فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۲، جلد ۱۱، شماره ۳، تابستان ۹۷، صفحه ۱ تا ۱۴

اثرات سطوح مختلف تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در شرایط مایع

آیدین آخوندی [۱]، یوسف مصطفی‌لو [۲]، آشورمحمد قره‌باش [۲]، رضا راه‌چمنی [۲]
۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام دانشگاه گنبد کاووس، گرگان. ایران. aidin6925@yahoo.com
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گرگان. ایران.

تاریخ دریافت:۹۷/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: تلقیح مصنوعی در گوسفند یک راه موثر جهت بهبود ژنتیکی و مدیریت تولیدمثل می‌باشد. یکی از مراحل مهم و حیاتی تلقیح مصنوعی محافظت از اسپرم قوچ طی فرآیند ذخیره‌سازی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده‌های تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-زرده تخم بوقلمون برخصوصیات منی قوچ دالاق در شرایط نگهداری به صورت مایع بود.

روش کار: در این تحقیق نمونه‌های منی از چهار رأس قوچ دالاق ۲ تا ۳ ساله جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق‌سازی و تیمارهای مختلف قند را دریافت نمودند. نمونه‌های منی وارد پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری گردیدند و به یخچال (دمای ۵°C) منتقل شدند. سپس در زمان‌های مختلف خصوصیات اسپرم، شامل درصد اسپرم متحرک، زنده، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×٤ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی برای هر رقیق‌کننده به صورت مجزا انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف قند تره‌هالوز(صفر، ۸۰، ۱۰۰و ۱۲۰ mM) زمان‌های مختلف نگهداری(صفر، ۲٤ و ٤۸ h) بودند. داده‌ها در محیط اکسل پردازش و با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه ANOVA و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱٪ انجام شد.

یافته‌ها: تأثیر سطوح مختلف قند و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون بر خصوصیات اسپرم معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). اثر متقابل سطوح قند و زمان‌ها در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون بر درصد تحرک و سلامت غشاء معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیشترین درصد تحرک (۳/٤۵±۸٦/۰۰٪) و زنده‌مانی اسپرم (۲/۷٤±۹٤/٤۰٪) و اسپرم طبیعی (۲/٦۹±۸۸/۰۰٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار قند و در زمان صفر به دست آمد. بیشترین درصد سلامت غشاء (۲/٦٦±۷۲/٤۰٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی صفر میلی‌مولار قند و در زمان صفر بود.

نتیجه¬گیری: برای رقیق نمودن منی قوچ دالاق استفاده از سطح ۱۲۰ قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون در ساعات اولیه ذخیره‌سازی در شرایط مایع موثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تره‌هالوز، رقیق‌کننده، مایع منی، قوچ دالاق.

مقدمه

عملیات تلقیح مصنوعی همواره به عنوان یکی از راهکارهای اساسی در اصلاح نژاد گوسفندان به خصوص در آزمون نتایج و ارزیابی قوچ مطرح می‌باشد. یکی از مراحل مهم و حیاتی این فرآیند محافظت از اسپرم قوچ طی عملیات ذخیره‌سازی است(۲۲). پس از اسپرم‌گیری و ارزیابی آن، نمونه منی را می‌توان به دو حالت مایع و منجمد، ذخیره و سپس تلقیح کرد(۵). اسپرم طی نگه‌داری در شرایط سرمایی با کاهش خواص حیاتی از قبیل تحرک و باروری روبرو می‌گردد که این امر می‌تواند به عنوان یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی در نظر گرفته شود(۲۸). فرآیند انجماد می‌تواند بر عملکرد و

www.SID.ir

باروری اسپرم حتی با به کارگیری آخرین پیشرفت‌ها در تکنولوژی نیز مضر باشد. بنابراین با توجه به مشکلات بوجود آمده طی عملیات انجماد و خنک‌سازی منی در نشخوارکنندگان کوچک، تلقیح مصنوعی در این حیوانات ه بصورت منی تازه و سرد شده صورت می‌گیرد(۱۷). ذخیره منی در شرایط مایع از طریق کاهش متابولیسم اسپرم با استفاده از کاهش دما و مواد شیمیایی انجام می‌شود تا از پیر شدن اسپرم در مدت ذخیره‌سازی جلوگیری گردد(۱۱). هنگام ذخیره‌سازی مایع منی به صورت مایع در ۵ درجه سانتی گراد، تحرک، سلامت غشاء و باروری اسپرم به صورت تدریجی کاهش می‌یابد(۲۲). از جمله دلایل این کاهش را می‌توان به اکسیژن فعال تولید شده توسط اجزای سلولی اسپرم مانند سوپراکسید هیدروژن پراکسید و هیدروپراکسیدهای لیپیدی، در نتیجه پراکسیداسیون لیپید غشاء اسپرم نسبت داد(۳). اثرات پراکسیداسیون لیپیدی شامل از دست دادن غیرقابل برگشت تحرک، آسیب به DNA و کاهش باروری اسپرم می‌باشد(۲۳). مایع منی قوچ به طور معمول شامل آنتی‌اکسیدان‌های تائورین، هیپوتائورین، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز است که می‌تواند تا حدودی پراکسیداسیون لیپیدی را جبران کند(۱۱). هر چند استفاده از قند تره‌هالوز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح نیست اما اثر محافظتی آن بر اثرات مخرب درجه حرارت پایین در غشاء اسپرم قوچ اثبات شده است(۲۲). نگهداری اسپرم در دوره‌های کوتاه مدت و بلند مدت می‌تواند کمک مؤثری در موفقیت تلقیح مصنوعی داشته باشد. ذخیره‌سازی و نگهداری مناسب اسپرم، انتقال موفقیت‌آمیز اسپرم را از مناطق دورتر تسهیل کرده و گسترش استفاده از ذخایر ژنتیکی بهتر را امکان‌پذیر می‌سازد. اما معمولاً اسپرماتوزوئیدها در طی نگهداری دچار استرس حرارتی شده و در دماهای پایین، خواص حیاتی آن‌ها از قبیل تحرک و زنده‌مانی کاهش می‌یابد که این موضوع به عنوان یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از آنها در تلقیح مصنوعی در نظر گرفته می‌شود. برای حل این مشکل استفاده از یک رقیق‌کننده مطلوب علاوه بر افزایش حجم منی باعث افزایش قابلیت نگهداری و هم چنین افزایش طول عمر اسپرم می‌گردد(۲۸). از ابتدای به کارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی تا به امروز تحقیقات متعددی در خصوص استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف جهت نگهداری منی در شرایط مایع و منجمد انجام شده است. در یکی از این تحقیقات انجام شده گروهی از محققین استرالیایی پس از مقایسه رقیق‌کننده‌های مختلف اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم‌مرغ را برای نگهداری در شرایط مایع و اضافه کردن ۵٪ گلیسرول به بافر تریس را برای نگهداری در شرایط انجماد، پیشنهاد نمودند(۲۸). امروزه استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان یک ترکیب متداول در رقیق‌کننده‌های منی در حیوانات اهلی شناخته شده و اثرات مفید آن بر انجماد اسپرم به عنوان یک محافظ غشاء پلاسمایی و آکروزوم در برابر آسیب‌های مربوط به تغییر درجه حرارت اثبات شده است. به عنوان مثال ترکیبات فسفولیپیدی، کلسترول و لیپوپروتئین‌های با چگالی کم موجود در زرده تخم‌مرغ ممکن است از جمله فاکتورهایی باشند که باعث حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی در فرآیند انجماد- ذوب می‌باشند(۴). در تائید این موارد Choi و همکاران(۲۰۰۲)، Moreno و همکاران(۲۰۰۸) و Su و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات خود گزارش دادند که استفاده از زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان مانند اردک، بلدرچین، کبوتر و مرغ دارای ترکیبات مختلفی از اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و کلسترول است که می‌تواند اثرات مختلفی در انجماد اسپرم داشته

