Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶

DOI: 10.22034/vj.2017.107808

اثر رقیق‌کننده انجماد اسپرم و تلقیح مصنوعی بر بازده تولیدمثلی میش‌های تلقیح شده با اسپرم منجمد

• **رضا مسعودی**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **احمد زارع شحنه**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **آرمین توحیدی (نویسنده مسئول)**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **حمید کهرام**
گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
• **عباس اکبری شریف**
ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند زندی، سازمان جهاد کشاورزی استان تهران، تهران، ایران
• **محسن شرفی**
گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
• **ابوالحسن صادقی پناه**
بخش مدیریت و پرورش دام، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۲-۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۳-۰۸

Email: atowhidi@ut.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر رقیق‌کننده انجماد اسپرم و روش تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد بر بازده تولیدمثلی میش‌های زندی بوده است. یکصد و شصت رأس میش سه تا چهار ساله نژاد زندی با میانگین وزنی ۵۵ کیلوگرم به مدت ۱۲ روز سیدرگذاری شده و هنگام سیدربرداری ۴۰۰ واحد eCG دریافت کردند و ۵۴ ساعت پس از سیدربرداری تلقیح شدند. میش‌ها در قالب طرح فاکتوریل به دوگروه تلقیح واژینال و تلقیح ترانس‌سرویکال تقسیم شدند و هرگروه به دو زیرگروه تقسیم و با اسپرم منجمد شده در رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم مرغ یا لسیتین سویا تلقیح شدند. نتایج نشان داد نوع رقیق کننده تاثیری بر زنده‌مانی اسپرم، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای منی و بازده تولیدمثلی نداشت (P>۰/۰۵) اما تاثیر روش تلقیح مصنوعی بر بازده تولیدمثلی معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود و روش ترانس‌سرویکال درصد بالاتری از درصد آبستنی، زایش و بره‌زایی را نسبت به روش واژینال نشان داد. در نتیجه با توجه به مزایای استفاده از رقیق کننده با منشا گیاهی برای انجماد اسپرم قوچ می‌توان از رقیق کننده حاوی لسیتین سویا استفاده نمود و با استفاده از روش تلقیح مصنوعی ترانس‌سرویکال بازده تولیدمثل را بهبود داد.

کلمات کلیدی: اسپرم منجمد، بازده تولیدمثلی، لسیتین سویا، میش زندی

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 148-153

Effect of Extender and Artificial Insemination on Reproductive Efficiency of Ewes Inseminated with Frozen Sperm

By: Masoudi, R., Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Shahneh, A. R., Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Towhidi, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Kohram, H., Department of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Akbarisharif, A., The Breeding Station of Zandi Sheep, Pishwa, Varamin, Iran. Sharafi, M., Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modares. Tehran, Iran. Sadeghipanah, A., Animal Science Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Email: atowhidi@ut.ac.ir

Received: 2016-05-15 Accepted: 2016-05-28

The aim of this study was to determine the effect of freezing medium and artificial insemination method on reproduction efficiency of Zandi ewes inseminated with frozen semen. One hundred and sixty Zandi ewes (3-4-years old, 55 kg weight) received CIDR for 12 days and at the time of CIDR removal received 400 IU of eCG and were artificially inseminated 54 h after CIDR removal. The ewes divided into two insemination groups of vaginal and trans-cervical, then, each group was inseminated with frozen sperms in extenders containing egg yolk or soybean lecithin. The results showed that the extender didn't have any effect on sperm viability, semen lipid peroxidation and reproductive performance ($P>0.05$), but the artificial insemination method had a significant ($P<0.05$) effect on reproductive performance and pregnancy rate, parturition rate and lambing rate, which were higher in trans-cervical method than in vaginal method. In conclusion, regarding to the advantages of plant-origin extenders for ram semen freezing, soybean lecithin may be used as a suitable extender and fertility rate would be improved by trans-cervical artificial insemination method.

Key words: Frozen semen, Reproduction efficiency, Soybean lecithin, Zandi ewe

مقدمه

در طـــول ســـال‌های اخیر، پژوهش‌هـــای بســـیاری روی بهبود حفظ انجمادی منی قوچ برای گســـترش تلقیح مصنوعی صورت گرفته است. بقا و تحرک اســـپرم پـــس از انجماد ذوب تحت تاثیـــر فاکتورهای متعددی از قبیـــل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد منی مثل غلظت گلیســـرول و یا ســـایر مواد محافظت کننده مانند منابع پروتئینی و لیپوپروتئینی قرار می‌گیرد (۱۴ و ۱۶).

