Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره دوم، خرداد- تیر ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

اثر غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ بر قابلیت تحرک و زنده مانی، اسپرم بز مرخز پس از انجماد و یخ‌گشایی

*عباس فرشاد[۱]، پریسا فاضلی[۲]، بهروز خلیلی[۳] و سعید آخوندزاده[۴]

[۱]استادیار گروه علوم دامی دانشگاه کردستان، [۲و۳و۴] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۱۱

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) همراه با رقیق‌کننده تریس در فصل تولیدمثلی بر زنده‌مانی، تحرک و جنبایی پیش‌رونده اسپرم بز مرخز پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی انجام پذیرفت. نمونه‌های منی از ۵ بز نر مرخز هفته‌ای دو بار، به‌مدت ۷ هفته جمع‌آوری و هر بار بلافاصله برای پارامترهایی همچون تحرک و غلظت ارزیابی شدند. منی با رقیق‌کننده (تریس، سیتریک اسید و فروکتوز) به‌همراه غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ رقیق و تا ۵ درجه سانتی‌گراد سرد، سپس در بخار ازت، منجمد و در تانک حاوی نیتروژن مایع ذخیره شدند. یخ‌گشایی پایوت‌ها در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در طی ۳۰ ثانیه انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده از غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد)، برای زنده‌مانی به‌ترتیب ۵۷/۴۸، ۶۰/۱۷، ۵۵/۲۱، ۵۴/۹۱، ۵۳/۷۴ و ۴۹/۵۳ درصد، برای تحرک اسپرم به‌ترتیب ۵۲/۹۲، ۵۵/۷۱، ۵۰/۷۸، ۴۹/۸۵، ۴۹/۲۱ و ۴۵/۳۵ درصد و برای جنبایی پیش‌رونده به‌ترتیب ۳۹/۲۱، ۴۲/۲۸، ۳۷/۸۵، ۳۶، ۳۷ و ۳۲/۴۲ درصد بود. بیشترین و کمترین زنده‌مانی، تحرک و جنبایی پیش‌رونده به‌ترتیب با غلظت‌های ۵ و ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ حاصل شد. نتایج این پژوهش نشان داد با افزایش غلظت زرده تخم‌مرغ، تحرک و زنده مانی اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P<۰/۰۵$)، بنابراین استفاده از رقیق‌کننده‌های تریس حاوی ۵ درصد زرده تخم‌مرغ برای انجماد و حفاظت اسپرماتوزوای بز مرخز در طول فصل تولیدمثلی می‌تواند مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انجماد، بز مرخز، زرده تخم‌مرغ

مقدمه

انجماد اسپرم نقش مهمی در پیشرفت ژنتیکی گله‌ها با توجه به استفاده بهینه از دام نر و جلوگیری از انقراض نژادهای بومی دارا می‌باشد. اسپرم به تغییرات دمایی بسیار حساس بوده و دچار شوک سرمایی می‌شود (آمواه و جیلای، ۱۹۹۷). شوک سرمایی باعث کاهش فعالیت متابولیکی اسپرم و افزایش نفوذپذیری غشاء به آلودگی‌ها، یون‌ها و آنزیم‌ها می‌شود. این عوامل ممکن است باعث تخریب غشاء سلولی شوند. زرده تخم‌مرغ یکی از رایج‌ترین ترکیبات رقیق‌کننده‌های منی است که

*- مسئول مکاتبه: afarshad@uok.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دلیل دارا بودن لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین به‌عنوان حفاظت‌کننده شوک سرمایی در طی فرآیندهای انجماد و یخ‌گشایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (لیبویف و همکاران، ۲۰۰۰). زرده تخم‌مرغ با ساختن لایه محافظ به دور اسپرم و در نتیجه محدود کردن تحرک و متابولیسم اسپرم باعث پایداری غشاء و طول عمر اسپرم می‌شود، همچنین با خنثی کردن اسید لاکتیک تولید شده از طریق گلیکولیز به‌عنوان منبع ذخیره غذایی عمل می‌نماید (فرشاد و هولز، ۱۹۹۳).

