Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد سیزدهم، شماره یکم، ویژه‌نامه علوم دامی ۱۳۸۵
www.magiran.com/jasnr

بررسی اثر غلظت های مختلف زرده تخم‌مرغ رقیق‌کننده تریس بر روی تحرک اسپرم بزهای کرکی

*محمدعلی تولایی[۱]، یوسف جعفری‌آهنگری[۱]، سعید حسنی[۱] و محمد نوروزی[۲]
[۱]گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام خراسان
تاریخ دریافت:۸۲/٤/۸ ؛ تاریخ پذیرش:۸۵/۵/۲۱

چکیده

اثرات غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۲/۵، ٤ و ٦ درصد) زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس در شرایط خارج‌سازی پلاسمای منی برروی درصد تحرک اسپرم بزهای کرکی ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند عباس آباد (واقع در جنوب خراسان) در حالت نگهداری آن به‌صورت مایع در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. از ۵ بزنر به روش الکتریکی منی اخذ و بلافاصله پلاسمای منی به روش سانتریوفیوژ جدا گردید. سپس منی فاقد پلاسما به نسبت ۱ به ۲ با رقیق‌کننده تریس در قالب ٤ تیمار (T1، T2، T3 و T4) به‌ترتیب حاوی ۱/۵، ۲/۵، ٤ و ٦ درصد زرده تخم‌مرغ رقیق گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. درصد تحرک اسپرم در تیمارهای ۱ تا ٤ به‌ترتیب ۸۹/۰۷، ۸٤/۹۹، ۷۵/۰٦ و ٦٦/۰۱ بود. بیشترین و کمترین درصد تحرک به‌ترتیب با غلظت ۱/۵ و ٦ درصد بدست آمد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت زرده تخم‌مرغ، تحرک اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). بنابراین برای نگهداری اسپرم بز کرکی به‌صورت مایع پس از خارج‌سازی پلاسمای منی، استفاده از غلظت زرده تخم‌مرغ به میزان ۱/۵ درصد در رقیق‌کننده تریس، پیشنهاد می‌شود.

واژهای کلیدی: تحرک اسپرم، زرده تخم‌مرغ، تریس، پلاسمای منی و بز کرکی

مقدمه

بز کرکی نژاد کشمیر در استان‌های سیستان و بلوچستان و خراسان پراکنده بوده که مرکز پرورش آن در جنوب خراسان واقع می‌باشد. با توجه به سازگاری این نژاد به مراتع خشک جنوب خراسان و تولید کرک مرغوب با قطر حدود ١٦ میکرون و همچنین تولید گوشت به‌عنوان یک نژاد دو منظوره کرکی ـ گوشتی در منطقه شناخته شده است (رشیدی، ۱۳۷۸). به‌منظور کاربرد تکنیک تلقیح مصنوعی بز، رقیق‌کننده‌های مختلفی برای افزایش حجم منی بز نر جهت نگهداری در شرایط مایع و منجمد استفاده شده است (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰).

کاهش درجه حرارت و به‌عبارت دیگر شوک سرمایی وارده به اسپرم منجر به کاهش فعالیت، حرکت و فعالیت متابولیکی اسپرم می‌شود (بلاک شاو و همکاران، ۱۹۵۷؛ لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین شوک سرمایی منجر به افزایش نفوذ پذیری اسپرم‌ها نسبت به آلودگی‌ها، یون‌ها، کلسیم و آنزیم‌ها می‌شود (هامر استد و همکاران،