امروزه به طور کلی از غلظت‌هـــای ۱۵ تا ۲۰ درصد زرده تخم مرغ در رقیق کننده‌ها برای رقیق ســـازی منی قوچ استفاده می‌شود (۱۵). با وجود اثرات بسیار مثبت زرده تخم مرغ برای رقیق سازی منی در تمامی گونه‌های پستانداران، در سال‌های اخیر استفاده از آن با مشکلاتی روبرو شده است و تلاش‌هایـــی در جهت حذف و یا کاهش مقدار آن در رقیق کننده‌ها صورت گرفته است. یکی از این مشکلات، تغییرات زیاد در ترکیبات آن-هاست به طوری‌که استاندارد سازی هر یک از اجزای ویژه و مفید موجود در آن رقیق کننده، خصوصیات انجمادی اسپرم را با مشکل مواجه می‌کند. علاوه بر این زرده تخم‌مرغ و شـــیر ممکن است حاوی آلودگی‌های میکروبی باشند که با تولید سموم، ظرفیت باروری اسپرماتوزوا را شدیدا کاهش داده و حتی باعث از بین رفتن آن‌ها شـــوند و از همه مهم‌تر این‌که باعث انتقال بیماری‌هایی مثل آنفولانزای مرغی شوند (۱، ۲، ۶).

مشکلات رقیق‌کننده‌های حاوی منابع حیوانی منجر به افزایش تمایل برای اســـتفاده از منابع گیاهی شده است. بوسهآ و همکاران (۷) آنالیزهای کیفی وکمـــی روی رقیق‌کننده‌های بر پایه‌ی منابـــع حیوانی انجام داده و آلودگی‌های میکروبی آن‌ها را بارقیق‌کننده‌های بر پایه‌ی لســـیتین ســـویا در گاو مقایســـه کرده‌اند و نشـــان داده‌اند که رقیق‌کننده بر پایه‌ی لسیتین ســـویا عاری از آلودگی‌های باکتریایی و مایکوپلاســـمایی است. هم چنین رقیق کننده‌های حاوی لسیتین ســـویا سبب بهبود درصد اسپرماتوزوای با میتوکندری فعال نسبت به رقیق کننده بر پایه شیر پس چرخ می‌شود.

تلقیح مصنوعی در گوســـفند به طور معمول با اســـپرم تازه و از طریق سرویکس انجام می‌شود. درصد باروری در این روش حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است (۳ و ۱۰)، اما درصد آبستنی حاصل از تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد

www.SID.ir

Archive of SID

در تلقیح واژینال پایین است (۱۵). باروری پایین اسپرم منجمد به‌دلیل مشکل اسپرم در عبور از سرویکس ناهموار میش و همچنین مشکل بودن نفوذ تفنگ تلقیح به مجرای سرویکس و در نتیجه عدم امکان تلقیح عمیق سرویکال است (۱۳).

هدف از این مطالعه بررسی اثر رقیق‌کننده‌های انجماد حاوی لسیتین سویا و زرده تخم‌مرغ و روش‌های تلقیح مصنوعی واژینال و ترانس‌سرویکال با اسپرم منجمد بر بازده تولیدمثلی میش‌های زندی در خارج فصل تولیدمثلی بوده است.

مواد و روش‌ها

زمان آزمایش، حیوانات و تیمارهای آزمایشی

در خارج از فصل تولیدمثل (اواسط اردیبهشت) ۱۶۰ رأس میش نژاد زندی برای ۱۲ روز سیدرگذاری (EAZI-BREED™, CIDR®, Progesterone) شده و هنگام سیدربرداری ۴۰۰ واحد eCG (Sanofi Animal Health, LibourneCedex, France) به‌صورت درون‌عضلانی دریافت کردند و ۵۴ ساعت پس از سیدر برداری تلقیح شدند. این آزمایش با اسپرم منجمد انجام شد.