Archive of SID

www.SID.ir

باشد(۲۹، ۲۴، ۸). Lio و همکاران(۱۹۹۸) نیز در مطالعه خود گزارش دادند که استفاده از رقیق‌کننده‌های مکمل با قندهای مختلف مانند ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز تمایل زیادی برای محافظت از سلول‌های اسپرم داشته و با ایجاد یک فشار اسمزی و خروج آب از سلول باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی طی فرآیند کاهش دما می‌گردند(۱۹). قند تره‌هالوز یک دی‌ساکارید متشکل از دو واحد گلوکز و قندهای غیر احیاکننده است که با غلظت بسیار زیادی در قارچ‌ها، مخمرها و برخی از باکتری‌ها یافت می‌شود. در همین ارتباط بررسی محتوای مخمرها ثابت کرده است که استفاده از قند تره‌هالوز می‌تواند به عنوان یک محافظت‌کننده با کارآیی بالا و تقویت‌کننده ترکیبات سلولی از قبیل غشاء پلاسمایی عمل نماید. این یافته‌ها باعث مطرح شدن قند تره‌هالوز به عنوان یک ماده محافظ گردیده است(۱). از آن جائی که استفاده از ترکیبات مختلف به عنوان رقیق‌کننده اسپرم نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است، بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات مختلف رقیق‌کننده‌های تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-زرده تخم بوقلمون، به همراه افزودن سطوح مختلف قند تره‌هالوز(۸۰، ۱۰۰و ۱۲۰ mM) بر خصوصیات منی قوچ دالاق است. به طورکلی هدف از این طرح بهبود توانایی تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ دالاق با استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف و افزودن قند تره‌هالوز در فواصل زمانی طولانی‌تر در شرایط نگهداری به صورت مایع می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع‌آوری مایع منی

تحقیق حاضر در فصول پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ در ایستگاه پرورش گوسفند دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس انجام شد. بدین منظور تعداد چهار رأس قوچ دالاق ۳-۲ ساله با وزن ۸۰-۷۵ کیلوگرم با جیره کاملاً مخلوط از یونجه، کاه گندم، دانه ذرت و سبوس گندم دارای ۲/۳ مگاکالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵٪ پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک تغذیه شدند. قوچ‌ها با روش اسپرم‌گیری به وسیله مهبل مصنوعی عادت دهی و از این طریق نمونه‌های منی هفته‌ای دو بار جمع‌آوری گردید.

ارزیابی اولیه نمونه منی

پس از تهیه نمونه‌های منی به منظور جلوگیری از آسیب به اسپرم‌ها، لوله‌های جمع‌آوری منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه درون فلاسک عایق با آب دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و بلافاصله(حداقل زمان ممکن ۲۰-۱۵ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل شدند و مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند. تعیین حجم، غلظت، تحرک، مورفولوژی و تعیین کیفیت ظاهری منی از جمله ارزیابی‌های اولیه می‌باشند، به منظور تعیین نمونه‌های مطلوب انجام شد که در صورت مطلوب نبودن، نمونه حذف می‌گردید. برای تعیین حجم منی از لوله‌های درجه‌بندی شده و برای تعیین غلظت آن از لام هموسیتومتر استفاده گردید. برای تعیین تحرک موجی نیز یک قطره از نمونه منی رقیق نشده بر روی لام گرم قرار داده شد و تحرک موجی اسپرم از صفر تا ۵ امتیازبندی گردید(۱۸، ۹). در ارزیابی اولیه برای تعیین درصد تحرک پیش‌رونده ابتدا نمونه منی به نسبت ۱ به ۲۰ با سرم فیزیولوژی(۱ حجم نمونه منی و ۲۰ حجم سرم فیزیولوژی) رقیق و سپس یک قطره کوچک از نمونه رقیق‌شده بر روی لام گرم ریخته و یک لامل بر روی آن قرار داده و با استفاده از میکروسکوب نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰× در چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش رونده داشتند، تعیین گردید(۲۱، ۱۸). برای تعیین درصد اسپرم غیرطبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. حجم منی بین ۰/۵ تا ۲

