



دانشگاه گورگان
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد هفتم، شماره اول، ۱۳۹۸

<http://ejrr.gau.ac.ir>

اثرات تیمار با ملاتونین و تغییرات طول شبانه روز بر فراسنجه‌های تولید مثلی و هورمونی قوچ افشاری در خارج از فصل تولید مثل

*اطهره رجایی مقدم^۱، رضا معصومی^۲، مجید شاهمرادی^۳

^۱فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

^۲دانشیار و ^۳استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: تغییرات فصلی (تغییر ساعات روشنایی و تاریکی) در قوچ بر اندازه بیضه، تولید مایع منی، غلظت تستوسترون پلازما و رفتار جنسی مجدداً اثر می‌گذارد که به‌طور کلی این تغییرات فصلی از بهار به پاییز افزایش می‌یابد. تجویز ملاتونین در زمان مناسب از سال و یا به دنبال روزهای بلند، اثر روز کوتاه طبیعی را در بالا بردن فعالیت تولید مثلی در قوچ تقلید می‌کند. بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثرات کاشت ملاتونین و تغییرات طول شبانه روز بر کیفیت و کمیت اسپرم قوچ افشاری در خارج از فصل تولید مثل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: دوازده رأس قوچ افشاری (۶ قوچ بالغ سه تا چهار ساله و ۶ قوچ یک ساله) به‌طور تصادفی به سه گروه آزمایشی اختصاص داده شدند: در گروه شاهد، حیوانات به مدت ۶۰ روز از اوایل اردیبهشت تا اوایل تیرماه در معرض طول روز و شب طبیعی (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. در گروه ملاتونین، حیوانات با رژیم نوری گروه شاهد + دو عدد ایمپلنت ملاتونین (هر کدام دارای ۱۸ میلی‌گرم ملاتونین) تیمار شدند. در گروه سوم (رژیم نوری)، حیوانات در معرض ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ابعاد بیضه قوچ‌ها پنج بار با فاصله دو هفته اندازه‌گیری شد و نمونه منی یک بار در هفته جمع‌آوری شد. فراسنجه‌های حرکتی منی با کمک سیستم کاسا اندازه‌گیری شد. همچنین، برای اندازه‌گیری غلظت تستوسترون، نمونه خون از تمام قوچ‌ها در روز ۰، ۱۸، ۳۰، ۴۱ و ۵۰ پس از کاشت ملاتونین و اجرای رژیم نوری گرفته شد. برای اندازه‌گیری غلظت ملاتونین پلازما، نمونه خون از تمام قوچ‌ها در روز ۳۰، ۴۱ و ۵۰ پس از کاشت ملاتونین و اجرای رژیم نوری گرفته شد.

یافته‌ها: حرکت توده‌ای اسپرم در گروه رژیم نوری (۴/۷۱±۰/۱۶٪) و تیمار ملاتونین (۴/۴۱±۰/۱۶٪) نسبت به گروه شاهد (۴/۰۶±۰/۱۶٪) افزایش یافت (P=۰/۰۱). علاوه بر این، غلظت اسپرم در گروه ملاتونین (اسپرم/ میلی‌لیتر ۰/۲۵±۰/۳۲×۱۰^۹) نسبت به گروه‌های شاهد (اسپرم/ میلی‌لیتر ۰/۲۵±۰/۱۷×۱۰^۹) و رژیم نوری (اسپرم/ میلی‌لیتر ۰/۲۵±۰/۱۲×۱۰^۹) به صورت معنی‌داری افزایش یافت (P=۰/۰۰۲). میانگین سلول‌های اسپرم متورم در گروه ملاتونین (۴/۷۹±۰/۲۲٪) یا در گروه رژیم نوری (۴/۷۹±۰/۳۷×۱۰^۹) تفاوت معنی‌داری نشان دادند (P=۰/۰۵) میانگین سلول‌های اسپرم زنده در گروه ملاتونین (۳/۱۸±۰/۹۹×۱۰^۹)

*نویسنده مسئول: mahdirha@yahoo.com

نسبت به شاهد (۷۷/۴۰±۲/۷۵) به صورت معنی داری کاهش یافت (P=۰/۰۱). غلظت ملاتونین پلاسمای خون در گروه ملاتونین نسبت به گروه رژیم نوری و شاهد در روزهای مختلف نمونه گیری افزایش یافت. غلظت تستوسترون پلاسمای در روزهای مختلف نمونه گیری تحت تاثیر کاشت ملاتونین یا رژیم نوری قرار نگرفت (P=۰/۰۵). اندازه محیط بیضه چپ در گروه رژیم نوری (۳۶۴۴۵/۶±۰/۴۲) و در گروه ملاتونین (۳۵۶۶۵±۰/۴۲ cm) تفاوت معنی داری نشان نداد. میانگین محیط بیضه راست در تیمار ملاتونین کم تر از دو تیمار دیگر بود و تفاوت بین آنها در سطح (P=۰/۰۸) تمایل به معنی داری داشت، اگرچه، میانگین طول بیضه چپ و راست در گروه شاهد، ملاتونین و رژیم نوری تفاوت معنی داری نشان نداد.