*-مسئول مکاتبه:tavallaee_56@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱۹۷۸؛ هینکوسکا- گالچوا و همکاران، ۱۹۸۸؛ لبوئوف و همکاران، ۱۹۹۱ و مازور، ۱۹۷۰). سلول اسپرماتوزوآ در نبود ترکیبات محافظت‌کننده مانند زرده تخم‌مرغ، به شوک سرمایی دچار می‌شود (هینکوسکا-گالچوا و همکاران، ۱۹۸۸). تأثیر مخرب پلاسمای منی بز بر قابلیت زنده ماندن و تحرک اسپرماتوزوآ در رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ مشکل به‌خصوصی در نگهداری منی بز بوده است و این تأثیر به آنزیمی نسبت داده شده که منشاء آن از ترشحات غده پیازی پیشابراهی[1] در پلاسمای منی بوده و آنزیم منعقدکننده زرده تخم‌مرغ[2] نامیده می‌شود. این آنزیم به‌عنوان یک فسفولیپاز A شناسایی گردیده که لستین زرده تخم‌مرغ را به اسیدهای چرب و لیزولستین هیدرولیز می‌کند (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). جزء اخیر، لیزولستین، برای اسپرماتوزوآی بز سمی است (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). آنزیم *EYCE* بر پیوند استر با گروه‌های آسیل فسفولیپید زرده تخم‌مرغ عمل می‌کند تا اسیدهای چرب اشباع، اسید پالمیتیک و اسید استئاریک، و غیر اشباع، اسید اولئیک و اسید لینولئیک، را آزاد سازد که به کاهش ناگهانی pH تا حد ٦ منجر می‌شود (آمواه و همکاران، ۱۹۹۷). از این رو توصیه شده است که پلاسمای منی در بز باید تا حد امکان خارج گردد و اینکار با شستن اسپرم‌ها بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی صورت می‌گیرد (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹). همچنین بخاطر تأثیر زیان بار پلاسمای منی بز بر بقاء و تحرک اسپرماتوزوآ در رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ توصیه می‌شود که میزان زرده تخم‌مرغ در این رقیق‌کننده‌ها نسبت به رقیق‌کننده‌های منی قوچ باید کمتر باشد (ایوانس و همکاران، ۱۹۸۷؛ لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰).

ایوانس و همکاران (۱۹۸۰) در بررسی تأثیر خارج‌سازی پلاسمای منی بز برروی درصد تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ، درصد اسپرم تحرک بیشتری را در منی شسته شده نسبت به منی شسته نشده گزارش کردند.

سالامون و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که غلظت زرده تخم‌مرغ در بافر تریس برای رقیق‌سازی منی بز نباید از ۲/۵ درصد تجاوز کند. این در حالی است که غلظت زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس مربوط به قوچ بین ١٤ تا ۲۰ درصد است. کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) در تحقیقی بین غلظت‌های ۱ تا ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس برای منی شسته شده بز، غلظت ۲ درصد را، بهترین سطح زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس معرفی کردند.

ایوانس و همکاران (۱۹۸۷) برای رفع مشکل پلاسمای منی بز خارج‌سازی پلاسمای منی، کاهش درصد زرده تخم‌مرغ و استفاده از رقیق‌کننده‌های فاقد زرده تخم‌مرغ مانند شیر را پیشنهاد کردند. ریتار و همکاران (۱۹۹۱) استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ در بافر تریس را برای نگهداری منی بز آنقوره توصیه نمودند.

هدف از این مطالعه یافتن غلظت بهینه زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس در شرایط خارج‌سازی پلاسمای منی و بررسی تأثیر آن برروی درصد اسپرم متحرک در حالت نگهداری منی بز کرکی به‌صورت مایع بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند عباس‌آباد استان خراسان واقع در کیلومتر ۳۰ جاده مشهد ـ سرخس بین ماه‌های مهر تا دی سال ۱۳۸۱ انجام شد. از ۵ رأس بز نر ۲ ساله نژاد کرکی به وزن ۳± ٤٨ کیلوگرم موجود در ایستگاه اسپرم‌گیری به وسیله دستگاه شوک الکتریکی مدل UA 421, Imv, France انجام شد. برای اسپرم‌گیری ابتدا بز نر مقید شده و سپس میله پلاستیکی حامل الکترود با ژل استریل لوبریکانت آغشته و از طریق مقعد وارد راست روده حیوان گردید. ولتاژ مورد نیاز برای تحریک جهت انزال حداکثر ۱۲ ولت بود (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹). منی اخذ شده، پس از