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$، تحرک بیش از ۷۰ درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شد(۱۰). پس از بررسی اولیه و اطمینان از مناسب بودن نمونه‌ها به منظور جلوگیری از اثرات فردی نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی مایع منی

در مطالعه حاضر برای رقیق‌سازی نمونه‌های منی از رقیق‌کننده پایه تریس(252859، Sigma-Aldrich، USA) استفاده شد(جدول-۱)(۲۷). با استفاده از pH متر سطح pH نمونه رقیق کننده پایه pH=۷ و میزان اسمولاریته آن با استفاده از دستگاه اسمومتر ۳۲۰ میلی‌اسمز تعیین گردیده(۱) و سپس نسبت به تهیه رقیق‌کننده‌های مختلف اقدام شد که شامل: ۱- محیط پایه تریس حاوی ۱۴ درصد(حجمی/حجمی) زرده تخم‌مرغ و ۲- محیط پایه تریس حاوی ۱۴ درصد زرده تخم بوقلمون بود. در مرحله بعد هر کدام از رقیق‌کننده‌ها به چهار لوله آزمایش تقسیم شدند و سطوح مختلف(صفر، ۸۰، ۱۰۰و ۱۲۰ میلی‌مولار) قند تره‌هالوز(0167، Sigma-Aldrich، USA) به لوله‌های حاوی رقیق‌کننده‌ها اضافه شد. نمونه‌های منی بعد از مخلوط شدن به سه قسمت مساوی تقسیم و در هر قسمت با رقیق‌کننده‌های مذکور به نسبت ۱ به ۲۰(۱ حجم نمونه منی و ۲۰ حجم رقیق‌کننده) رقیق گردیدند. رقیق‌سازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم انجام شد. پس از مرحله رقیق‌سازی، پر کردن پایوت‌ها در محیط یخچال با استفاده از پایوت های ۰/۵ میلی‌لیتری به روش دستی و با استفاده از سرنگ انسولین انجام و پس از اتمام فرآیند رقیق‌سازی، پایوت‌ها درون یخچال(دمای ۵ درجه سانتی گراد) منتقل شده و در سه فاصله زمانی(صفر، ۲۴و ۴۸ ساعت) از لحاظ صفات درصد تحرک و زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی نمونه‌ها

تحرک اسپرم: به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوآ، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق‌شده از هر پایوت بر روی لام گرم شده قرار داده شد. سپس بر روی آن یک لامل تمیز گذاشته شد تا نمونه به طور یکنواخت زیر سطح لامل پخش شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند، تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات به عنوان درصد تحرک اسپرم ثبت شد(۲۷، ۲۱، ۹).

زنده‌مانی اسپرم: جهت اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده گردید. برای ساخت رنگ، ۰/۸۵ گرم ائوزین، ۵ گرم نگروزین، ۱/۴۵ گرم سدیم سیترات آنیدرات را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و محلول به دست‌آمده ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از رسیدن دمای محلول به دمای محیط، محلول دو بار از فیلتر عبور داده شد و در شیشه‌ای تیره ریخته و برای رنگ‌آمیزی یک قطره منی رقیق‌شده از هر پایوت در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده شد سپس یک قطره رنگ روی آن ریخته و گسترش نازکی از آن تهیه گردید و لام در داخل انکوباتور گذاشته شد تا خشک شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید زنده-مرده بودن حداقل ۲۰۰ اسپرم تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات بعنوان درصد زنده‌مانی اسپرم ثبت شد. در صورت مرگ اسپرم و آسیب‌پذیر بودن غشاء پلاسمایی، رنگ قرمز ائوزین به داخل اسپرم نفوذ کرده و قسمت تحتانی سر اسپرم که فاقد آکروزوم می‌باشد،

Archive of SID

www.SID.ir

قرمز رنگ دیده می‌شود. در صورت زنده بودن اسپرم، غشاء پلاسمایی دست‌نخورده و سالم بوده و مانع نفوذ رنگ به داخل سلول‌ها می‌شود و اسپرم سالم بصورت فاقد رنگ در زمینه تیره حاصل از رنگ نگروزین، قابل‌مشاهده خواهد بود(شکل۱)(۲۷، ۹).

یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم: برای بررسی سلامت غشاء اسپرم از محلول هاست با روش Revellو Mrodeاستفاده گردید(۲۴). محلول هاست شامل ۰/۷۳۵ گرم سدیم سیترات آنیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. بعد از یخ‌گشایی پایوت‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌هاست اضافه شد.پس از گذشت۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل۳ قطره از نمونه انکوبه شده بر روی سه نقطه از لام ریخته و لامل تمیز بر روی آن‌ها قرار داده شد. سپس با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم دارای غشاء یکپارچه محاسبه شد(۲۶)(شکل۲).

ریخت‌شناسی اسپرم: به منظور ارزیابی اسپرم با مورفولوژی طبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین(۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم سدیم هیدروژن فسفات آنیدرات(H_2O_2/Na_2HPO_4) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم($KHPO_4$) در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی‌لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی چند قطره از هر نمونه منی موجود در پایوت‌ها به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول بر روی لام ریخته شد و لامل به آرامی روی آن قرار گرفت و با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل۲۰۰ سلول اسپرم شمارش و درصد اسپرم طبیعی محاسبه گردید. اسپرم غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم در نظر گرفته شد(۱۲)(شکل ۳).