آماده‌سازی رقیق‌کننده و انجماد اسپرم

نمونه‌های منی دو بار در هفته با استفاده از واژن مصنوعی از ۱۰ قوچ زندی جمع‌آوری شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری منی، نمونه‌ها داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌های منی گرفته شده در هر نوبت با هدف از میان برداشتن اثرات فردی با یکدیگر آمیخته شدند. قبل از مخلوط شدن نمونه‌های اسپرم، ارزیابی‌های اولیه روی آن‌ها صورت گرفت و فقط از نمونه‌هایی برای انجماد استفاده شد که دارای اسپرم‌های با جنبایی بیش از ۷۰ درصد بودند. رقیق‌سازی به نسبت یک حجم منی و ۱۰ حجم محیط انجمادی در دمای اتاق انجام شد به طوری که غلظت نهایی اسپرم ۴۰۰ میلیون در هر میلی لیتر بود. تعداد اسپرم در انزال با استفاده از لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شد.

یک رقیق‌کننده پایه بر پایه‌ی تریس حاوی ۲/۷ گرم تریس، یک گرم فروکتوز، ۱/۴ گرم سیتریک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، ۷ درصد گلیسرول و با PH= ۷ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی اسمول، به عنوان رقیق کننده پایه منی استفاده شد. سپس به رقیق‌کننده حاوی لسیتین سویا، یک درصد (وزن/حجم) لسیتین سویا و به رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ، ۲۰ درصد (حجم/حجم) زرده تخم‌مرغ اضافه شد (۱۱). منی رقیق شده به تدریج تا چهار درجه سانتی‌گراد و به مدت دو ساعت سرد شد و سپس به داخل پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتر (IMV, France) کشیده شد. پایوت‌ها بلافاصله در فاصله‌ی پنج سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس به داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان ذوب ذخیره شدند. بعد از ذخیره سازی، پایوت‌ها در حمام آب گرم (۳۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه) ذوب شدند. پس از ذوب جنبایی کل و جنبایی پیشرونده با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

برای ارزیابی زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. این روش بر این اساس می‌باشد که اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. رنگ نیگروزین برای رنگ‌آمیزی پس‌زمینه و ایجاد اختلاف میان رنگ اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر است. برای این رنگ‌آمیزی ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم برداشته و بر روی لام قرار داده شد و سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ آماده شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته شد و با سر سمپلر به آرامی نمونه هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه برداشته شد و بر گوشه‌ی لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر بر روی لام به آرامی گسترش داده شد. پس از خشک شدن، لام زیر میکروسکوپ قرار داده شد و از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ به خود نگرفته بودند و یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری میزان تغییرات مالون‌دی‌آلدهید (MDA) حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای منی

اندازه‌گیری غلظت MDA با تیوباربیوتوریک اسید (TBA) یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می‌دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی‌لیتر از هر نمونه منی با یک میلی‌لیتر EDTA، یک میلی‌لیتر BHT و دو میلی‌لیتر TCA با هم مخلوط شده و به داخل لوله مخروطی ریخته شدند. لوله‌های مخروطی در ۱۲۰۰×g برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، یک میلی‌لیتر از محلول بالای لوله‌ها با یک میلی‌لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته شدند. لوله‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفتومتر) اندازه‌گیری شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت شدند و در پایان، نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری در فرمول منحنی استاندارد گذاشته و غلظت MDA (نانو مول در میلی‌لیتر منی) محاسبه شد (۹).

تلقیح مصنوعی

روش تلقیح واژینال به این صورت بود که میش‌ها روی یک خرک قرار داده شدند، به طوری‌که اندام حرکتی عقبی بالاتر از سطح بدن قرار گیرد و سپس با استفاده از یک اسپیکولوم مجهز به منبع نور واژن میش باز شده تا دهانه سرویکس پیدا شود و سپس اسپرم در دهانه سرویکس تخلیه شد. در روش ترانس سرویکال ۲۰ دقیقه قبل از تلقیح به هر میش ۱۰۰ واحد اکسی‌توسین (داروسازی ابوریحان، ۱۰ واحد اکسی توسین در هر میلی‌لیتر) تزریق شد تا سرویکس میش‌ها باز شود، سپس میش‌ها روی یک خرک قرار داده شدند، به‌طوری‌که اندام حرکتی عقبی بالاتر از سطح بدن قرار گیرد و سپس با استفاده از یک اسپیکولوم مجهز به منبع نور واژن میش باز شد تا دهانه سرویکس پیدا شود و با استفاده از تفنگ تلقیح مصنوعی میش‌ها به صورت ترانس‌سرویکال تلقیح شدند. نحوه تلقیح به این صورت بود که تفنگ به درون سرویکس رفته و تا جایی که در سرویکس

www.SID.ir

Archive of SID

به آسانی نفوذ می‌کرد وارد سرویکس شده و در همان محل اسپرم تخلیه شد. منی به نسبت یک به ده با رقیق‌کننده‌ها رقیق شد و تعداد اسپرم مورد استفاده در هر تلقیح صدمیلیون عدد بوده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