در مقایسه با دیگر گونه‌ها، تغییرات فصلی کیفیت منی، اثر منفی پلاسمای منی بر اسپرم، حساسیت کلاهک اسپرم و ایجاد کریستال‌های یخ درون سلولی از جمله علت‌های نتایج ضعیف زنده‌مانی اسپرم بز پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌باشند (لافالسی و همکاران، ۲۰۰۲). براساس نتایج تحقیقات مختلف، آنزیم فسفولیپاز A مترشحه از غده کوپر بز، علاوه‌بر این‌که باعث لخته شدن زرده تخم‌مرغ می‌شود، همچنین بر پیوند استری گروه آسیل از فسفولیپیدهای زرده تخم‌مرغ عمل نموده و باعث آزاد شدن اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک و اسیدهای چرب اشباع پالمیتیک و استئاریک می‌شود، در نتیجه این عمل pH بلافاصله تا ۶ کاهش یافته و تنفس سلول را دچار اختلال می‌کند (آمواه و جیلای، ۱۹۹۷؛ بای‌سوز و همکاران، ۲۰۰۲). اگرچه برخی از پژوهشگران جداسازی پلاسمای منی را راه‌حل مناسبی برای این مشکل می‌دانند (آمواه و جیلای، ۱۹۹۷؛ لیبویف و همکاران، ۲۰۰۰)، ولی برخی دیگر بر این عقیده‌اند که شستشوی منی یک فرآیند پیچیده و زمان‌بر است و چنانچه به‌درستی انجام نگیرد، آسیب وارده به غشاء سلول اسپرم در اثر عمل سانتریفوژ بیشتر از آسیب ایجاد شده توسط آنزیم فسفولیپاز A خواهد بود (لیبویف و همکاران، ۲۰۰۰).

لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در شرایط عدم خارج‌سازی پلاسمای منی بر انجماد و ارزیابی پارامترهای تحرک، جنبایی پیشرونده، اسپرم‌های زنده، مرده و غیرطبیعی بعد از یخ‌گشایی منی بز مرخز در فصل تولیدمثل انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی بز مرخز سنندج با استفاده از ۵ رأس بز مرخز ۴-۲ ساله (۰/۲۷±۳) با وزن بدن ۶۰-۵۵ کیلوگرم (۵/۲±۵۷/۷) انجام شد. در طی اجرای آزمایش بزها براساس AFRC[1] (۱۹۹۰) روزانه با ۶۷۲ گرم یونجه و ۷۷۳ گرم کنسانتره برحسب Asfed تغذیه شدند و به‌طور آزاد به آب و بلوک لیسیدنی دسترسی داشتند. منی پس از عادت‌دهی بزها به انزال در مهبل مصنوعی، هفته‌ای دو بار و به‌مدت ۷ هفته جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در عرض ۱۵ دقیقه به آزمایشگاه منتقل و در داخل آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ثبت حجم نمونه انزال شده با استفاده از لوله مدرج، برای پارامترهای تحرک و غلظت ارزیابی (جدول ۱) و نمونه‌های دارای تحرک (۷۰ درصد <) و غلظت کافی (۳×۱۰^{۹} < اسپرم در هر میلی‌لیتر) جهت انجماد استفاده شدند (ابواقلا و ترادا، ۲۰۰۴).

در این آزمایش از رقیق‌کننده تریس، فروکتوز و اسید سیتریک (TCF) به‌ترتیب به‌مقدار ۳/۷۸۶، ۱ و ۲/۱۷۲ گرم، گلیسرول ۵ درصد (v/v)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، استرپتومایسین سولفاته ۰/۱ گرم و آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر (ایوانس و ماکسول، ۱۹۸۷)، به‌همراه غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به‌عنوان تیمارهای آزمایشی استفاده شد. نمونه‌ها پس از ارزیابی با هم مخلوط و به قسمت‌های مساوی تقسیم شده و به نسبت ۱:۴ با گروه تیمارها، طی یک مرحله رقیق شدند. نمونه‌ها در پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری پر شده و به‌مدت تقریباً ۴

۱- Agricultural and food Research Council

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت در دستگاه سردکننده (۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند سپس پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متر به‌مدت ۶-۵ دقیقه در معرض بخار ازت مایع (۸۰- درجه سانتی‌گراد) منجمد و جهت نگهداری (۴۸ ساعت) به تانک حاوی نیتروژن مایع منتقل شدند. بلافاصله پس از یخ‌گشایی (آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه)، نمونه‌ها به‌وسیله محلول تریس- اسید سیتریک- گلوکز (بدون زرده تخم‌مرغ و گلیسرول) که قبلاً در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند به نسبت ۱:۳ رقیق و اجازه داده شد تا قبل از ارزیابی نمونه‌ها برای مدت ۵ دقیقه با رقیق‌کننده به تعادل برسند (ابواقلا و ترادا، ۲۰۰۴)، سپس غلظت اسپرم با استفاده از لام هموسیتومتر، ارزیابی مورفولوژیکی اسپرم (درصد اسپرم زنده، مرده و غیرطبیعی) با روش رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین و میزان جنبایی پیش‌رونده اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی ۴۰۰) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با شمارش ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید تعیین گردید.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و بعد از تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS، میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردید. با توجه به درصدی بودن داده‌ها با استفاده از فرمول زیر تصحیح لازم صورت گرفت.