آنالیز آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی برای هر رقیق‌کننده به صورت مجزا انجام شد و فاکتور اول شامل سطوح مختلف قند تره‌هالوز(صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰mM) و فاکتور دوم شامل زمان‌های مختلف نگهداری(صفر، ۲۴و ۴۸ h) است. داده‌های به دست آمده در محیط اکسل پردازش و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V: 9.1) مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه ANOVA و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱٪؛آزمایش صورت ۵ تکرار در هر تیمار انجام شد.

نتایج

خصوصیات اسپرم در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

درصد اسپرم متحرک: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود($P<۰/۰۱$) نیز اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار مشاهده شد($P<۰/۰۱$). بیشترین درصد تحرک

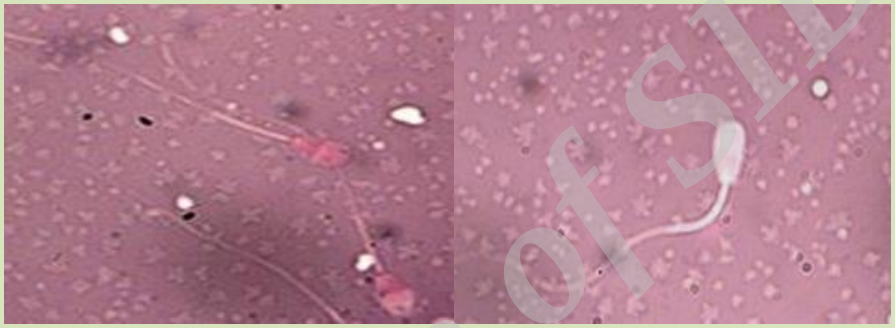
Archive of SID

www.SID.ir

اسپرم(۲/۸۲±۸۳/۰۰٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی صفر mM قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت و کمترین درصد تحرک(۲/۸۲±۱۸/۰۰٪) در رقیق‌کننده حاوی ۸۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان ساعت۴۸ به دست آمد(جدول ۳).

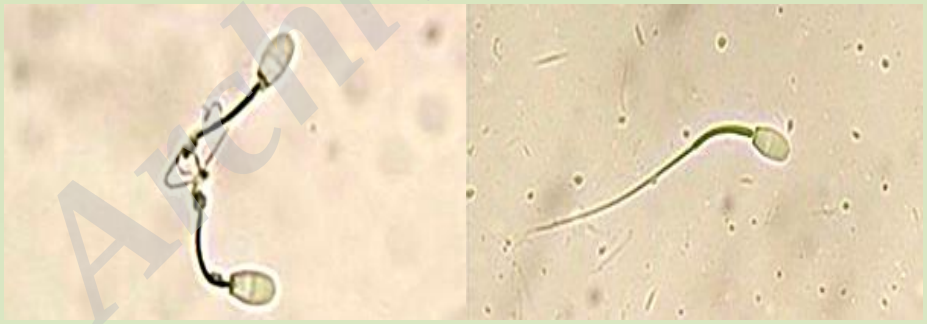
جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی قوچ در شرایط مایع

اجزای رقیق‌کننده	مقدار در ۱۰۰ میلی‌لیتر
تریس (g)	۳/٦۳٤
فروکتوز (g)	۰/۵
اسید سیتریک (g)	۱/۹۹
زرده تخم‌مرغ (ml)	۱٤
پنی سیلین (IU)	۱۰۰۰۰۰
استرپتومایسین (mg)	۱۰۰
آب مقطر تا حجم (ml)	۱۰۰



اسپرم مرده (رنگ گرفته) اسپرم زنده (رنگ نگرفته)

شکل ۱- اسپرم رنگ آمیزی شده در زیر میکروسکوپ(۱۰۰×)



اسپرم با غشاء آسیب دیده (دم پیچ نخورده) اسپرم با غشاء سالم (دم پیچ خورده)

شکل ۲- اسپرم در محلول هاست در زیر میکروسکوپ (٤۰×)

Archive of SID

www.SID.ir

اسپرم با مورفولوژی طبیعی اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی

شکل ۳- اسپرم در محلول هانکوک در زیر میکروسکوپ (۴۰×)

درصد اسپرم زنده: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد اسپرم زنده در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم زنده (۱/۷۱±۸۶/۰۰٪) در سطح صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و کم ترین درصد اسپرم زنده (۱/۷۱±۷۵/۰۰٪) در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد(جدول ۲). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیشترین درصد اسپرم زنده (۱/۴۸±۸۰/۵۵٪) در زمان صفر ساعت و کم ترین درصد اسپرم زنده(۱/۴۸±۷۶/۲۵٪) در زمان ۴۸ h به دست آمد(جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵).

درصد اسپرم با غشاء سالم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر در صد سلامت غشاء در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیشترین درصد سلامت غشاء(۱/۶۳±۶۶/۰۰٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی صفر mM قند تره‌هالوز و در زمان صفرh بدست آمد و کمترین سلامت غشاء (۱/۶۳±۲۲/۰۰٪) در رقیق‌کننده حاوی ۸۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان ۴۸ h بدست آمد (جدول ۳).

درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر در صد اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ معنی‌دار مشاهده شد(P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۱۵±۸۲/۷۳٪) در سطح صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و کم ترین درصد اسپرم طبیعی(۷۷/۸۶٪) در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد(جدول ۲). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیشترین درصد اسپرم طبیعی(۸۳/۶۵٪) در زمان صفر ساعت و کم ترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۱۵±۷۷/۸۶٪) در زمان ۴۸ h به دست آمد(جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

صفات اسپرم (٪)	تحرک	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
قند تره‌هالوز (*mM*)				
۰	۶۶/۶۶^{a}±۱/۶۳	۸۶/۰۰^{a}±۱/۷۱	۵۳/۸۶^{a}±۰/۹۴	۸۰/۴۶^{a}±۱/۱۵
۸۰	۳۵/۶۶^{c}±۱/۶۳	۷۵/۰۰^{c}±۱/۷۱	۳۷/۶۶^{c}±۰/۹۴	۷۷/۸۶^{b}±۱/۱۵
۱۰۰	۳۶/۶۶^{c}±۱/۶۳	۷۸/۸۰^{b,c}±۱/۷۱	۳۹/۴۰^{c}±۰/۹۴	۷۸/۰۶^{b}±۱/۱۵
۱۲۰	۵۰/۰۰^{b}±۱/۶۳	۸۰/۸۶^{b}±۱/۷۱	۴۲/۸۶^{b}±۰/۹۴	۸۲/۷۳^{a}±۱/۱۵
P value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۳۹
زمان‌های مختلف نگهداری (*h*)				
۰	۶۳/۲۵^{a}±۱/۴۱	۸۰/۵۵^{a}±۱/۴۸	۶۰/۱۵^{a}±۰/۸۱	۸۳/۶۵^{a}±۱/۰۰
۲٤	۴۷/۰۰^{b}±۱/۴۱	۸۳/۷۰^{a}±۱/۴۸	۴۴/۲۵^{b}±۰/۸۱	۷۹/۰۵^{b}±۱/۰۰
٤۸	۳۱/۰۰^{c}±۱/۴۱	۷۶/۲۵^{b}±۱/۴۸	۲۵/۹۵^{c}±۰/۸۱	۷۶/۶۵^{b}±۱/۰۰
P value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

a-c تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$)

جدول۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

صفات اسپرم (٪)	تحرک	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
تره‌هالوز صفر در ساعت صفر	۸۳/۰۰^{a}±۲/۸۲	۹۱/۰۰±۲/۹۶	۶۶/۰۰^{a}±۱/۶۳	۸۳/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز صفر در ساعت ۲٤	۷۶/۰۰^{a}±۲/۸۲	۸۹/۰۰±۲/۹۶	۵۹/۴۰^{a,b}±۱/۶۳	۷۷/۸۰±۲/۰۰
تره‌هالوز صفر در ساعت ٤۸	۴۱/۰۰^{c}±۲/۸۲	۷۸/۰۰±۲/۹۶	۳۶/۲۰^{e}±۱/۶۳	۸۰/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت صفر	۵۵/۰۰^{b}±۲/۸۲	۷۵/۰۰±۲/۹۶	۵۵/۶۰^{c}±۱/۶۳	۸۳/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۲٤	۳۴/۰۰^{c}±۲/۸۲	۷۸/۰۰±۲/۹۶	۳۵/۴۰^{e}±۱/۶۳	۷۸/۴۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ٤۸	۱۸/۰۰^{d}±۲/۸۲	۷۲/۰۰±۲/۹۶	۲۲/۰۰^{f}±۱/۶۳	۷۱/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت صفر	۵۵/۰۰^{b}±۲/۸۲	۷۸/۴۰±۲/۹۶	۵۶/۶۰^{b,c}±۱/۶۳	۸۱/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۲٤	۳۶/۰۰^{c}±۲/۸۲	۸۳/۲۰±۲/۹۶	۳۸/۶۰^{e}±۱/۶۳	۷۹/۲۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ٤۸	۱۹/۰۰^{d}±۲/۸۲	۷۴/۸۰±۲/۹۶	۲۳/۰۰^{f}±۱/۶۳	۷۴/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت صفر	۶۰/۰۰^{b}±۲/۸۲	۷۷/۸۰±۲/۹۶	۶۲/۴۰^{a}±۱/۶۳	۸۶/۴۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۲٤	۴۲/۰۰^{c}±۲/۸۲	۸۴/۶۰±۲/۹۶	۴۳/۶۰^{d}±۱/۶۳	۸۰/۸۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ٤۸	۴۸/۰۰^{b,c}±۲/۸	۸۰/۲۰±۲/۹۶	۶۰/۲۲^{f}±۱/۶۳	۸۱/۰۰±۲/۰۰
P value	۰/۰۰۰۱	۰/۳۲۰۲	۰/۰۰۰۷	۰/۲۱۶۷

a-d تفاوت اعداد در ستون دوم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$)

a-f تفاوت اعداد در ستونچهارم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$)

خصوصیات اسپرم در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون:

درصد اسپرم متحرک: نتایج مشخص نمود که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی‌دار بود($P<۰/۰۱$). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار مشاهده گردید($P<۰/۰۱$). بیشترین درصد تحرک اسپرم(۳/۴۵±۸۶/۰۰) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی ۱۲۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت به دست آمد و کمترین درصد تحرک(۳/۴۵±۵۲/۰۰٪)

Archive of SID

www.SID.ir

در رقیق‌کننده حاوی ۱۲۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان ۴۸ h به دست آمد(جدول ۵).

درصد اسپرم زنده: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد اسپرم زنده در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم زنده(۱/۵۸±۸۸/۵۳٪) در سطح صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و کم ترین درصد اسپرم زنده(۱/۵۸±۸۲/۰۰٪) در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد(جدول ۴). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیشترین درصد اسپرم زنده (۱/۳۷±۹۰/۳۰٪) در زمان صفر ساعت و کم ترین درصد اسپرم زنده(۱/۳۷±۸۱/۹۰٪) در زمان ۴۸ h به دست آمد(جدول ۴). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵).

درصد سلامت غشاء اسپرم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد سلامت غشاء در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی‌دار مشاهده گردید(P<۰/۰۱). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیشترین درصد سلامت غشاء(۲/۶۶ ±۷۲/۴۰٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت به دست آمد و کم ترین سلامت غشاء(۲/۶۶±۲۲/۰۰٪) در رقیق‌کننده حاوی ۱۰۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان ۴۸ h بدست آمد(جدول ۵).