واژه های کلیدی: قوچ افشاری، ملاتونین، رژیم نوری، تستوسترون، کیفیت اسپرم

مقدمه

سلول های اسپرماتوگونی را افزایش و تقسیمات اسپرماتوگونی که در طول فصل تولید مثل وجود دارد را در طول سال حفظ می کند (۱۰). در نژاد آلباین و سانن، چرخه رژیم نوری (دو ماه روزهای بلند و پس از دو ماه، روزهای کوتاه) باعث بهبود کیفیت اسپرم همانند تحت شرایط رژیم نوری طبیعی می شود (۱۱). در قوچ، تغییرات فصلی بر اندازه بیضه، تولید مایع منی، غلظت تستوسترون پلاسمای و رفتار جنسی اثر می گذارد که به طور کلی این تغییرات از بهار به پاییز افزایش می یابند (۲۲). تجویز ملاتونین در زمان مناسب از سال و یا بعد از اعمال روزهای بلند، اثراتی همانند روز کوتاه طبیعی در بالا بردن فعالیت تولید مثلی قوچ دارد (۱۷). پیش از تیمار با ملاتونین و قرار گرفتن قوچ ها در معرض روزهای کوتاه زمستان، نیاز به یک رژیم روزهای بلند مصنوعی قبل از درمان می باشد. درمان قوچ ها با ملاتونین باعث افزایش اندازه بیضه، بهبود کیفیت اسپرم و عملکرد تولید مثل می شود (۵).

ملاتونین ممکن است تولید هورمون آزادکننده گنادوتروپین، لوتیوتروپین و هورمون محرک فولیکول را تنظیم کند (۱۹). به نظر می رسد که ملاتونین در تنظیم توسعه بیضه توسط اتصال به گیرنده های خاص خود در بیضه، نقش داشته باشد (۱۸). در مجموع، با توجه به تحقیقات انجام شده در خارج از فصل تولید مثل، به نظر می رسد که درمان قوچ با ملاتونین باعث

فصل تولید مثل نشخوارکنندگان کوچک که در مناطق کوهستانی زندگی می کنند کوتاه بوده و معمولاً از اواخر تابستان شروع می شود (۱). تغییرات طول روز (چرخه روشنایی - تاریکی)، تولید مثل این گونه ها را تنظیم می کند (۱۵). فعالیت بیضه و اسپرماتوزن در فصل پاییز که رژیم نوری کوتاه است به حداکثر خود می رسد. فصل پاییز بهترین زمان جمع آوری منی جهت انجماد و ذخیره اسپرم است و اگر این رژیم طولانی تر شود به جمع آوری اسپرم های با کیفیت کمک خواهد کرد (۶). در مناطق معتدل، چرخه تولید مثلی توسط رژیم نوری کنترل می شود (۳۰). اگر چه، تنوع قابل توجهی در تمام شدن رژیم فعالیت چرخه تولید مثلی در بین گونه ها وجود دارد (۱۴). دستکاری چرخه های نوری در این گونه ها با وجود محدودیت فصلی بودن رفتار جنسی و تولید اسپرم، امکان جمع آوری منی در طول سال را فراهم می کند (۴). تحت شرایط طبیعی، روزهای طولانی، فعالیت تولید مثلی را مهار و روزهای کوتاه، فعالیت تولید مثلی را تحریک می کنند (۹). با این حال، قرار گرفتن حیوانات نر در روزهای کوتاه مصنوعی به این رژیم نوری مقاوم می شوند (۳). جهت پیشگیری از این اتفاق، تغییرات بین روزهای بلند و کوتاه باید فراهم گردد (۸). در واقع، نشان داده شده است که تغییرات ماهیانه در روزهای بلند و کوتاه، تعداد

و کمیت اسپرم قوچ افشاری در خارج از فصل تولید مثل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در طول فصل غیر تولید مثلی از اوایل اردیبهشت تا اوایل تیرماه سال ۹۵ در مزرعه دانشگاه زنجان انجام شد. دوازده رأس قوچ افشاری (۶ رأس قوچ یکساله با میانگین وزنی $8/33 \pm 65/16$ کیلوگرم و ۶ رأس قوچ بالغ سه تا چهار ساله با میانگین وزنی $7/02 \pm 98/61$) در این مطالعه استفاده شد. حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند و مدت آزمایش ۶۰ روز بود: در گروه شاهد، قوچ‌ها (دو رأس قوچ یکساله و دو رأس قوچ بالغ سه تا چهارساله) در بهار بند و در شرایط آب و هوایی آزاد و طول شب و روز طبیعی نگهداری شدند. در گروه ملاتونین، قوچ‌ها (دو رأس قوچ یکساله و دو رأس قوچ بالغ سه تا چهارساله) در شرایط گروه شاهد با اضافه دو ایمپلنت ملاتونین حاوی ۱۸ میلی گرم ملاتونین، ساخت شرکت Ceva Animal Health ساخت فرانسه، یکی در ناحیه زیر پوست گوش چپ و دیگری در گوش راست تیمار شدند. در گروه سوم (گروه رژیم نوری) حیوانات (دو رأس قوچ یک ساله و دو رأس قوچ بالغ سه تا چهار ساله) در شرایط ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی قرار گرفتند که ۸ ساعت روشنایی را در بهار بند و در شرایط گروه شاهد و از ساعت چهار عصر تا هشت صبح فردا در جایگاه تاریکی که در داخل سالن آماده شده بود نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری تستوسترون با استفاده از کیت الایزا تستوسترون ساخت شرکت Monobind Inc. آمریکا (ضریب تغییرات: برای نرها، ۱۰-۲/۵، برای ماده‌ها،