درصد آبستنی، زایش و برەزایی حاصل از تلقیح با اسپرم منجمد در آزمایش دوم در قالب طرح فاکتوریل ۲×۲ و با استفاده از رویه GENMOD نرم افزار SAS انجام شد. ارزیابی آزمایشگاهی زنده مانی اسپرم و میزان پراکسیداسیون لیپیدهای اسپرم با استفاده از رویه GLM در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

نتایج

جنبایی، زنده‌مانی وپراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم بین رقیق‌کننده بر پایه لیستین سویا (به ترتیب ۱/۴۵±۴۵/۶۲، ۱/۱۶±۳۰/۲۵ درصد) و زرده تخم‌مرغ (به ترتیب ۱/۴۵±۴۳/۸۵، ۱/۱۶±۲۹/۱۷ درصد) دیده نشد و همچنین هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر میزان زنده‌مانی اسپرم بین رقیق‌کننده بر پایه لیستین سویا (۱/۷۰±۳۹/۱۶ درصد) و زرده تخم مرغ (۱/۷۰±۳۹/۶۶ درصد) دیده نشد. نتایج نشان داد که رقیق‌کننده‌های بر پایه لیستین سویا (۰/۱۲±۴ نانو مول) و زرده تخم مرغ (۰/۱۲±۴/۱۴ نانو مول) هیچ تاثیر معنی‌داری بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی اسپرم نداشتند.

بازده تولیدمثل

نتایج باروری نشان داد که در هنگام استفاده از اسپرم منجمد در خارج از فصل تولیدمثل در میان دو روش تلقیح مصنوعی واژینال و ترانس سرویکال اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). همچنین در هنگام استفاده از اسپرم منجمد دارای رقیق کننده لسیتین سویا درصد آبستنی حاصل از دو روش تلقیح مصنوعی واژینال و ترانس سرویکال در خارج از فصل تولیدمثل به ترتیب پنج و ۲۰ درصد، درصد زایش پنج و ۲۰ درصد و درصد برەزایی پنج و ۲۰ درصد بوده است.

در هنگام استفاده از اسپرم منجمد دارای رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ، درصد آبستنی حاصل از دو روش تلقیح مصنوعی واژینال و ترانس سرویکال به ترتیب پنج و ۲۰ درصد، درصد زایش ۲/۵ و ۱۷/۵ درصد و درصد برەزایی ۲/۵ و ۱۷/۵ درصد بوده است (جدول ۱). در این آزمایش نوع رقیق کننده اثر معنی‌داری بر بازده تولید مثلی نداشت.

بحث

مزیت تلقیح مصنوعی، بیشترین استفاده از قوچهای برتر و کنترل بیماری‌های مسری در میان گله‌ها است. با استفاده از اسپرم منجمد می‌توان از توان ژنتیکی یک قوچ برتر برای سالیان متمادی استفاده نمود ولی به دلیل حساس بودن اسپرم قوچ به فرایند انجماد، درصد زیادی از اسپرم‌های موجود در منی طی فرایند انجماد آسیب می‌بینند و توانایی جنبایی و رسیدن آن‌ها به محل لقاح و در نهایت درصد باروری حاصل از تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد کاهش می‌یابد (۱۵). با این اوصاف با تخلیه اسپرم منجمد در نزدیکی محل لقاح (رحم) می‌توان شانس لقاح را افزایش داد.

در تلقیح مصنوعی واژینال به دلیل این‌که اسپرم در واژن و دهانه سرویکس تخلیه می‌شود و این موضوع که به دلیل تنش ناشی از انجماد-ذوب جنبایی آن کاهش یافته است، سبب کاهش شانس رسیدن اسپرم به محل لقاح شده و درصد باروری کاهش می‌یابد. در تلقیح مصنوعی ترانس‌سرویکال با استفاده از اکسی‌توسین، سرویکس باز شده و قابلیت عبور تفنگ تلقیح مصنوعی از کانال سرویکس و تخلیه اسپرم در انتهای سرویکس و یا در رحم فراهم می‌شود که این موضوع به نوبه خود موجب افزایش مقدار اسپرم موجود در محل لقاح می‌شود. از طرفی اکسی‌توسین می‌تواند سبب افزایش انتقال اسپرم از کانال سرویکس شود (۵) و در نتیجه اسپرم بیشتری به محل لقاح رسیده و شانس لقاح میان اسپرم و تخمک افزایش می‌یابد (۱۲، ۲۰، ۲۳). با توجه به این موضوع که اکسی‌توسین فاقد

