مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره سوم، مرداد - شهریور ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

اثر ژله رویال در رقیق‌کننده تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ دالاق

*یوسف جعفری‌آهنگری[1] و حسین عطارچی[2]
[1]دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر
تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٦/٦/۱۲

چکیده

به‌منظور بررسی اثر استفاده از ژله رویال زنبور عسل به‌عنوان یک منبع پروتئینی در رقیق‌کننده تریس، بر خصوصیات حیاتی و پیشرونده اسپرم، منی سه قوچ دالاق با هم مخلوط شده و سپس تحت شش تیمار شامل رقیق‌کننده تریس با غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ درصد ژله رویال در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه مشاهده در هر واحد آزمایشی قرار گرفتند. فاکتورهای مورد مطالعه شامل درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های پیشرونده و درصد اسپرم‌های مقاوم به کاهش فشار اسمزی در قبل و پس از انجماد و یخگشایی می‌باشند. نتایج حاصله نشان دادکه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در بهبود میزان اسپرم‌های زنده و پیشرونده بین تیمارهای دارای ژله رویال و تیمار شاهد وجود دارد (P<۰/۰۱). درصد اسپرم‌های زنده و پیشرونده با افزایش درصد ژله رویال پس از انجماد و یخگشایی، از سطح صفر (۳۱/۳۲ و ۳٤) به سطح چهار درصد (۳٤/٤۱ و ۳۷/۳۲) بهبود یافت. اما بین تریس با چهار درصد ژله رویال و تریس با پنج درصد ژله رویال (۳٤/٥٦ و ۳۷/٤٥) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۱). با توجه به نتایج به‌دست آمده در شرایط این آزمایش، افزودن ٤ درصد ژله رویال به رقیق‌کننده تریس، برای رقیق‌سازی و انجماد اسپرم قوچ دالاق توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ژله رویال، رقیق‌کننده تریس، اسپرماتوزوآ، قوچ دالاق

مقدمه

از ابتدای بکارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده‌های مختلفی جهت نگهداری منی در شرایط مایع و منجمد استفاده شده است. محققین استرالیایی پس از مقایسه تعدادی از رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم مرغ را برای نگهداری در شرایط مایع و اضافه کردن پنج درصد گلیسرول به بافر تریس را برای نگهداری در شرایط انجماد، پیشنهاد نمودند (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰). بدلیل فقدان یک منبع پروتئینی در ترکیب رقیق‌کننده تریس امکان دارد که افزودن یک منبع پروتئینی به آن موجب بهبود کیفی اسپرم قوچ در شرایط نگهداری مایع و منجمد شود.

ژله رویال ماده‌ای می‌باشد که از یک جفت غده مغزی زنبورهای کارگر پرستار بنام غده هیپوفارینژل در سنین ۲ تا ۱۲ روزگی ترشح شده و مورد استفاده تغذیه‌ای ملکه در تمام طول عمر و نوزادان زنبور در مراحل اولیه رشد

*- مسئول مکاتبه: yjahangari@yahoo.co.uk

Archive of SID
www.SID.ir

قرار می‌گیرد (اعتمادی، ۱۹۹۳). تجزیه شیمیایی ژله رویال نشان داد که این ماده دارای ٦٦ درصد آب، ۱۵ درصد کربوهیدرات، ۱۳ درصد پروتئین، ۵ درصد چربی و ۱ درصد مواد معدنی است (دیمیک و همکاران، ۱۹۸۵). ژله رویال یک منبع پروتئینی غنی از اسید آمینه‌هایی همچون اسید آسپارتیک است که دارای ترکیب شیمیایی ضروری برای ساختمان بافت‌ها می‌باشند (هانز و سیموت، ۱۹۹۲). مصرف ژله رویال در موارد ناتوانی جنسی و پیشگیری از پیر شدن بافت‌های بدن در انسان توصیه شده است (حداد کاوه، ۱۹۸۷).

محققین علوم دامی از ژله رویال برای بلوغ اووسیت گاو در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمودند (کوران و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین، جایگزینی ژله رویال بجای سرم گوساله را به‌عنوان منبع مناسب‌تر بیولوژیک برای بلوغ اووسیت پیشنهاد نمودند (اونال و همکاران، ۲۰۰۵).