افزایش اندازه بیضه، بهبود کیفیت اسپرم و عملکرد تولید مثلی می‌شود (۵). حیوان تغییر فصل را از طریق تغییر تعداد ساعات روشنایی تشخیص می‌دهد (۲۴). محرک روشنایی به کمک ملاتونین تبدیل به سیگنال‌های درون زادی می‌شود (۷). در آغاز فصل تولید مثل، کوتاه شدن طول روز سیگنال‌دهی شبانه ملاتونین را افزایش داد که در نتیجه ترشح GnRH را افزایش و در نتیجه بلوغ فولیکول را در بردارد (۳۳). یک مطالعه نشان داده است که اثر طول روز کوتاه می‌تواند با استفاده از ملاتونین خارجی تقلید شود و قبل از کاشت ایمپلنت روز بلند طبیعی یا مصنوعی به حداکثر کردن باروری کمک کند، مشخص شده است که تزریق ملاتونین در اواخر بهار بدون اینکه قبل از کاشت ایمپلنت طولانی کردن روزها اعمال شود هیچ تأثیری بر حجم انزال و غلظت اسپرم و محرک مناسبی برای افزایش ابعاد بیضه و تولید اسپرم ندارد (۳۰). درمان با ملاتونین خارجی، که شبیه اثر روزهای کوتاه، معمولاً باعث تحریک فعالیت تولید مثلی در حیوانات روز کوتاه می‌شود بنابراین ایمپلنت ملاتونین پس از چند روز طولانی مصنوعی یا طبیعی همچنین برای تحریک فعالیت تولید مثلی در خارج از فصل استفاده می‌شود در بز مدیترانه‌ای ایمپلنت ملاتونین در فصل بهار (در طول استراحت طبیعی حیوانات از فعالیت جنسی)، غلظت تستوسترون پلاسمای منی بالاتر، حجم انزال بالاتر و غلظت اسپرم بالاتر نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (۳۵). هورمون ملاتونین به‌طور طبیعی داخل و خارج از فصل تولید مثل ترشح می‌شود، اما میزان ترشح آن، خارج از فصل تولید مثل به شدت کاهش می‌یابد (۵).

بنابراین، هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثرات کاشت ملاتونین و تغییرات طول شبانه روز بر کیفیت

درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس درصد کل اسپرم‌های متحرک در پنج میدان توسط سیستم کاسا (ساخت شرکت هوشمند فن‌آور، ایران) ثبت شد. جهت ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های اسپرم و یکپارچگی غشا سلول‌های اسپرم به ترتیب از روش‌های رنگ‌آمیزی ائوزین - نگرزین و آزمون هاست استفاده شد. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش مدل میکس تجزیه و تحلیل شد. مدل استفاده شده در این تحقیق به صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + c_j + e_{ijk}$$

μ = میانگین کل

a_i = اثر تیمار

c_j = اثر تصادفی حیوان

e_{ijk} = خطای آزمایش

نتایج و بحث

نتایج فراسنجه‌های مربوط به حجم منی، تحرک موجی، تحرک کل، تمامیت غشای پلاسمایی، غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده در نمونه‌های جمع‌آوری شده، در جدول ۱ نشان شده است.

میانگین حجم نمونه منی در تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد. به صورت مشابه با نتایج مطالعه حاضر، استفاده از ملاتونین در مطالعه رزا و همکاران (۲۰۱۲) اثری بر حجم انزال نداشت (۳۰). اگرچه، تجویز ملاتونین در زمان مناسب از سال و یا به دنبال روزهای بلندتر روز کوتاه طبیعی را در بالا بردن فعالیت تولید مثلی در قوچ تقلید می‌کند و می‌تواند فراسنجه‌های تولید مثلی را بهبود دهد (۱۷). قبل از اینکه قوچ‌ها در معرض روزهای کوتاه زمستان قرار گیرند، نیاز به سپری کردن یک رژیم روزهای بلند مصنوعی قبل از کاشت ملاتونین دارند. در نیمکره شمالی، برنامه ملاتونین از اواسط بهار، اثری بر رفتار جنسی، قطر بیضه، حجم مایع منی و غلظت اسپرم

۰/۲-۰/۹۵؛ حساسیت کیت: ۰/۵۷۶ pg) نمونه خون از تمام قوچ‌ها در روز ۰، ۱۸، ۳۰، ۴۱ و ۵۰ پس از کاشت ملاتونین و اجرای رژیم نوری، از سیاهرگ وداج جمع‌آوری شد.

همچنین برای اندازه‌گیری ملاتونین با استفاده از کیت الایزا ملاتونین (ساخت شرکت IBLINTERNATIONAL هامبورگ آلمان) (ضریب تغییرات ۰/۲۳۹-۲/۱۹۴، حساسیت کیت: ۰/۳۰۰ pg و شماره کیت: Re۵۴۰۲۱)، نمونه خون از تمام قوچ‌ها در روز ۳۰، ۴۱ و ۵۰ پس از کاشت ملاتونین و اجرای رژیم نوری، از سیاهرگ وداج جمع‌آوری شد و در سرم اندازه‌گیری انجام گرفت.