$$y_{(DEG)} = \text{Arc sin}\left((X/100)^{0.05}\right)$$

نتایج و بحث

در این مطالعه زنده‌مانی و تحرک اسپرم در ۵ درصد زرده تخم‌مرغ نسبت به سایر سطوح (۲/۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بالاتر بود (جدول ۲). کمترین درصد اسپرم‌های زنده و متحرک در ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ مشاهده شد. مقدار کاهش میانگین این تیمار با سایر سطوح معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). ابواقلا و ترادا (۲۰۰۴) گزارش کردند که استفاده از ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس و جدا کردن پلاسمای منی اثر مثبتی برروی تحرک اسپرم بعد از یخ‌گشایی دارد. میزان جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی در ۵ درصد زرده تخم‌مرغ نسبت به سایر سطوح به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$). زرده تخم‌مرغ با وجود این‌که دارای لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین است و از اسپرم در مقابل شوک سرمایی محافظت می‌کند، در غلظت‌های بالا ممکن است باعث کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی شود سانتیاگو- مورینو و همکاران (۲۰۰۶)، لافالسی و همکاران (۲۰۰۲)؛ کابره‌را و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند در فصل تولیدمثل ترشحات پلاسمای منی بیشتر از طریق غده وزیکولار می‌باشد و اثر زیان‌آور ترشحات غده کوپر بر زنده‌مانی و تحرک اسپرم تا حدودی به‌وسیله ترشحات وزیکولار مهار می‌شود. میزان اسپرم طبیعی پس از یخ‌گشایی، در ۵ درصد زرده تخم‌مرغ نسبت به سایر سطوح، به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<۰/۰۵$). سانتیاگو- مورینو و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که غلظت‌های بالای زرده تخم‌مرغ میزان آسیب آکروزومی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را افزایش می‌دهد. در این مطالعه نیز کمترین میزان اسپرم طبیعی در ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۷/۵ و ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ بر تحرک و زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) میزان تحرک و درصد اسپرم زنده در ۷/۵ درصد زرده تخم‌مرغ بهتر از ۱۰ درصد بود ولی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد، برای انجماد اسپرم بز مرخز در فصل تولید مثل می‌توان از رقیق‌کننده تریس به‌همراه ۵ درصد زرده تخم‌مرغ، بدون نیاز به جداسازی پلاسمای منی، با موفقیت استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات منی بلافاصله بعد از اسپرم‌گیری (میانگین± اشتباه معیار).

شماره بز	حجم (میلی‌لیتر/ انزال)	تحرک (درصد)	جنبایی پیش‌رونده (درصد)	غلظت ($\times 10^9$ در هر میلی‌لیتر)
۱	۰/۹۲±۰/۰۵ b	۸۳/۶۴±۱/۱۷ a	۷۸/۷۸±۱/۲۰ b	۴/۱۵±۰/۱۰ a
۲	۱/۰۸±۰/۰۵ a	۸۷/۸۵±۱/۱۴ a	۸۳/۰۰±۱/۱۶ a	۴/۱۱±۰/۰۷ a
۳	۱/۰۳±۰/۰۵ ab	۸۵/۹۲±۱/۶۴ a	۸۱/۷۸±۱/۴۹ ab	۴/۰۰±۰/۰۹ a
۴	۱/۱۴±۰/۰۵ a	۸۴/۹۲±۱/۴۵ a	۸۰/۱۴±۱/۴۰ ab	۴/۲۰±۰/۰۸ a
۵	۱/۰۰±۰/۰۵ a	۸۵/۸۵±۱/۱۴ a	۷۹/۱۰±۱/۵۰ ab	۴/۲۰±۰/۱۰ a

a-b حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- صفات کیفی اسپرم در غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ پس از یخ‌گشایی (میانگین± اشتباه معیار).

سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ	تحرک (درصد)	حرکت پیش‌رونده (درصد)	اسپرم زنده (درصد)	اسپرم طبیعی در زنده (درصد)
۲/۵	۵۲/۹۲±۰/۴۷ b	۳۹/۲۱±۰/۶۴ b	۵۷/۴۸±۰/۴۰ b	۸۷/۹۰±۰/۳۹ b
۵	۵۵/۷۱±۰/۴۷ a	۴۲/۲۸±۰/۶۴ a	۶۰/۱۷±۰/۴۰ a	۸۹/۵۳±۰/۳۹ a
۷/۵	۵۰/۷۸±۰/۴۷ c	۳۷/۸۵±۰/۶۴ bc	۵۵/۲۱±۰/۴۰ c	۸۶/۷۸±۰/۳۹ c
۱۰	۴۹/۸۵±۰/۴۷ cd	۳۶/۰±۰/۶۴ c	۵۴/۹۱±۰/۴۰ c	۸۶/۱۸±۰/۳۹ c
۱۵	۴۹/۲۱±۰/۴۷ d	۳۷/۰±۰/۶۴ c	۵۳/۷۴±۰/۴۰ d	۸۵/۶۹±۰/۳۹ c
۲۰	۴۵/۳۵±۰/۴۷ e	۳۲/۴۲±۰/۶۴ d	۴۹/۵۳±۰/۴۰ e	۸۳/۶۳±۰/۳۹ d

a-e حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($P<۰/۰۵$)

منابع

1.Aboagla, E.M.E., and Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology. 62:1160-1172.

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

3.Biswas, D., Bari, F.Y., Shamsuddin, M., Rahman, M.M., and Rahman, M.M. 2002. Determination of glycerol percentages for preserving the Black Bengal buck (*Capra hircus*) spermatozoa for long time. Pakistan j. Bio. Sci. 5:715-718.

4.Cabrera, F., Gonzalez, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A., and Gracia, A. 2005. The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck. Reprod. Dom. Anim. 40:191-195.

5.Evans, G., and Maxwell, W.M.S. 1987. Salamon's artifical insemination of sheep and goat. Butterworth. Co.ltd. P:523.

6.Farshad, A., and Holtz, W., 1993. The cryopreservation of goat semen under special consideration of sucrose. DGZF. Goettingen, Germany.

7.La Falci, V.S.N., Tortorella, H., Rodrigues, J.L., and Brandelli, A. 2002. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. Theriogenology. 57:1035-1048.

8.Leboeuf, B., Restall, B., and Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci. 62:113-141.

9.Santiago-Moreno, J., Toledano-Diaz, A., Pulido-Pastor, A., Dorado, J., Gomez-Brunet, A., and Lopez-Sebastian, A. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. Theriogenology. 66:1219-1226.

10.SAS Institute Inc. 2001, SAS® Proprietary Software Release 8.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(2), Jun-July 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Effects of different egg yolk concentrations on the motility and viability of Markhoz goat sperm after freezing step of cryopreservation and thawing

[*]A. Farshad [1], P. Fazeli [2] and S. Akhondzadeh[4]

[1]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, University of Kurdistan, Iran, [2,3,4] M.Sc. graduated student Dept. of Animal Science, University of Kurdistan, Iran

Abstract

The effect of concentrations of egg yolk (2.5, 5, 7.5, 10, 15 and 20%) in Tris diluent on viability, motility and progressive motility of frozen-thawed Markhoz goat in breeding season was studied. The semen was collected from 5 Markhoz bucks twice a week during 7 weeks. Every time after collecting Fresh semen evaluated for motility and sperm concentration. Semen diluted with Tris-Citric acid-Fructose (TCF) extender containing different concentration egg yolk were cooled to 5˚c and then frozen at-80˚c in nitrogen vapor and stored it in liquid nitrogen. Thawing was performed by placing the straws in a water bath at 37˚C for 30s. The post-thaw viability was 57.48, 60.17, 55.21, 54.91, 53.74 and 49.53% for 2.5, 5, 7.5, 10, 15 and 20% of egg yolk concentration, respectively. The effects of different concentrations of egg yolk on post-thaw motility were as 52.92, 55.71, 50.78, 49.85, 49.21 and 45.35%, respectively. The results for post-thaw progressive motility showed 39.21, 42.28, 37.85, 36, 37 and 32.42% in different concentrations of egg yolk, respectively. Maximum and minimum of viability, motility and progressive motility were obtained in 5 and 20% egg yolk concentration, respectively. The result show a significant decrease in sperm viability and motility by increasing the egg yolk in Tris buffer ($P<0.05$). Therefore, using 5% of egg yolk concentration in Tris diluent can be suitable for cryopreservation sperm Markhoz goat during breeding season.

Keywords: cryopreservation; egg yolk; Markhoz goat; sperm

[*]- Corresponding Author; Email: afarshad@uok.ac.ir

www.SID.ir