در این تحقیق اثر رقیق‌کننده تریس حاوی غلظت‌های متفاوت ژله رویال زنبور عسل بر میزان اسپرم‌های زنده و پیشرونده قوچ دالاق، در شرایط مایع و پس از انجماد و یخگشایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سه بخش آزمایشگاه تشریح و فیزیولوژی دام، ایستگاه تحقیقاتی زنبور عسل و ایستگاه تحقیقاتی دام انجام شد. زمان اجرای این تحقیق در طی دو فصل زمستان ۱۳۸٤ و بهار ۱۳۸۵ بوده است. برای انجام این تحقیق از سه راس قوچ ۱ تا ۲ ساله دالاق موجود در ایستگاه تحقیقاتی دام استفاده شد. قوچ‌های این مرکز با روش اسپرم گیری بوسیله دستگاه اسپرم‌گیر الکتریکی سازگاری داده شدند. ژله رویال فقط از سلول تولید ملکه جدید یا شاخون که به اندازه یک انگشتانه کوچک می‌باشد، در زمانی‌که ملکه غیرفعال شده و یا از بین برود، بدست می‌آید. بنابراین در این آزمایش با حذف ملکه از کندو، تعداد زیادی سلول تولید ملکه در شان‌ها ساخته شدند. پس از ٤ روز، ژله رویال موجود در سلول‌های تولید ملکه، جمع‌آوری شدند. نمونه‌های ژله رویال به‌دست آمده در داخل ظرف شیشه‌ای رنگ در بسته قرار داده شد و تا زمان مصرف در داخل فریزر نگهداری گردید.

در این تحقیق از رقیق‌کننده یک مرحله‌ای منی قوچ که حاوی ۳/٦۳٤ گرم تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، ۰/۵گرم فروکتوز، ۱/۹۹گرم اسید سیتریک، ۱۵ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی سیلین، ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین و آب مقطر برای رساندن حجم رقیق‌کننده به ۱۰۰ میلی‌لیتر بود، استفاده گردید (مموئی، ۲۰۰۰). ابتدا شش لوله آزمایش با زدن برچسب، بترتیب عبارت بودند از: T0: رقیق‌کننده تریس، T1: رقیق‌کننده تریس با ۱ درصد ژله رویال، T2: رقیق‌کننده تریس با ۲ درصد ژله رویال، T3: رقیق‌کننده تریس با ۳ درصد ژله رویال، T4 : رقیق‌کننده تریس با ٤ درصد ژله رویال و T5: رقیق‌کننده تریس با ۵ درصد ژله رویال اختصاص داده شد. ژله رویال به نسبت یک به یک با آب مقطر مخلوط شد. سپس با استفاده از سرنگ انسولین به نسبت‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ درصد به لوله‌های آزمایش مربوطه اضافه شد. نسبت رقیق‌سازی منی به‌صورت یک قسمت منی و چهار قسمت رقیق‌کننده بود. منی اخذ شده از سه قوچ با یکدیگر مخلوط و سپس به شش قسمت مساوی، هریک به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر تقسیم شد. لوله‌های حاوی منی و رقیق‌کننده‌ها در حمام آب گرم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس به هر یک از لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر منی یکی از شش رقیق‌کننده به میزان ۲ میلی‌لیتر اضافه شد و برای خنک کردن منی رقیق شده، لوله‌های آزمایش در یک ظرف آب همدما قرار گرفته و آنها را در یخچال گذاشته تا دمای آن به ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش یابد. پایوت‌ها به روش دستی پر شدند. برای هر یک از تیمارها سه پایوت ۰/۵ میلی‌لیتری در نظر گرفته شد که در مجموع ۱۸ پایوت مورد استفاده قرار گرفت. پس از اینکه دمای شش لوله

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش حاوی منی رقیق شده به ۵ درجه سانتی‌گراد رسید، آنگاه اقدام به پر کردن پایوت‌ها شد. برای جلوگیری از وارد آمدن شوک حرارتی به اسپرم‌ها، این کار در یخچال انجام گرفت. پس از اتمام مرحله پر کردن پایوت‌ها، دوباره آنها در داخل یخچال در ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا خنک شده و آماده برای مرحله انجماد شوند. انجماد پایوت‌ها بدین صورت بود که آنها را در سبد مخصوص حمل پایوت‌ها قرار داده و آن را به مدت ۷ دقیقه در ارتفاع میانی مخزن مخصوص انجماد اسپرم نگه داشته و پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در ارتفاع ۵ سانتی‌متری بالای سطح ازت، پایوت‌ها در ازت مایع غوطه‌ور گشتند.