جهت ارزیابی اثرات تیمارها بر ویژگی‌های اسپرم، نمونه منی یک بار در هفته بوسیله واژن مصنوعی جمع‌آوری شد. قبل از نمونه‌گیری، واژن‌های مصنوعی شستشو و استریل شدند. نمونه اسپرم هر قوچ پس از جمع‌آوری در داخل فلاکس آب ۳۷ درجه قرار داده شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در حمام بن ماری با دمای آب ۳۷ درجه انتقال قرار داده شد. سپس فراسنجه‌های اسپرم:

حجم منی، غلظت اسپرم، میزان تحرک پیش رونده، تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم در آزمایشگاه اندازه‌گیری گردید. پهنای و طول بیضه قوچ‌ها در پنج نوبت در فاصله دو هفته از ۱۱ اردیبهشت تا ۱۲ تیرماه با استفاده از متر نواری اندازه‌گیری شدند. محیط بیضه قوچ‌ها با استفاده از فرمول $a^2 b / 6.28$ (a: پهنای بیضه، b: طول بیضه) محاسبه شد. حجم منی توسط لوله‌های مدرج اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم، ابتدا نمونه‌های منی تمام قوچ‌ها به صورت انفرادی به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شده، سپس غلظت اسپرم نمونه‌ها با لام هموسایتومتر تعیین شد. پس از رقیق‌سازی با رقیق‌کننده زرده تخم مرغ، با نسبت ۱:۲۰، یک قطره از نمونه رقیق‌شده روی لام ۳۷

نداشت (۲۹). همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، حرکت توده‌ای اسپرم در گروه رژیم نوری (۴/۷۱±۰/۱۶) و تیمار ملاتونین (۴/۴۱±۰/۱۶) نسبت به گروه شاهد (۴/۰۶±۰/۱۶) افزایش یافت (P=۰/۰۱).

جدول ۱: اثرات تیمارهای ملاتونین و رژیم نوری بر فراسنجه‌های اسپرم

Table 1. The effects of melatonin and photoperiod regimen treatments on semen parameters (mean±SEM)

سطح معنی داری Significance level	شاهد Control	ملاتونین Melatonin	رژیم نوری Photoperiod	منابع تغییرات Sources of changes
0.03	1.08±0.09 ^{ab}	1±0.09 ^b	1.30±0.09 ^a	حجم منی (میلی لیتر) (Semen volume (mL))
0.01	4.06±0.16 ^b	4.41±0.16 ^a	4.71±0.16 ^a	حرکت توده‌ای (Mass movement (%))
0.08	81.18±3.44 ^a	74.30±3.44 ^b	82.86±3.44 ^a	تحرک کل (Total motility (%))
0.05	53.03±4.79 ^{ab}	42.90±4.79 ^b	56.37±4.79 ^a	تمامیت غشا (Plasma membrane integrity (%))
0.002	4.17±0.25 ^a	5.32±0.25 ^b	4.12±0.25 ^a	غلظت اسپرم Sperm concentration (×10 ⁹ mL ⁻¹)
0.004	77.40±2.75 ^a	61.99±2.75 ^b	74.10±2.75 ^a	زنده مانی Sperm viability (%)

حروف متفاوت a, b در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار است.

حمایت اسپرم از گونه‌های بسیار فعال اکسیژنی^۲ بافت اپیتلیوم اپیدیدیم و غدد ضمیمه جنسی، آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و سایر از بین برنده‌های رادیکال آزاد ترشح می‌کنند (۵). در نتیجه، پلاسما منی منبع غنی آنتی اکسیدان‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز است که اثر سمی پراکسید هیدروژن و آنیون سوپر اکسید را خنثی می‌کنند (۱۲). پراکسیداسیون لیپید موجب آسیب به غشاء، به ویژه در ناحیه آکروزوم می‌شود که در نتیجه‌ی این آسیب، تحرک و زنده‌مانی اسپرم کاهش می‌یابد (۲۷). گزارش شده است فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در پلاسما منی قوچ وجود دارد که بیانگر تنظیم فصلی فعالیت این آنزیم‌ها از طریق ملاتونین است (۵).

یکپارچگی غشا سلول‌های اسپرم در گروه رژیم نوری (۵۶/۳۷±۴/۷۹) نسبت به گروه ملاتونین

میانگین تحرک کل در گروه رژیم نوری بالاتر از گروه شاهد بود اما تفاوت معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵) ولی در گروه ملاتونین کاهش معنی‌داری با گروه شاهد داشته است. اثر مهم ملاتونین بر بهبود تحرک اسپرم در طول فصل غیرتولیدمثل که با تغییرات شبه آپوپتوزیس و کاهش نرخ لقاح همراه است، ثبت شده است (۵). مطالعات دیگر نشان می‌دهند که در صورت عدم پیش‌درمانی با روزهای بلند، درمان ملاتونین هیچ اثری در اندازه بیضه و پارامترهای مایع منی ندارد (۲۹). همسو با نتایج سایر محققین، تیمار با ملاتونین در قوچ‌های مریوکانیو تحرک اسپرم را افزایش داد (۲۰). غشای پلاسما منی اسپرم حاوی اسیدهای چرب غیراشباع است که حساسیت بالایی به پراکسیداسیون لیپید دارند (۵). از آنجاییکه سیتوپلاسم اسپرم فاقد آنتی اکسیدان است (۱۲) برای

نتوانست موجب بهبود غلظت اسپرم در مقایسه با گروه شاهد گردد. باید در نظر گرفت که تغییر رژیم‌های نوری به تنهایی موجب بهبود فراسنجه‌های تولید مثلی به ویژه در خارج از فصل تولید مثلی نمی‌شود و عوامل مختلف دیگری می‌توانند در این خصوص تاثیر گذار باشند. محققین دیگر، اثرات تغذیه را در فعالیت تولید مثلی قوچ‌ها مهم‌تر از اثر تغییرات چرخه‌های نوری دانسته‌اند (۲۵).