جدول ۱- تاثیر رقیق‌کننده‌های حاوی لسیتین سویا (SL) و زرده تخم مرغ (EY) و روش‌های تلقیح مصنوعی واژینال وترانس‌سرویکال بر بازده تولیدمثلی میش‌ها

	واژینال		ترانس سرویکال	
تلقیح مصنوعی	SL	EY	SL	EY
درصد آبستنی	۵ b (۲/۴۰)	۵ b (۲/۴۰)	۲۰ a (۸/۴۰)	۲۰ a (۸/۴۰)
درصد زایش	۵ b (۲/۴۰)	۲/۵ b (۱/۴۰)	۲۰ a(۸/۴۰)	۱۷/۵ a (۷/۴۰)
درصد بره زایی	۵ b (۲/۴۰)	۲/۵ b (۱/۴۰)	۲۰ a (۸/۴۰)	۱۷/۵ a (۷/۴۰)

عدد درون پرانتز نشان‌دهنده فراوانی در هر گروه می‌باشد. حروف غیر مشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان تیمارها در ردیف است (P<۰/۵۰).

www.SID.ir

Archive of SID

اثر منفی در انتقال اسپرم به اویداکت می‌باشد و سبب افزایش انقباضات رحم و باز شدن سرویکس می‌گردد، و همچنین فاقد اثر منفی بر باروری تخمک می‌باشد (۱۷،۱۸)، بدین ترتیب با افزایش شانس لقاح اسپرم و تخمک درصد باروری افزایش می‌یابد.

نتایج حاصل از روش تلقیح بر بازده تولیدمثل با مطالعات آرمسترانگ و ایوانز (۴) و فیر و همکاران (۱۰) و نتایج حاصل از تاثیر افزایش مقدار اسپرم در محل لقاح بر درصد باروری با مطالعات اهلینگ و همکاران (۸) و وربرخموس و همکاران (۲۲) همخوانی داشته است.

در این مطالعه دو رقیق‌کننده بر پایه لیستین سویا و زرده تخم‌مرغ مورد بررسی قرار گرفتند. رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ با وجود نتایج نسبتاً خوبی که پس از انجماد به جای می‌گذارند، ولی همواره با مشکلات خاصی روبرو بوده‌اند. علاوه بر مشکلاتی که در قسمت مقدمه به آن‌ها اشاره شد، زرده دارای پروژسترون است که سبب ظرفیت‌پذیری زودهنگام اسپرم شده وبه آکروزوم اسپرم آسیب وارد می‌کند. ازمعایب دیگر آن وجود ذراتی است که ارزیابی‌های میکروسکوپی به خصوص با CASA را دچار مشکل می‌کند، زیرا نرم افزار ذرات را نیزاسپرم مرده در نظر می‌گیرد. برخلاف بدن که در آن HDLها به عنوان لیپوپروتئین‌های خوب وLDLها به‌عنوان لیپوپروتئین‌های بد نامیده می‌شوند، می‌توان دراین جا نام آن‌ها راجایگزین یکدیگر نمود، زیرا HDLهای زرده اثر معکوس با LDL داشته واثرات مفید آن‌ها را از میان بر می‌دارند (۱۹). باتوجه به این که اثر اصلی زرده تخم‌مرغ درحفظ انجمادی سلول‌ها مربوط به بخش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم مانند لسیتین می‌باشد، لذا استفاده از لسیتین سویا به عنوان ماده تجاری قابل دسترس در محیط رقیق کننده منی می‌تواند کیفیت محیط انجمادی را تا حد قابل قبولی افزایش دهد (۱۱). نتایج این پژوهش نشان داد که عملکرد اسپرم پس از انجماد-ذوب و نیز معیارهای سلولی تعیین کننده در باروری اسپرم نظیر زنده‌مانی و پراکسیداسیون لیپید غشایی هیچ تفاوت معنی‌داری در بین اسپرم‌های پس از انجماد در بین دو رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ و لسیتین سویا وجود نداشت.

