

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

\*عباس فرشاد<sup>۱</sup>، پریسا فاضلی<sup>۲</sup>، بهروز خلیلی<sup>۳</sup> و سعید آخوندزاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه علوم دامی دانشگاه کردستان، <sup>۲</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد 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، به مدت ۷ هفته جمع‌آوری و هر بار بلافاصله برای پارامترهایی همچون تحرک و غلظت ارزیابی شدند. منی با رقیق‌کننده (تریس، سیتریک اسید و فروکتوز) به همراه 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 به دست آمده از غلظت‌های مختلف زرده تخم‌مرغ (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد)، برای زنده‌مانی به ترتیب ۵۷/۴۸، ۶۰/۱۷، ۵۵/۲۱، ۵۴/۹۱، ۵۳/۷۴ و ۴۹/۵۳ درصد، برای تحرک اسپرم به ترتیب ۵۲/۹۲، ۵۵/۷۱، ۵۰/۷۸، ۴۹/۸۵، ۴۹/۲۱ و ۴۵/۳۵ درصد و برای جنبایی پیش‌رونده به ترتیب ۳۹/۲۱، ۴۲/۲۸، ۳۷/۸۵، ۳۶، ۳۷ و ۳۲/۴۲ درصد بود. بیشترین و کمترین زنده‌مانی، تحرک و جنبایی پیش‌رونده به ترتیب 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 به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $P < 0/05$ )، 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

و جیلائی، 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

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 (آموا

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 ( $3 \pm 0.27$ ) با وزن بدن ۶۰-۵۵ کیلوگرم ( $57.7 \pm 5.2$ ) انجام شد. در طی اجرای آزمایش بزها براساس AFRC<sup>۱</sup> (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 ( $3 \times 10^9$  اسپرم در هر میلی‌لیتر) جهت انجماد استفاده شدند (ابوقلا 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 (۷/۷)، پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، استرپتومایسین سولفات 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

به‌دلیل دارا بودن لیپوپروتئین‌های با دانسیته پایین به‌عنوان حفاظت‌کننده شوک سرمایی در طی فرآیندهای انجماد و یخ‌گشایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (لیویف 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 ختنی 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، علاوه بر این که باعث لخته شدن زرده تخم‌مرغ می‌شود، همچنین بر پیوند استری گروه آسید 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؛ لیویف 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 (لیویف و همکاران، ۲۰۰۰).

لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در شرایط عدم خارج‌سازی پلاسمای منی

درصد زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس و جدا کردن پلاسمای منی اثر مثبتی بر روی تحرک اسپرم بعد از یخ‌گشایی دارد. میزان جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی در ۵ درصد زرده تخم مرغ نسبت به سایر سطوح به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). زرده تخم مرغ با وجود این که 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 تخم مرغ نسبت به سایر سطوح، به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). سانتیاگو-مورینو و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که غلظت‌های بالای زرده تخم مرغ میزان آسیب آکروزومی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را افزایش می‌دهد. در این مطالعه نیز کمترین میزان اسپرم طبیعی در ۲۰ درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۷/۵ و ۱۰ درصد زرده تخم مرغ بر تحرک و زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) میزان تحرک و درصد اسپرم زنده در ۷/۵ درصد زرده تخم مرغ بهتر از ۱۰ درصد بود ولی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد، برای انجماد اسپرم بز مرخز در فصل تولید مثل می‌توان از رقیق‌کننده تریس به‌همراه ۵ درصد زرده تخم مرغ، بدون نیاز به جداسازی پلاسمای منی، با موفقیت استفاده کرد.

ساعت در دستگاه سردکننده (۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند سپس پایوت‌ها در فاصله ۴ سانتی‌متر به مدت 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 به مدت ۳۰ ثانیه)، نمونه‌ها به‌وسیله محلول تریس-اسید سیتریک-گلوکز (بدون زرده تخم مرغ 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 (ابوقلا 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 تجزیه و تحلیل 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.

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

## نتایج و بحث

در این مطالعه زنده‌مانی و تحرک اسپرم در ۵ درصد زرده تخم مرغ نسبت به سایر سطوح (۲/۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد) به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بالاتر بود (جدول ۲). کمترین درصد اسپرم‌های زنده و متحرک در ۲۰ درصد زرده تخم مرغ مشاهده شد. مقدار کاهش میانگین این تیمار با سایر سطوح معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). ابوقلا و ترادا (۲۰۰۴) گزارش کردند که استفاده از ۲۰

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

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

a-b حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲- صفات کیفی اسپرم در غلظت های مختلف زرده تخم مرغ پس از یخ گشایی (میانگین ± اشتباه معیار).

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

a-e حروف متفاوت در هر ستون، نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می باشد ( $P < 0.05$ ).

## 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 artificial 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.

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

**\* A. Farshad<sup>1</sup>, P. Fazeli<sup>2</sup> and S. Akhondzadeh<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, University of Kurdistan, Iran, <sup>2,3,4</sup>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