یک هفته پس از انجماد پایوت‌ها، آنها از ازت مایع خارج و یخگشایی شدند. روش یخ‌گشایی نیز بدین صورت بود که پایوت‌ها را در حمام بن ماری که برروی دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود برای مدت ۴۵ ثانیه قرار داده تا نمونه‌ها ذوب شده و بتوانند مورد ارزیابی قرار گیرند. داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق شامل درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های پیشرونده و درصد اسپرم‌های مقاوم به کاهش فشار اسمزی می‌باشند. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های پیشرونده، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده را برروی یک لام تمیز از پیش گرم شده (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده و برروی آن یک لامل گذاشته تا نمونه به‌طور یکنواخت در زیر سطح لامل پخش شود. آنگاه با استفاده از بزرگنمایی ×۴۰ میکروسکوپ و با بررسی چند ناحیه از لامل، درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیشرونده داشتند، مشخص گردید. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. برای رنگ‌آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق شده را در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده و سپس یک قطره از رنگ را برروی منی رقیق شده ریخته شد. آنگاه بعد از مدت یک دقیقه توسط لبه لام دیگری گسترش نازکی از آن تهیه نموده و سپس برای مدت ۵ دقیقه منتظر مانده تا کاملا خشک گردد. آنگاه با استفاده از بزرگنمایی ×۴۰ میکروسکوپ در چند ناحیه از لام تعداد اسپرم‌های زنده و مرده شمارش شدند. برای اندازه گیری درصد اسپرم‌های مقاوم به کاهش فشار اسمزی، ابتدا یک محلول با فشار اسمزی ۱۵۰ میلی اسمز تهیه نموده و پس از آن یک میلی‌لیتر از این محلول با ۰/۱ میلی‌لیتر اسپرم رقیق شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه با بزرگنمایی ×۴۰ میکروسکوپ ارزیابی شده و آن دسته از اسپرم‌هایی که دچار بادکردگی در قسمت دم شده بودند، شمارش گردیدند (آهنگری، ۱۹۹۲).

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از طرح بلوک های کامل تصادفی با چند مشاهده در هر واحد آزمایشی استفاده گردید. در این طرح شش تیمار، سه بلوک و سه مشاهده برای هر واحد آزمایشی وجود دارد. علت استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی این بود که این طرح در سه دوره زمانی انجام پذیرفت. در نتیجه تفاوت‌های احتمالی ناشی از ناهمزمانی تکرارها به عنوان بخشی از خطا به حساب می‌آید، از این رو، از مدل آماری زیر استفاده گردید (یزدی صمدی، ۲۰۰۰).

$$Yijk = \mu + Ti + Rj + eij + £ijk$$

Yijk= مشاهده شماره k از بلوک j و تیمار i

μ = میانگین جامعه

Ti = اثر تیمار i

Rj = اثر بلوک j

eij = خطای آزمایشی واحد j از تیمار i

£ijk = خطای مربوط به نمونه k از واحد آزمایشی ij

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری Minitab (۱۹۹۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از آزمون چند دامنه دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش در دو مرحله قبل از انجماد و پس از انجماد و یخگشایی در جدول ۱ و شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شدند.

Archive of SID

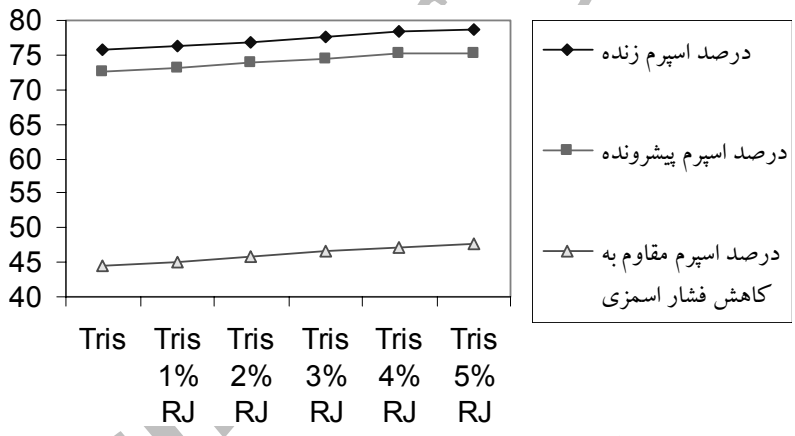
www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میانگین خصوصیات حیاتی اسپرم در تیمارهای آزمایش با استفاده از آمون دانکن (P <۰/۰۱).