درصد اسپرم طبیعی اسپرم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۵۵±۸۳/۳۳٪) در سطح ۱۲۰ mM قند تره‌هالوز و کم ترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۵۵±۷۲/۷۳٪) در سطح ۸۰ mM قند بدست آمد(جدول ۴). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار بود(P<۰/۰۱). بیشترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۳۴±۸۳/۸۰٪) در زمان صفر ساعت و کم ترین درصد اسپرم طبیعی(۱/۳۴ ±۷۶/۶۵٪) در زمان ۴۸ h به دست آمد(جدول ۴). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار نبود(P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

Lio و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که استفاده از رقیق‌کننده‌های حاوی قندهای ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز با ایجاد یک فشار اسمزی و خروج آب از سلول باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی در طی فرآیند کاهش دما می‌گردند، هم چنین این قندها به غشاء پلاسمایی اسپرم نیز نفوذ کرده و با گروه سر قطبی فسفولیپیدهای غشاء تشکیل پیوند هیدروژنی داده و در نتیجه از آسیب به لیپید غشاء جلوگیری می‌کنند(۱۹). براساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مشخص شد که استفاده از سطوح مختلف قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده‌های مختلف باعث بهبود خصوصیات اسپرم می‌گردد. در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون خصوصیات کیفی اسپرم در سطح ۱۲۰ تره‌هالوز بهتر بوده و در بین سطوح مختلف با افزایش سطح قند کیفیت اسپرم بهتر حفظ شده است. در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ خصوصیات کیفی اسپرم در گروه شاهد(بدون قند) نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی بالاتر بود با این‌حال در بین سطوح مختلف قند، با افزایش سطح قند خصوصیات اسپرم

Archive of SID

www.SID.ir

بهتر حفظ گردید. در هر دو رقیق‌کننده کم ترین درصد خصوصیات اسپرم در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد.

جدول ٤- مقایسه میانگین سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون

صفات اسپرم (٪) / قند تره‌هالوز (mM)	تحرک	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
۰	۸۲/۳۳ ^{a}±۱/۵۸	۸۸/۵۳ ^{a}±۱/۵۸	۶۱/۲۰ ^{a}±۱/۵۳	۸۲/۶۰ ^{a}±۱/۵۵
۸۰	۶۶/۰۰ ^{b}±۱/۵۸	۸۲/۰۰ ^{b}±۱/۵۸	۳۰/۵۳ ^{c}±۱/۵۳	۷۲/۷۳ ^{b}±۱/۵۵
۱۰۰	۶۷/۶۶ ^{b}±۱/۵۸	۸۴/۷۳ ^{a,b}±۱/۵۸	۴۶/۸۰ ^{b}±۱/۵۳	۷۸/۹۳ ^{a}±۱/۵۵
۱۲۰	۶۴/۵۳ ^{b}±۱/۵۸	۸۸/۰۰ ^{a}±۱/۵۸	۴۸/۳۳ ^{b}±۱/۵۳	۸۳/۳۳ ^{a}±۱/۵۵
P value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۷۹	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
زمان‌های مختلف نگهداری (h)				
۰	۸۱/۵۰ ^{a}±۱/۷۲	۹۰/۳۰ ^{a}±۱/۳۷	۶۴/۳۰ ^{a}±۱/۳۳	۸۳/۸۰ ^{a}±۱/۳۴
۲٤	۶۶/۴۰ ^{b}±۱/۷۲	۸۵/۲۵ ^{b}±۱/۳۷	۴۶/۰۵ ^{b}±۱/۳۳	۷۷/۷۵ ^{b}±۱/۳۴
٤۸	۶۲/۵۰ ^{b}±۱/۷۲	۸۱/۹۰ ^{b}±۱/۳۷	۲۹/۸۰ ^{c}±۱/۳۳	۷۶/۶۵ ^{b}±۱/۳۴
P value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۹

a-c تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است(P<۰/۰۱).

جدول ٥- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون

صفات اسپرم (٪)	تحرک	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
تره‌هالوز صفر در ساعت صفر	۸۴/۰۰ ^{a}±۳/۴۵	۹۰/۴۰±۲/۷۴	۷۲/۴۰ ^{a}±۲/۶۶	۸۴/۸۰±۲/۶۹
تره‌هالوز صفر در ساعت ۲٤	۸۳/۰۰ ^{a}±۳/۴۵	۸۹/۶۰±۲/۷۴	۶۵/۲۰ ^{a}±۲/۶۶	۸۳/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز صفر در ساعت ٤۸	۸۰/۰۰ ^{a}±۳/۴۵	۸۵/۶۰±۲/۷۴	۴۶/۰۰ ^{b}±۲/۶۶	۸۰/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت صفر	۷۹/۰۰ ^{a}±۳/۴۵	۸۹/۸۰±۲/۷۴	۴۱/۸۰ ^{b}±۲/۶۶	۷۴/۶۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۲٤	۶۱/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۷۹/۲۰±۲/۷۴	۲۷/۲۰ ^{c}±۲/۶۶	۷۲/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ٤۸	۵۸/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۷۷/۰۰±۲/۷۴	۲۲/۶۰ ^{c}±۲/۶۶	۷۱/۶۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت صفر	۷۷/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۸۶/۶۰±۲/۷۴	۷۱/۴۰ ^{a}±۲/۶۶	۸۷/۸۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۲٤	۶۶/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۸۶/۶۰±۲/۷۴	۴۷/۰۰ ^{b}±۲/۶۶	۷۵/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ٤۸	۶۰/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۸۱/۰۰±۲/۷۴	۲۲/۰۰ ^{c}±۲/۶۶	۷۴/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت صفر	۸۶/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۹۴/۴۰±۲/۷۴	۷۱/۶۰ ^{a}±۲/۶۶	۸۸/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۲٤	۵۵/۶۰ ^{b}±۳/۴۵	۸۵/۶۰±۲/۷۴	۴۴/۸۰ ^{b}±۲/۶۶	۸۱/۰۰±۲/۶۹
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ٤۸	۵۲/۰۰ ^{b}±۳/۴۵	۸۴/۰۰±۲/۷۴	۲۸/۶۰ ^{c}±۲/۶۶	۸۱/۰۰±۲/۶۹
P value	۰/۰۰۱۵	۰/۴۰۵۸	۰/۰۰۰۱	۰/۳۵۷۰

a-b تفاوت اعداد در ستون دوم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۱)

a-c تفاوت اعداد در ستون چهارم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۱)