1- Bulbo Urethral Secretion
2- Egg yolk Coagulating Enzyme

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی اولیه از نظر درصد اسپرم زنده و فعال و حرکت موجی بالاتر از ۳، مخلوط شده و سپس به دو گروه تقسیم گردید. برای خارج‌سازی پلاسمای منی نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول رینگر رقیق و دو بار به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰×g سانتریفوژ گردید. رقیق‌سازی اسپرم با رقیق‌کننده‌های آزمایش بلافاصله پس از پایان سانتریوفیوژ، انجام شد. ترکیب رقیق‌کننده تریس بجز در مورد زرده تخم‌مرغ برای تمام تیمارهای آزمایشی مشابه بود (جدول ۱).

٤ سطح مختلف زرده تخم‌مرغ ۱/۵، ۲/۵، ٤ و ٦ درصد در رقیق‌کننده تریس بکار برده شد و سپس نمونه‌ها به‌صورت مایع در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شدند تا ٦ ساعت بعد از نگهداری، از لحاظ درصد تحرک اسپرماتوزوآ مورد ارزیابی قرار گیرند.

به‌منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوآ، یک قطره اسپرم و یک قطره سرم نمکی ۰/۹ درصد برروی لام از پیش گرم شده (۳۷ درجه سانتی‌گراد)، قرار داده شد. سپس روی آن لامل قرار داده شد تا نمونه به‌طور یکنواخت گسترش یابد. با مشاهده مستقیم و شمارش سلول‌های اسپرماتوزوآی دارای حرکت مستقیم جلو رونده در میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰x درصد تحرک اسپرم تعیین گردید (ایوانس و همکاران، ۱۹۸۷). به‌منظور تعیین حرکت موجی اسپرماتوزوآ یک قطره از نمونه منی گرفته شده و رقیق نشده را روی یک لام گرم شده قرار داده و حرکت موجی اسپرم‌ها با بزرگنمایی ۱۰X مورد ارزیابی قرار گرفت، به‌طوری‌که اسپرم‌های فاقد حرکت موجی، امتیاز صفر و اسپرم‌های دارای حرکت موجی شدید، امتیاز ۵ را دریافت می‌کنند. امتیاز دهی بین این دو دامنه بستگی به شدت حرکت موجی اسپرم‌ها دارد. درصد تحرک اسپرم بین صفر تا ۱۰۰ امتیاز داده می‌شود (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹).

نمونه‌ها برای خارج‌سازی پلاسمای منی به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول رینگری که در حمام بن ماری ۳٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود رقیق شدند. سپس این نمونه‌ها به مدت۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰×g سانتریفوژ شدند (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹).

رقیق‌کننده تریس، مورد استفاده در آزمایش همراه با نمونه‌های منی در حمام بن ماری ۳٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا اختلاف دمایی با منی نداشته باشند. نمونه‌های رقیق شده از حمام بن ماری به داخل یخچال با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند و دمای آنها در عرض ۱/۵ ساعت به ٤ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. دمای اسپرم دراین درجه حفظ گردید تا از نمونه‌ها ارزیابی به عمل آید. جهت ارزیابی، گسترشی از هر نمونه برروی لامل تهیه و با بزرگنمایی 40 x در زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده‌های آزمایش

ترکیب رقیق‌کننده‌ها	رقیق‌کننده ۱	رقیق‌کننده ۲	رقیق‌کننده ۳	رقیق‌کننده ٤
تریس (g)	۳/٦۳٤	۳/٦۳٤	۳/٦۳٤	۳/٦۳٤
فروکتوز (g)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
اسید سیتریک (g)	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹
پنی سیلین G (۳۰۰۰۰۰IU) استرپتومایسن(g ۳)	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
زرده تخم‌مرغ (ml)	۱/۵	۲/۵	٤	٦
آب مقطر تا حجم (ml)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