علی‌رغم بهبود در غلظت اسپرم در گروه ملاتونین، میانگین سلول‌های اسپرم زنده در این گروه ($61/99 \pm 3/18$) نسبت به گروه شاهد ($77/40 \pm 2/75$) کاهش یافت. اگرچه تفاوت معنی‌داری در میانگین درصد سلول‌های اسپرم زنده گروه‌های شاهد و رژیم نوری ($74/10 \pm 2/75$) مشاهده نشد. علاوه بر این، گزارش شده است که استفاده از یک عدد ملاتونین کاشتنی در خارج از فصل تولید مثل اثر معنی‌داری بر زنده‌مانی اسپرم قوچ‌های نژاد کونیا مرینو نداشت (۲۰). در توجیه این یافته، به نظر می‌رسد که همبستگی منفی بین میزان تولید اسپرم و درصد سلول‌های زنده وجود داشته باشد.

به‌صورت معنی‌داری بهبود یافت ($4/79 \pm 2/90$) اگرچه تفاوت دو گروه تیماری با گروه شاهد ($53/03 \pm 4/79$) معنی‌دار نبود ($p=0/05$) ولی در گروه ملاتونین کاهش معنی‌داری با گروه شاهد داشته است. آسیب ماتریکس لیبید موجب از دست رفتن یکپارچگی غشا، تخریب غشا (در نتیجه‌ی فاز انتقال غشا)، کاهش تحرک، از دست دادن باروری و تخریب نوکلئیک اسید از طریق واکنش‌های اکسیداتیو می‌گردد (۳۲). با وجود اینکه ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی شناخته می‌شود، اما به نظر نمی‌رسد که تیمار با ملاتونین موجب بهبود تمامیت غشا در این گروه شده باشد اگرچه تیمار با ملاتونین موجب افزایش میانگین غلظت اسپرم ($5/32 \pm 0/25$) نسبت به گروه شاهد ($4/12 \pm 0/25$) و گروه رژیم نوری ($4/17 \pm 0/25$) شد. همانگونه که قبلاً اشاره گردید، ملاتونین می‌تواند موجب تحریک تقسیمات سلول‌های اسپرماتوگونی و افزایش تولید روزانه اسپرم گردد. در مطالعات پیشین، تغییرات رژیم‌های نوری موجب بهبود تولید اسپرم در قوچ نژاد دورست گردیده، در حالی که بر تولید اسپرم قوچ نژاد فین اثری نداشته است (۲). در مطالعه حاضر رژیم نوری

جدول ۲: اثرات تیمارهای مختلف ملاتونین و رژیم نوری بر محیط و طول بیضه

Table 2. Effects of melatonin and photoperiod regimen treatments on scrotal circumference and length of the testis (mean±SEM)

سطح معنی‌داری Significance level	شاهد Control	ملاتونین Melatonin	رژیم نوری Photoperiod	منابع تغییرات Sources of changes
0.1	36445.6±0.42	35665/3±0.42	39269±0.42	محیط بیضه چپ (سانتی‌متر) (Left scrotal (cm)) circumference
0.08	37860.3±0.47 ^a	32554.6±47 ^b	37409.1 ±0.47 ^a	محیط بیضه راست (سانتی‌متر) (Right scrotal (cm)) circumference
0.9	16.08±0.45	15.90±0.45	16.12±0.45	طول بیضه چپ (سانتی‌متر) (Left testis length (cm))
0.9	15.93±0.47	15.54±0.47	15.93±0.47	طول بیضه راست (سانتی‌متر) (Right testis length (cm))

حروف متفاوت a, b در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است.

جدول ۳: اثر تیمارهای مختلف ملاتونین و رژیم نوری بر غلظت ملاتونین پلاسما در روزهای مختلف

Table 3. Effects of melatonin and photoperiod regimen on plasma melatonin concentrations on different days (mean±SEM)

شاهد Controls	ملاتونین Melatonin	رژیم نوری Photoperiod	منابع تغییرات Sources of changes
67.22±30.8 ^a	252.48±30.8 ^b	137.68±30.8 ^a	روز ۳۰ (day 30)
104.30±30.8 ^a	303.88±30.8 ^b	141.75±30.8 ^a	روز ۴۱ (Day41)
84.98±30.8 ^a	268.58±3.8 ^b	101.50±30.8 ^a	روز ۵۰ (Day50)

حروف متفاوت a, b در ردیف نشان می‌دهند که تفاوت‌ها در سطح (P<۰/۰۵) معنی‌دار است.*

توجهی در محیط اسکروتوم گردید اما در قوچ‌های رسا آراگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های ملاتونین و شاهد مشاهده نشد (۲۶).