در زمینه استفاده از قندهای مختلف در رقیق‌کننده‌های منی گزارش‌های متعددی وجود دارد، هم سو با نتایج مطالعه حاضر آزمایش‌های انجام شده توسط Bohlool و همکاران(۲۰۱۴) و Najafi و همکاران(۲۰۱۳) نشان‌دهنده بهبود کیفیت اسپرم در رقیق‌کننده پایه لسیتین سویا حاوی قند تره‌هالوز بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعات از سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار قند تره‌هالوز استفاده شده که بالاترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم و یک پارچگی غشاء در رقیق‌کننده پایه حاوی ۱۰۰ میلی مولار قند تره‌هالوز به دست آمد(۲۵، ۶). در مطالعه دیگری Jafaroghli و همکاران(۲۰۱۱) اثر افزودن غلظت‌های مختلف(mM ۵۰ ، ۷۰ و ۱۰۰) قندهای ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز در رقیق‌کننده پایه تریس زرده تخم‌مرغ بر قدرت باروری اسپرم قوچ را بررسی کردند که همه رقیق‌کننده‌های حاوی قندها از نظر کیفیت اسپرم نسبت به گروه شاهد بالاتر بودند. نتایج مطلوب با ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تره‌هالوز یا رافینوز به دست آمد(۱۴). در آزمایشی Aisen و همکاران(۲۰۰۲) اثر افزودن سطوح مختلف قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده پایه تریس زرده تخم‌مرغ را بر قدرت باروری اسپرم قوچ مورد بررسی قرار گرفت که بهترین نتایج در تیمار ۵۰ mM و ۱۰۰ قند تره‌هالوز گزارش گردید(۲). در تحقیق حاضر بالاترین درصد تحرک و زنده‌مانی در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون به دست آمد که با نتایج آزمایشات بالا مطابقت داشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و بررسی مطالعات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که خصوصیات اسپرم قوچ در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون نسبت به تریس-زرده تخم‌مرغ بهتر حفظ می‌شود که دلیل آن می‌تواند بالا بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون باشد. در توافق با نتایج پژوهش حاضر TalibAli و همکاران(۲۰۱۲) نیز با بررسی اثر جایگزینی زرده تخم‌مرغ با زرده‌هایی از منابع دیگر(کبک، شترمرغ، بوقلمون و اردک) در رقیق‌کننده‌های منی قوچ و تأثیر آن بر میزان باروری در شرایط آزمایشگاهی شاهد افزایش قابل‌توجه تشکیل بلاستوسیت در رقیق‌کننده‌ها مقایسه با رقیق‌کننده پایه بودند(۳۰). Humes و Webb(۲۰۰۶) نیز در مطالعه خود گزارش دادند که اثر محافظتی زرده تخم بوقلمون بر اسپرم اسب نر نسبت به زرده تخم‌مرغ بیش‌تر می‌باشد که علت آن را به بالاتر بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون نسبت دادند(۱۳). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر Kulaksız و همکاران(۲۰۱۰) طی بررسی اثر محافظتی زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان(مرغ خانگی، غاز، بوقلمون، اردک، بلدرچین ژاپنی و کبک) در فرآیند انجماد اسپرم قوچ نشان دادند که زرده تخم کبک بهترین اثر محافظتی از نظر تحرک و زنده‌مانی اسپرم را در مقایسه با پنج زرده تخم دیگر دارد(۱۶). در آزمایشی Bucak و Tekin در سال ۲۰۰۷ اثر افزودن قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده پایه را بررسی کردند. بالاترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم در ساعات ۶، ۲۴ و ۳۰ ذخیره‌سازی به دست آمد (۷). تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش ساعت نگهداری درصد تحرک و زنده‌مانی در هر دو رقیق‌کننده کاهش می‌یابد و در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون بین تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد، به عبارتی در این رقیق‌کننده با گذشت زمان تغییر چندانی در خصوصیات اسپرم ایجاد نشده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق در مورد اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در شرایط مایع در تحقیق حاضر با نتایج Jafari Ahangari در سال ۱۹۹۶ و Leboeuf و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت داشت(۱۷، ۱۵). جعفری آهنگری حداکثر زمان نگهداری اسپرم قوچ را تحت شرایط مایع ۱۲ ساعت عنوان نموده است. به طورکلی با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق استفاده از سطح ۱۲۰ قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون در ساعات

Archive of SID

www.SID.ir

اولیه نگهداری اسپرم به صورت مایع اثر بهتری در محافظت از خصوصیات اسپرم قوچ دالاق داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه علوم دامی و مرکزی دانشگاه گنبدکاووس و از دوستان گرامی مهندسین آقایان انوشا و علی‌پناه، خانم‌ها تقوی و پهم‌لی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1.Aboagla, E. M., Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goatsperm membrane and its protectionduringFreezing. Biol. Reprod, 69; 1245-1250.

2.Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology, 57; 1801-1808.