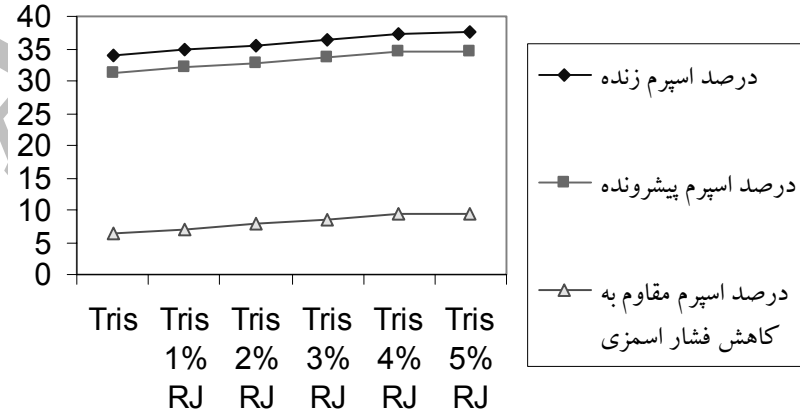
خصوصیات حیاتی اسپرم (درصد)	تیمارهای آزمایش						
	تریس (شاهد)	تریس با یک درصد ژله رویال	تریس با دو درصد ژله رویال	تریس با سه درصد ژله رویال	تریس با چهار رصد ژله رویال	تریس با پنج درصد ژله رویال	ارزش F
الف : قبل از انجماد							
اسپرم زنده	٦٧/٧٥ a	٣٣/٧٦ b	٨٩/٧٦ c	٦٧/٧٧ d	٤٤/٧٨ e	٥٦/٧٨ e	٨٨/٥٠ **
اسپرم پیشرونده	٦٦/٧٢ a	٢٢/٧٣ b	٨٧/٧٣ c	٥٤/٧٤ d	٢٢/٧٥ e	٣٢/٧٥ e	٨٥/٣٩ **
اسپرم مقاوم به فشار اسمزی	٤٥/٤٤ a	١١/٤٥ b	٨١/٤٥ c	٥٦/٤٦ d	١٨/٤٧ e	٥٥/٤٧ e	٨٢/٧٩ **
ب: پس از انجماد و یخگشایی							
اسپرم زنده	٠٠/٣٤ a	٧٧/٣٤ b	٥٦/٣٥ c	٤٣/٣٦ d	٣٢/٣٧ e	٤٥/٣٧ e	١٧/٦٢ **
اسپرم پیشرونده	٣٢/٣١ a	٠٠/٣٢ b	٧٧/٣٢ c	٥٦/٣٣ d	٤١/٣٤ e	٥٦/٣٤ e	٠٨/٨٧ **
اسپرم مقاوم به فشار اسمزی	٢٢/٦ a	٠٠/٧ b	٧٨/٧ c	٤٤/٨ d	٣٣/٩ e	٤٦/٩ e	٢٦/٦٣ **

اعداد مربوط به هر ردیف که دارای حروف مشابه می‌باشند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری ندارند.

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل ۱- درصد خصوصیات حیاتی اسپرم قبل از انجماد.



شکل ۲- درصد خصوصیات حیاتی اسپرم پس از انجماد و یخگشایی.

www.SID.ir

درصد اسپرم زنده در شش تیمار تریس با ۰، ۱، ۲، ۳، ٤ و٥ درصد ژله رویال در قبل از انجماد به‌ترتیب ٦٧/٧٥، ٣٣/٧٦، ٨٩/٧٦، ٦٧/٧٧، ٤٤/٧٨، ٥٦/٧٨ و پس از انجماد به‌ترتیب ٠٠/٣٤، ٧٧/٣٤، ٥٦/٣٥، ٤٣/٣٦، ٣٢/٣٧، ٤٥/٣٧ بود. درصد اسپرم پیشرونده در شش تیمار تریس با ۰، ۱، ۲، ۳، ٤ و٥ درصد ژله رویال در قبل از انجماد به‌ترتیب ٦٦/٧٢، ٢٢/٧٣، ٨٧/٧٣، ٥٤/٧٤، ٢٢/٧٥ و٣٢/٧٥ و پس از انجماد به‌ترتیب ٣٢/٣١، ٠٠/٣٢، ٧٧/٣٢، ٥٦/٣٣، ٤١/٣٤ و ٥٦/٣٤ بود. درصد اسپرم مقاوم به کاهش فشار اسمزی در شش تیمار تریس با ۰، ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ درصد ژله رویال در قبل از انجماد به‌ترتیب ٤٥/٤٤، ١١/٤٥، ٨١/٤٥، ٥٦/٤٦، ١٨/٤٧ و ٥٥/٤٧ و پس از یخگشایی به‌ترتیب ٢٢/٦ ، ٠/٧، ٧٨/٧ ، ٤٤/٨ ، ٣٣/٩ و ٤٦/٩ بود.