همانطوری که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، تفاوت معنی‌داری در طول رژیم‌های آزمایشی در غلظت ملاتونین پلاسما در گروه ملاتونین با گروه شاهد و رژیم‌های نوری در روزهای مختلف نمونه‌گیری (۳۰، ۴۱ و ۵۰) پس از کاشت ملاتونین وجود دارد، به‌صورتی که غلظت ملاتونین پلاسما در روزهای مختلف نمونه‌گیری در گروه تیمار شده با ایمپلنت ملاتونین نسبت به گروه شاهد و رژیم نوری همواره بالاتر می‌باشد. از طرف دیگر، اگرچه غلظت ملاتونین پلاسما در گروه رژیم نوری نسبت به گروه شاهد در روزهای مختلف نمونه‌گیری بیشتر می‌باشد، اما این افزایش معنی‌دار نبود. در یک مطالعه، سطوح ملاتونین پلاسما در قوچ‌های دارای ایمپلنت ملاتونین در طول روز ۴-۲/۵ برابر افزایش یافت، اگرچه، سطوح ملاتونین پلاسما در قوچ‌های گروه شاهد نیز افزایش یافت اما مقدار آن نسبت به گروه دارای ایمپلنت کمتر گزارش گردید (۱۱). در گزارشی دیگر، غلظت ملاتونین پلاسما قوچ‌های برولا در هفته دوم پس از کاشت، نسبت به قوچ‌های بدون ایمپلنت افزایش

همانطوری که در جدول ۲ نشان داده شده است، تفاوت معنی‌داری در محیط بیضه چپ در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. اگرچه، تفاوت معنی‌داری در میانگین محیط بیضه راست در گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد، اما تفاوت میانگین گروه ملاتونین با گروه‌های شاهد و رژیم نوری تمایل به معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۸) به‌صورتی که طول محیط بیضه راست در گروه ملاتونین کمتر از دو گروه دیگر بود. تفاوت معنی‌داری در میانگین طول بیضه چپ و راست در گروه‌های شاهد، ملاتونین و رژیم‌های نوری مشاهده نشد. در بسیاری از نژادها تغییرات اندازه بیضه ممکن است تنها به دلیل تغییرات رژیم‌های نوری نباشد بلکه به عوامل محیطی دیگری مانند تغذیه ارتباط داشته باشد (۲۴). بررسی اثر فصل بر اندازه بیضه و رفتارهای جنسی بزهای نر مدیترانه‌ای نشان داد که در این نژاد حداکثر قطر بیضه طی روزهای بلند سال دیده می‌شود و طول روز تنها عامل محیطی موثر در تغییرات اندازه بیضه نیست، بلکه عوامل محیطی دیگری مانند درجه حرارت محیط و هم‌چنین سطوح تغذیه‌ای و تفاوت‌های نژادی نیز در این رابطه موثرند (۲۸). برخلاف نتایج مطالعه حاضر، کاشت ملاتونین در قوچ عساف^۲ و منچگا^۳ موجب افزایش قابل

3. Assaf

4. Manchega

یافت و در هفته چهارم اختلاف به سطح معنی داری رسید (۱۳).

جدول ۴: اثرات تیمارهای مختلف ملاتونین و رژیم نوری بر غلظت تستوسترون پلاسما در روزهای مختلف

Table 4. Effects of melatonin and photoperiod regimen on plasma testosterone concentrations on different days (mean±SEM)

شاهد	ملاتونین	رژیم نوری	منابع تغییرات
Control	Melatonin	Photoperiod	Sources of Changes
7.30±2.45	6.02±2.45	6.02±2.45	روز ۰ (Day 0)
6.43±2.45	7.81±2.45	9.95±2.45	روز ۱۸ (Day 18)
3.70±2.45	6.45±2.45	7.60±2.45	روز ۳۰ (Day 30)
7.41±2.45	4.99±2.45	10.51±2.45	روز ۴۱ (Day 41)
1.81±2.45	5.32±2.45	4.18±2.45	روز ۵۰ (Day 50)

*حروف متفاوت a, b در ردیف نشان می دهند که تفاوتها در سطح (P<۰/۰۵) معنی دار است.

گروه شاهد و گروه رژیم نوری افزایش یافت در صورتی که رژیم نوری نتوانست موجب افزایش غلظت ملاتونین پلاسما در مقایسه با گروه شاهد شود. غلظت تستوسترون پلاسما در اثر کاشت ملاتونین و یا اعمال رژیم نوری در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری نشان نداد. در مجموع به نظر می رسد که کاشت ملاتونین نسبت به تغییر رژیم نوری اعمال شده در این آزمایش، راهبرد مناسبی جهت بهبود فراسنجه های تولید مثلی قوچ افشاری در خارج از فصل تولید مثل باشد.

منابع

1. Abaigar, T., Domene, M.A. and Cassinello, J. 2012. Characterization of the estrous cycle and reproductive traits of the aoudad (*Ammotragus lervia*) in captivity. *Theriogenology*. 77: 1759–1766.
2. Alamy, M.A., Foote, R.H. and Hare, E. 2001. Sperm output and concentration in Finn and Dorset rams exposed to long and short- day lighting. *J. Theriogenology*. 56: 839-854.
3. Almeida, O.F.X. and Lincoln, G.A. 1984. Reproductive photo refractoriness

مقایسه میانگین غلظت تستوسترون پلاسما در گروه های آزمایشی نشان می دهد که تفاوت معنی داری در غلظت تستوسترون پلاسما قوچ های تیمار شده با ملاتونین و یا رژیم نوری با گروه شاهد در روزهای مختلف نمونه گیری (۰، ۱۸، ۳۰، ۴۱ و ۵۰) وجود ندارد بصورتی که تیمار با ملاتونین یا تغییر رژیم نوری موجب افزایش غلظت تستوسترون پلاسما نگردد. در مقابل این یافته، گزارش شده است که ملاتونین ترشح تستوسترون را افزایش می دهد و احتمالاً فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را تنظیم می کند (۲۱).