3.Alvarez, J.G., Storey, B.T. (2005). Differential incorporation of fattyacids into and peroxidative loss of fattyacids from phospholipidsof human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev, 42; 334-346.

4.Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens,J.L. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology, 61; 895-907.

5.Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank, 10; 49-62.

6.Bohlool, Z. h., Mohammadi, M., Roostaei-Ali Mehr, M., Ghavi Hossein-Zadeh, N. (2014). Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents.Anim. Prod. Sci, 55; 666-671.

7.Bucak,M., Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of rem semen. Small Rumin. Res,73; 103-108.

8.Choi, S. H., Song, K. T., Oh, H. R. (2001). Cholesterol contents and fatty acidcomposition of chukar,pheasant, guinea fowl and quail egg yolk.Asian-Aust. J. Anim. Sci, 14; 831-836.

9.Evans, G., Maxwell W.C. (1987). Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Sydney, 194p.

10. Foote, R. H. (1974). Artificial insemination in farm animals. Lea. Febiger. Philadelphia, 212-246.

11. Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipit peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J. Reprod. Fertil, 103; 17–26.

12. Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society, 76; 84-97.

13. Humes, R., Webb, G. (2006). Use of chicken or chukar egg yolk with twocryoprotectants for preservation of stallionsemen. Anim. Reprod. Sci, 94; 62–63.

14. Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents whit sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Rumin. Res, 96; 58-63.

15. JafariAhangari, Y. (1996). An investigation on the effect of various buffers(Tris, Citrate and Skimmed milk) on ram semen motility and survival characteristics in liquid storage. Final report of Research Plan. Animal Science Research Institute,p.37.

16. Kulaksız, R., Cebi, C., Akcay, E., Daskın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. Small Rumin. Res, 88; 12-15.

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

18. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., Stewart, D.L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. Reproduction and Fertility, 47; 283-291.

19. Lio, Z., Foote, R. H., Brockett,C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology, 37; 219-230.

20.López-sáez, A., Ortiz, N., Gallego, l., Garde, j. j. (2000). Liquid storage(5°C) of ram

Archive of SID

www.SID.ir

semen in different diluents. Androl, 44; 155–164.

21. Martin, I.C.A. (1963). The freezing of dog spermatozoa to -79°C. Research in Veterinary Science, 4; 304.

22. Maxwell, W.M.C., Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: areview. Reprod. Fertil.Dev, 5; 613–638.

23. Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci, 42; 55–65.

24. Moreno, J. S., Coloma, M. A., Diaz, A. T., Brunet, A. G., Pastor, A. P., Soria, A.Z. (2008). A comparision of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. Cryobiology, 57; 25-29.

25. Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari Sharif, A., Khodaei Motlagh, M. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology, 66; 275-282.

26. Revell, S., Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. Anim. Reprod. Sci, 36(1-2); 77-86.

27. Safdarian, M. (1386). Artificial insemination of sheep and goats. First edition, scientific-practical training institute of agricultural jihad. Tehran, Iran. p. 232.

28. Salamon, S., Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci, 62; 77-111.

29. Su, L., Li, X., Quan, X., Yang, S., Li, Y., He, X. (2008). A comparision of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. Anim. Reprod. Sci, 104; 212–219.

30. Talib Ali, A., Bomboi,G., Floris, B. (2013). Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. Small Rumin. Res, 113; 405- 410.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of Different Levels of Trehalose and Different Storage Times in on Dalagh Ram Semen Characteristics in Liquid Condition

A. Akhondi[1], Y. Mostafalo[2], A. Mohammadgharehbash[3],R.Rahchamani[4]

1. M.Sc. Animal Physiology, University of Gonbadkavos, Gorgan. Iran.

2. Assistant Prof., Animal Physiology, University of Gonbadkavos, Gorgan. Iran. . **aidin6925@yahoo.com**

Received:2018.30. 5 **Accepted: 2018. 11.8**

Abstract

Inroduction & Objective: Artificial insemination in sheep is an effective way to improve genetic and reproductive management. One of the vital stages of artificial insemination is the protection of ram sperm during storage. The aim of this study was to evaluate effects of different levels of trehalose sugar and different storage times in Tris-chicken egg yolk and Tris-turkey egg yolk extenders on Dalagh ram semen characteristics in liquid condition.

Materials and Methods: In this study, for semen sample collection four Dalagh rams in the age of 2-3 years were used. The samples were diluted in different extenders, then received different trehalose sugar treatments. Semen samples were aspirated into 0.5 ml straws, and were transferred into the refrigerator (5°C). Then at different times, spermatozoa characteristics including percentage of motile and viable sperm and membrane and sperm normality were evaluated. This experiment was carried out in 4×3 factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included different levels of trehalose sugar (0, 80, 100, 120 mM) and different storage times (0, 24 and 48 hours). The data were processed in Excel spread sheet environment and was analyzed by ANOVA procedure of Statistical Analysis System SAS (version 9.1). Comparison of data means were performed by Turkey test at the level of %1 error.

Results: The results showed effects different levels of trehalose sugar and different storage times in Tris-chicken egg yolk and turkey egg yolk extenders on the sperm characteristics were significant (P<0.01). Interaction of sugar levels and times on the percentage of sperm motility and membrane integrity was significant (P<0.01). The highest sperm motility (86.00±3.45%) and viability (94.40±2.74%) and sperm normality (88.00±2.69%) were obtained in Tris-turkey egg yolk extender containing 120 mM trehalose sugar and at 0 hours. The highest sperm membrane integrity (72.40±2.66%) was obtained in Tris-turkey egg yolk extender containing 0 mM trehalose sugar and at 0 hours.

Conclusion: For Dalagh ram semen dilution, the use 120 Mm of sugar trehalose in Tris-turkey egg yolk extender at the early hours of storage in liquid condition is effective.

Key word: Trehalose, Extender, Semen, Ram Dalagh

Archive of SID

www.SID.ir