این تحقیق شامل ۲۰ واحد آزمایشی، حاصل ٤ تیمار با ۵ تکرار بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (سلطانی، ۱۳۷۷). داده‌های حاصل از هر مرحله از آزمایش مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها در صورت معنی‌دار بودن اثرات تیمارهای آزمایشی، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. به دلیل درصدی بودن داده‌ها، از تبدیل زاویه‌ای به‌صورت زیر استفاده شد (گیل، ۱۹۸۷).

$$Y\ (DEG) = Arc\ sin\ ((x/100)\ ^\wedge\ 0.5$$

نتایج و بحث

نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داد که تفاوت اثر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس در حالت خارج‌سازی پلاسمای منی، در شرایط نگهداری به‌صورت مایع برروی درصد تحرک اسپرم معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد این اختلاف را نشان می‌دهد (جدول ۳). بیشترین درصد اسپرم‌های متحرک در غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ و کمترین درصد اسپرم‌های متحرک در غلظت ٦ درصد زرده تخم‌مرغ مشاهده گردید (جدول ۳). بدین ترتیب که با افزایش درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس، درصد تحرک اسپرم بز کرکی کاهش یافت.

نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط ایوانس و همکاران (۱۹۸۷ و ۱۹۸۰)، ریتار و همکاران (۱۹۹۱)، کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) و سالامون و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت. ایوانس و همکاران (۱۹۸۷ و ۱۹۸۰) برای رقیق‌سازی منی بز از بین غلظت‌های متفاوت زرده تخم‌مرغ، غلظت‌های کمتر از ۳ درصد را همراه با خارج‌سازی پلاسمای منی پیشنهاد کردند. ریتار و همکاران (۱۹۹۱) نیز استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ را به‌عنوان غلظت بهینه معرفی کردند. کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) در تحقیقی بین غلظت‌های ۱ تا ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس برای منی شسته شده بز، غلظت ۲ درصد را، بهترین سطح زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس معرفی کردند و سالامون و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که غلظت زرده تخم‌مرغ در بافر تریس برای رقیق‌سازی منی بز نباید از ۲/۵ درصد تجاوز کند.

علی‌رغم کاربرد تکنیک خارج‌سازی پلاسمای منی به دلیل عدم خارج‌سازی کامل، مقداری از عوامل مخرب در نمونه سانتریفیوژ شده باقی مانده که در حضور سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ تأثیر متفاوتی بر اسپرماتوزوآ خواهد گذاشت (ریتار و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به نتایج بدست آمده در شرایط انجام این آزمایش، شستشوی اسپرم به‌منظور خارج‌سازی پلاسمای منی و سپس استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ در بافر تریس برای رقیق‌سازی جهت نگهداری منی بز کرکی به‌صورت مایع در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ضروری می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس با درصدهای مختلف زرده تخم‌مرغ در نگهداری منی به‌صورت مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ	۳	۸۰۳/۳۰	۲٦۷/۷٦ **
خطا	۱٦	٤٤/۷۵	۲/۷۹

**** معنی‌دار در سطح احتمال $p<۰/۰۰۱$.**

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد اسپرماتوزوآی متحرک در رقیق‌کننده تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع در سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ

سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ	میانگین داده های تبدیل شده	میانگین داده ها به درصد
۱/۵	۷۰/٦۹ (۰/۷٤)[a]	۸۹/۰۷ (۰/۷٤)[a]
۲/۵	٦۷/۲۱ (۰/۷٤)[b]	۸٤/۹۹ (۰/۷٤)[b]
٤	٦۰/۰٤ (۰/۷٤)[c]	۷۵/۰٦ (۰/۷٤)[c]
٦	۵٤/۳٤ (۰/۷٤)[d]	٦٦/۰۱ (۰/۷٤)[d]

منابع

۱.رشیدی، ا. ۱۳۷۸. پرورش صنعتی دام‌های کوچک (گوسفند و بز)، رکوردگیری و ثبت مشخصات. مؤسسه فرهنگی هنری شقایق روستا، تهران.