نتیجه گیری کلی

کاشت ملاتونین در این مطالعه در نژاد قوچ های افشاری موجب افزایش غلظت و تحرک پیش رونده اسپرم گردید هم چنین اجرای رژیم نوری موجب افزایش حرکت پیش رونده اسپرم نسبت به شاهد شد. علاوه بر این، کاشت ملاتونین و اجرای رژیم نوری هیچ اثری بر ابعاد بیضه قوچ ها نداشت. غلظت ملاتونین پلاسما خون گروه ملاتونین در مقایسه با

- Reproduction nutrition development . 35: 549–558.
11. Delgadillo, J.A., Leboeuf, B. and Chemineau, P. 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reproduction Nutrition Development*. 33: 609–617.
 12. Donmez, N., Karaca, F., Belge, F. and Ates, C.T. 2004. The effects of melatonin application on some hematological parameters and thyroid hormones and testosterone in male goats' non breeding season. *Veterinarski Archiv*. 74: 281–287.
 13. El-Sisy, G.A., El-Nattat, W.S. and El-Sheshtawy, R.I. 2008. Effect of superoxide dismutase and catalase on viability of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Global Veterinaria*. 2: 56–61.
 14. Fitzgerald, J.A. and Stellflug, J.N. 1991. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *Journal of animal science*. 69: 264–275.
 15. Gomez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Malpoux, B., Chemineau, P., Tortonesi, D.J. and Lopez-Sebastian, A. 2012. Ovulatory activity and plasmaprolactin concentrations in wild and domestic ewes exposed to artificial photoperiods between the winter and summer solstices. *Animal Reproduction Science*. 132: 36–43.
 16. Hafez, E.S.E. 1952. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. *Journal of Agricultural Science*. 42: 189–265.
 17. Hanif, M. and Williams, H.L. 1991. The effect of melatonin and light treatment on reproductive performance of yearling Suffolk rams. *British Veterinary Journal*. 147: 49–56.
 18. Izzo, G., Francesco, A., Ferrara, D., Campitiello, MR., Serino, I., Minucci, S. and dIstria, M. 2010. Expression of melatonin (MT1, MT2) and melatonin-related receptors in the adult rat testes and during development. *Zygote*. 18: 257–64.
 19. Johnston, J.D., Klosien, P., Barrett, P. and Hazlerigg, D.G. 2006. Regulation of in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. *Biology of reproduction*. 30: 143–158.
 4. Arrebola, F.A., Perez-Martin, C.C. and Santiago-Moreno, J. 2010. Limitation of seasonality in reproductive parameters of Mediterranean bucks, using photoperiod treatment. *Small Ruminant Research*. 89: 31–35.
 5. Casao, A., Vega, S., Palacin, I., Perez-Pe, R., Lavina, A., Quintin, F.J., Sevilla, E., Abecia, J.A., Cebrian-Perez, J.A., Forcada, F. and Muino-Blanco, T. 2010. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 425–432.
 6. Coloma, M.A., Toledano-Diaz, A., Castano, C., Velazquez, R., Gomez-Brunet, A., Lopez Sebastian, A., and Santiago-Moreno, J. 2011. Seasonal variation in reproductive physiological status in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) and its relationship with sperm freezability. *Theriogenology*. 76: 1695–1705.
 7. Chemineau, P., Malpoux, B., Brillard, J.P. and Fostier, A. 2007. Seasonality of reproduction and production in farm fishes, birds and mammals. *Animal*. 1: 419–432.
 8. Delgadillo, J.A. 2011. Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. *Animal*. 5: 74–81.
 9. Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P. and Malpoux, B. 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reproduction Nutrition Development*. 44: 183–193.
 10. Delgadillo, J.A., Hochereau-de Reviers, M.T., Daveau, A., Chemineau, P. 1995. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*).

