): 2202-2209.
19. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, and Agarwal A (2015) Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *System Biology Reproduction Medicen* 61(1): 1-12.
20. Skoff RP, Bessert D A, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave KA, and Armant DR (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. *Cell death and differentiation* 11(12): 1247.
21. Sumner AT, Robinson JA and Evans HJ (1971) Distinguishing between XY and YY-bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content. *Nature new biology* 229: 231-233.
22. Tavalae M, Abbasi H, Deemeh MR, Fotohi F, Gilani, MAS and Esfahani M HN (2012) Semen parameters and chromatin packaging in microsurgical varicocele patients. *International journal of fertility & sterility* 6(3): 165.
23. Ward WS (2009) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 16(1): 30-36.
24. Xu ZZ, Johnson DL, and Burton LJ (2000) Factors affecting the sex ratio in dairy cattle in New Zealand. *Proceedings-new zealand society of animal production. New Zealand Society of Animal Production* 60: 301-302.
25. Yeste M (2016) Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85(1): 47-64.