نتایج نشان داد که خصوصیات حیاتی اسپرم در تیمارهای حاوی ژله رویال نسبت به تیمار شاهد ارتقاء یافته است (P<۰/۰۱). همچنین، افزایش غلظت ژله رویال در رقیق‌کننده تریس، یک روند صعودی در خصوصیات حیاتی اسپرم را نشان می‌دهد. علت این افزایش در میانگین درصد خصوصیات حیاتی اسپرم را می‌توان به وجود ژله رویال در رقیق‌کننده تریس بعنوان یک منبع پروتئینی غنی از اسید آمینه‌هایی همچون اسید آسپارتیک بیان کرد که دارای ترکیبات شیمیایی ضروری برای ساختمان بافت‌ها می‌باشد (هانز و سیموت، ۱۹۹۲).

با توجه به نتایج به‌دست آمده در شرایط این آزمایش، افزودن ژله رویال زنبور عسل به‌عنوان یک منبع پروتئینی به رقیق‌کننده تریس برای نگهداری اسپرم قوچ دالاق به‌صورت مایع و منجمد توصیه می‌شود. غلظت‌های ٤ و ٥ درصد ژله رویال بالاترین افزایش را در بهبود میزان اسپرم زنده و پیشرونده نشان دادند اما تفاوت بین آنها معنی‌دار نبود (P<۰/۰۱). بنابراین افزودن ٤ درصد ژله رویال به رقیق‌کننده تریس بعنوان مطلوبترین سطح ژله رویال توصیه می‌شود.

منابع

1.Ahangari, Y.J. 1992. Cryopreservation of ram semen for artificial insemination. Ph.D. Thesis., University of Wales, Bangor, UK.

2.Dimick, P.S., Howe, S.R., and Benton, A.W. 1985. Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. J. Apic. Res., 24 (1): 52-61.

3.Etemadi, M. 1993. Royal jelly. Journal of animal husbandry, 20:42-50.

4.Hadad-Kaveh, S. 1987. Winged pharmaceutist. Tehran Enghelab Islami Press, 152p. (Translated in Persian).

5.Hanes. J., and Simuth, J. 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honeybee. Journal of apicultural research, 31:22-26.

6.Kuran, M.E., Sirin, E.S., and Onal, A.G. 2005. Effect of honyebee royal jelly on the nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. Proceeding of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Uppsala, Sweden, P387.

7.Mamooi, M. 2000. Artificial insemination of sheep and goats. Ahvaz Univ. Press, 244p. (Translated in Persian).

8.Onal, A.G., Kuran, M., Tapki, I., Sirin, E., and Gorgulu, O. 2005. Honeybee royal jelly: an alternative source to serum for in vitro maturation of ovine oocyte. Proceeding of the 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production , Uppsala, Sweden, Page 283.

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

10.Yazdi-Samadi, B., Rezaei, A., and Valyzadeh, M. 2000. Statistical designs in agricultural research. Tehran Univ. Press, 764p.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(3), July-Aug 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

The effect of royal jelly in tris extender on sperm characteristics of Dallagh rams

***Y. Jafari Ahangari[1] and H. Attarchi[2]**
[1]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]M.Sc. student of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

This research work was conducted to investigate the effect of using honeybee royal jelly as a protein source in tris extender on survival and motility characteristics of ram spermatozoa. Three Dallagh rams semen samples were pooled and subjected to six treatments, tris extender plus 0, 1, 2, 3, 4 and 5 percent of royal jelly, in a randomized complete block design with sub-samples in an experimental unit. Results of experiment showed that effect of royal jelly treatment improved survival of ram spermatozoa significantly ($P<0.01$). At post freezing stage, percentages of live and motile spermatozoa were improved with an increase of royal jelly in tris extender from 0 to 4% (34 and 31.32 to 37.32 and 34.41). Effect of tris extender with four percentage of royal jelly and tris extender with five percentage of royal jelly on live and motility of spermatozoa (37.45 and 34.56) was not significant ($P<0.01$). Therefore, the addition of four percent of royal jelly in tris extender is recommended for dilution and freezing ram semen.

***Keywords*:** Royal jelly; Tris extender; Spermatozoa; Dallagh ram

Archive of SID

*- Corresponding Author; E-mail: yjahangari@yahoo.co.uk

www.SID.ir