با توجه به عدم مقایسه این دو رقیق‌کننده در تعیین باروری در مزرعه، اسپرم‌های منجمد شده در این دو گروه با روش‌های مختلف تلقیح مصنوعی مورد مقایسه قرار گرفتند که از نظر میزان باروری نیز تفاوت معنی‌داری در بین این دو گروه رقیق کننده دیده نشد. این بخش از مطالعه ما با نتایج شرفی و همکاران (۱۹) و فروزانفر و همکاران (۱۱) مطابقت دارد که نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که افزودن یک درصد لیستین سویا تفاوت معنی داری در کیفیت اسپرم درمقایسه با گروه ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ ایجاد نمی‌کند. همچنین در این مطالعه توصیه بر آن شد که با توجه به اثرات منفی که در رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ وجود دارد، لسیتین سویا به عنوان یک جایگزین زرده تخم‌مرغ برای انجماد اسپرم مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه به نظر می‌رسد که با توجه به اثرات منفی زرده تخم مرغ در رقیق کننده‌ها، لسیتین سویا عامل مناسبی جهت رقیق سازی و سپس انجمادسازی اسپرم قوچ به منظور دست‌یابی به بهترین نتایج باروری باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به مزایای استفاده از رقیق کننده با منشا گیاهی که در بالا توضیح داده شد، برای انجماد اسپرم قوچ می‌توان از رقیق کننده حاوی لسیتین سویا استفاده نمود و و همچنین با استفاده از روش تلقیح مصنوعی ترانس‌سرویکال بازده تولیدمثل را در میش‌های نژاد زندی بهبود بخشید.

منابع مورد استفاده

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

2. Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gérard, J.L. Courtens et al. 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.

3. Anel, L., M. Kaabi, B. Abroug,M. Alvarez, E. Anel, J.C. Boixo et al. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 63: 1235-1247.

4. Armstrong, D.T. and G. Evans. 1984. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 71: 89-94.

5. Ayad, V.J., S.T. Leung, T.J. Parkinson and D.C. Wathes. 2004. Coincident increases in oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Animal Reproduction Science* 80: 237-250.

6. Bielfeld, P., R. Jeyendran, W. Holmgren and L. Zaneveld. 1990. Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *Journal of Andrology* 11: 260.

7. Bousseau, S., J. Brillard, B. Marquant-Le Guienne, B. Guerin, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.

8. Ehling, C., P. Wirth, L. Schindler, K.G. Hadeler, H.H. Dopke, E. Lemme et al. 2003. Laparoscopical intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology* 60: 777-787.

9. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Enzyme* 186: 407-421.

10. Fair, S., J.P.Hanrahan, C.M. O'Meara, P. Duffy, D. Rizos, M. Wade et al. 2005. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology* 63: 1995-2005.

11. Forouzanfar, M., M. Sharafi, S. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseiniet al. 2010. In vitro comparison of egg yolk–

www.SID.ir

Archive of SID

based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73: 480-487.

12. Khalifa, R.M., B.L. Sayre and G.S. Lewis. 1992. Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science* 70: 38-42.

13. Lightfoot, R.J. and S. Salamon. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* 22: 385-398.

14. Maxwell, W. and P. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42: 55-65.

15. Salamon, S. and W. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37: 185-249.

16. Salamon, S. and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.

17. Sayre, B.L. and G.S. Lewis. 1996. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology* 45: 1523-1533.

18. Sayre, B.L. and G.S. Lewis. 1997. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 48: 267-275.

19. Sharafi, M., M. Forouzanfar, S.M. Hosseini, M. Hajian, S. Ostadhosseini, L. Hosseini et al. 2009. In Vitro Comparison of Soybean Lecithin Based-Extender with Commercially Available Extender for Ram Semen Cryopreservation. *International Journal of Fertility and Sterility* 3: 149-152.

20. Stellflug, J.N., M.C. Wulster-Radcliffe, E.L. Hensley, E.A. Cowardin, R.C. Seals and G.S Lewis. 2001. Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. J*ournal of Animal Science* 79: 568-573.

21. Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57: 1087-1094.

22. Verberckmoes, S., I. De Pauw, A. Van Soom, G. Vanroose, H. Laevens and A. De Kruif. 2001. Cervical insemination in sheep. *Vlag Dierge Tijd* 70: 475-480.

23. Wulster-Radcliffe, M.C., B.A.Costine and G.S. Lewis. 1999. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *Journal of Animal Science* 77: 2587-2593.

www.SID.ir