27. Ramadan, T. A., Taha, T.A., Samak, M. A., Hassan, A. 2009. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*. 71:458–68.
28. Roca, J., Martinez, E., Vazquez, J. M., Ruiz, S. and Coy, P. 1991. Influence of season on testicle size and libido in male goats from the Mediterranean area. *Animal Production*. 52: 317-321.
29. Rosa, H.J.D., Juniper, D.T., and Bryant, M.J. 2000. Effects of recent sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anestrous ewes. *Journal of reproduction and fertility*. 120: 169–176.
30. Rosa, H.J.D., Silva, C.C., and Bryant, M.J. 2012. The effect of melatonin treatment in rams on seasonal variation of testicular size and semen production parameters. *Small Ruminant Research*. 102: 197–201.
31. Shelton, M. 1978. Reproduction and breeding of goats. *Journal of Dairy Science*. 61: 994–1010.
32. Tuncer, P.B., Sariozkan, S., Bucak, M. N., Ulutaş, P.A., Akalın, P.P., Buyukleblebici, S. and Canturk, F. 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*. 75: 1459-1465.
33. Vanecek, J. 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological reviews*. 78: 3.
34. VanVuuren, R.J. Pitout, M.J. and van Aswegen, CH. 1992. Jj Theron Profiles. Putativemelatonin receptor inhuman spermatozoa. *Clin Biochem*. 25: 125–7.
35. Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L. and Malpoux, B. 2010. Effect of artificial long days and/or melatonin treatment on the sexual activity of Mediterranean bucks *Small ruminant research*. 93: 110–118.
- MT melatonin receptor expression in the foetal rat pituitary. *Journal of neuroendocrinology*. 18: 50–56.
20. Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M. B. and Haliloglu, S. 2000. Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 151(12): 1143-1146.
21. Kokolis, N., Theodosiadou, E., Tsantarliotou, M., Rekkas, C., Goulas, P. and Smokovitis, A. 2000. The effect of melatonin implants on blood testosterone and chromosome activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia*. 32: 107–114.
22. Lincoln, G A. and Short, R.V. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*. Renewable energy Company. 36: 1–51.
23. Lopez, E., Brea, G., Palomares, M.D., Perez, S.S. Garzon, Gigler, A. and Montoro, V. 1996. Sperm Characteristics of Manchego ram lambs treated by melatonin implants. *Arch de Zootec*. 45: 395-401.
24. Martin, G., Fisher, J., Blackbery, M., Boukhliq, R., Hotzel, M., Miller, D., Shepherd, K. and Walkden-Brown, S. 1994. Nutritional and photoperiodic control of testicular size in suffolk and Merino rams. *Australian society of animal production*. 20: 427.
25. Mukasa-Mugerwa, E. and Ezaz, Z. 1992. Relationship of testicular growth and size to body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenol*. 38: 979-988.
26. Palacin, I., Abecia, J.A., Forcada, F., Casao, A., Cebrian, J.A., Muino, T., Palacios, C. and Pontes, J. M. 2008. Effects of exogenous melatonin treatment on out-of-season ram fertility. *Italian Journal of Animal Science*. 7: 199–206.



Effects of melatonin and photoperiod regimen on reproductive characteristics and hormonal status of Afshari rams out of breeding season

*A. Rajaei Moghadam¹, R. Masoumi², M. Shahmoradi³

¹M.Sc. Graduated, Dept., of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan. ²Associate and ³Assistant Prof, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

Received: 16/05/2018; Accepted: 16/04/2019

Abstract

Background and objectives: It is well known that rams show a marked seasonal variation in many reproductive aspects, including testicular size, semen production, plasma testosterone concentration and sexual behavior –characteristics that generally increase from spring to autumn. These changes are mainly regulated by photoperiod with long days being inhibitory and short days being stimulatory. The administration of melatonin at the appropriate time of the year, or following a treatment of long days can mimic the stimulatory effect of natural short days in advancing the period of maximum reproductive activity in the ram. The objective of this study was, therefore, to determine whether treating rams with melatonin and photoperiod in mid-spring increased testicular and semen concentration parameters. The aim of present study was to investigate the effects of melatonin and changes in photoperiod regimen on semen characteristics of Afshari rams out of the breeding season.

Material and methods: Twelve rams were randomly allocated into three groups: rams in control group were exposed to natural day photoperiod. In Melatonin group rams were treated as the same as control group plus two melatonin implants (18 mg) one in the area under the skin of the left ear and another in the area below the right ear. In photoperiod regimen group rams were managed as the same as group 1 and 2 until 4 p.m. (8 hours light) and thereafter were kept in dark stall until 8 am. Plasma melatonin and testosterone concentrations were measured by commercial kits. Testicle dimensions were measured five times during experiment and semen samples were taken two days a week for eight weeks. The data were analyzed in a randomized complete block design.

Results: The results showed that photoperiod regimen increased semen wave motion motility in compare to control group ($P= 0.01$). In addition, sperm concentration in melatonin treatment group ($5.32 \times 10^6 \pm 0.25/\text{mL}$) significantly increased in compare to control group ($4.12 \times 10^6 \pm 0.25/\text{mL}$) and photoperiod regimen group ($4.15 \times 10^6 \pm 0.25/\text{mL}$; $P= 0.002$). Plasma membrane integrity in melatonin treatment group ($42.90 \pm 4.79\%$) and in photoperiod group ($56.37 \pm 4.79\%$) on different sampling days were significantly different ($P= 0.05$). Sperm viability in melatonin treatment group ($61.99 \pm 3.18\%$) decreased in compare to control group ($77.40 \pm 2.75\%$) on different sampling days ($P= 0.01$). Plasma melatonin concentration in melatonin group increased in compare to photoperiod group and also control group. Plasma testosterone concentration was not affected significantly in experimental groups on different sampling days following melatonin or photoperiod treatments ($P=0.05$). Left scrotal circumferences in photoperiod regimen group (39269 ± 0.42 cm) and in melatonin treatment group ($35665.3 \pm$

*Corresponding author; mahdirha@yahoo.com

0.42 cm) were not different on sampling days. Right scrotal circumference in melatonin treatment group decreased in compare to control group and photoperiod group on different sampling days ($P= 0.08$), also, left testis length and right testis length in melatonin treatment group, control group and photoperiod group were not different on sampling days.

Keywords: Afshari ram, Melatonin, Photoperiod regimen, Testosterone, Sperm parameters.