۲.سلطانی، ا. ۱۳۷۷. کاربرد نرم افزار SAS در تجزیه‌های آماری (برای رشته‌های کشاورزی). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱٦۷ صفحه.

۳.قزوینیان، خ.، و جواهری وایقان، ع.. ۱۳۷۹. فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی کاربردی در گوسفند و بز(ترجمه). انتشارات دانشگاه سمنان. ۲۷۳ صفحه.

4.Amoah, E.A., and Gelaye, S. 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. J. Anim. Sci. 75: 578- 585.

5.Blackshaw, A.W., and Salisbury, G.W. 1957. Factors influencing Metabolic activity of bull spermatozoa II: Cold-shock and its Prevention. J. Dairy. Sci. 40: 1099-1106.

6.Corteel, J.M., and Marcellier, N. 1978. Production, storage, and artificial insemination of goat semen: In: Gall, C.(Ed), Goat production. Academic press, London, pp. 171- 191.

7.Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworth's Co. Ltd. P: 523.

8.Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1980. Effect of seminal plasma removal on viability, motility and fertility of goat spermatozoa.

9.Gill, J.L.1987. Design and analysis of experiment in the animal and medical science. 2: 320- 321.

10.Hammer Stedt, R.H., Keith, A.D., Snipes, W., Amman, R.P., Arruda, D., and Griel, L.C. 1978. Use of spin labels to evaluate effect of cold shock and osmolality on sperm. J. Biol. Reprod. 18: 686-696.

11.Hinkovska- Galcheva, V., Peeva, Momchilova- Ppankova, A., Petkova, D., and Koumanov, K. 1988. Phosphatidylecholin and phosphatidylethanolamin derivatives, membrane fluidity and changes in the lipolytic activity of ram spermatozoa plasma membranes during cryopreservation. Int. J. Bioch. 20:867-871.

12.Leboeuf, B. 1991. Effect of different diluents on viability of goat spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 18: 209- 220.

13.Leboeuf, B., Restall, B., and Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. J. Anim. Reprod. Sci., 62: 113- 142.

14.Mazur, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological system. Science. N. Y. 166: 939.

15.Ritar, A.J., and Salamon, S. 1991. Semen processing in goats. Sept. J. Biol. Sci., 35: 305- 312.

16.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. J. Anim. Reprod. Sci., 62: 77-111.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 13(1), July-Aug 2006
www.magiran.com/jasnr

Effect of different concentrations of egg yolk in tris diluent on spermatozoa motility of Cashmere goats

M.A. Tavallaee[1], Y.J. Ahangari[1], S. Hasani[1] and M. Nowrozi[2]
[1]Department of Animal Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, [2]Khorasan Research Center of Natural Resources and Livestock Affairs

Abstract

Effects of various concentrations of egg-yolk of 1.5, 2.5, 4 and 6% in tris diluent on the motility percentage of South Khorasan Cashmere goat's spermatozoa, after removing seminal plasma, in liquid storage at 4°C were studied in sheep breeding center of Abbas-abbad, Khorasan. Semen samples from five cashmere bucks were collected by an electro-ejaculator and centrifuged for seminal plasma removal. Washed semen samples were then extended in four diluents of tris buffers containing 1.5, 2.5, 4 and 6% egg-yolk, at a ratio of one part semen to two parts diluent. This experiment was carried out in a completely randomized design with 5 replications. The motility percentage of spermatozoa was 89.07, 84.99, 75.06 and, 66.01 in tris buffers containing 1.5, 2.5, 4 and, 6% egg-yolk, respectively. The motility percentage was highest in 1.5% and lowest in 6% egg-yolk concentration. The results show a significant decrease in sperm motility by increasing the egg-yolk in tris buffer ($P<0.001$). Therefore, using egg-yolk concentration of 1.5% in tris diluent after the removal of seminal plasma is recommended for liquid storage of Cashmere goat semen.

Keywords: Spermatozoa motility; Egg-yolk; Tris; Seminal plasma; Cashmere goats

www.SID.ir