مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ ویژه‌نامه علوم دامی شهریور ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

بررسی تاثیر روش‌های تلقیح مصنوعی سرویکال و رحمی بر نتایج آبستنی میش‌های شال در خارج از فصل تولید مثل

یوسف جعفری آهنگری[1]، فرامرز قراگوزلو[2] و امیرسعید جوان[2]
[1] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2] دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۱/۲٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/٦/۲۲

چکیده

تعداد ٤۰ رأس میش ۲ تا ٤ ساله شال متعلق به موسسه تحقیقات دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انتخاب شد. در فصل بهار همزمانی فحلی بوسیله استفاده از سیدر دارای هورمون پروژسترون به مدت ۱۲ روز و تزریق ۳۰۰ واحد بین‌الملل هورمون PMSG در زمان خارج سازی سیدر انجام شد. اسپرم از پنج رأس قوچ شال بوسیله مهبل مصنوعی اخذ و پس از ارزیابی، نمونه‌های مناسب با یکدیگر مخلوط شدند. رقیق‌سازی اسپرم با شیر استریلیزه و هموژنیزه گاو در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پایوت‌های ۰/۲ میلی‌لیتری از اسپرم رقیق شده، پر گردید و در دمای ۱۸ سانتی‌گراد تا ٤ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. میش‌های فحل پس از شناسایی بوسیله قوچ تیزر به دو گروه تقسیم و به روش‌های سرویکال و رحمی تلقیح مصنوعی شدند. پنجاه ساعت پس از تزریق هورمون PMSG، توسط پیپت تلقیح مصنوعی مخصوص با عبور از چین‌های سرویکس، اسپرم وارد چین‌های سرویکس و بدنه رحم و تلقیح انجام گردید. میزان بازگشت به فحلی ۱٦ تا ۱۷ روز با شمارش میش‌های فحل و تشخیص آبستنی ۳۰ روز پس از تلقیح مصنوعی به روش سونوگرافی رکتال انجام شد. نتایج نشان داد که میزان فحلی و عدم بازگشت به فحلی میش‌ها صد در صد بود. میانگین آبستنی میش‌ها ٤۷/۵ درصد بود که به‌ترتیب در میش‌های جوان و مسن ۵۲ و ٤۳ بود. میزان آبستنی در میش‌ها پس از تلقیح مصنوعی به روش سرویکال ٤۲/۵ و به روش رحمی ۵۲/۵ درصد بود. نتایج نشان داد که اثر مکان تزریق اسپرم برنتایج آبستنی میش‌های تلقیح شده معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

واژه‌های کلیدی: تلقیح مصنوعی میش؛نژاد شال

مقدمه

روش‌های تلقیح مصنوعی گوسفند شامل روش واژنی، روش ابتدای سرویکس، روش تلقیح داخل رحم میش بطریق جراحی یا لاپاراتومی و یا بدون جراحی و با استفاده از لاپاراسکوپ است (ایوانز، ۱۹۸۸).

روش واژنی ابتدایی‌ترین روش بوده که اکنون بدلیل راندمان بارداری کم و نیاز به دوز زیاد اسپرم جهت تخلیه در محیط نامناسب واژن کمتر استفاده می‌شود (ایوانز و مالس ول، ۱۹۸۷). در روش تلقیح ابتدای سرویکس، اسپرم در چین اول تزریق می‌شود. ماکسول و سالامون (۱۹۹۳) پس از تلقیح سرویکال، میش‌های نژاد پشمی در استرالیا با

استفاده از اسپرم قوچ بلافاصله پس از رقیق‌سازی و اسپرم مایع نگهداری شده تا ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان بره‌زایی را بترتیب ۷۵-۶۸، ۵۰-۴۵، ۳۰-۱۵ و ۲۰-۱۵ درصد گزارش نمودند.

همچنین پس از تلقیح مصنوعی میش‌های نژاد مغانی به روش ابتدای سرویکس با اسپرم رقیق شده قوچ در بافرهای شیر و تریس میزان بره‌زایی به‌ترتیب ۵۰ و ۶۰ درصد بدست آمد (آهنگری، ۱۹۹۷).

نتایج بره‌زایی پس از استفاده از اسپرم منجمد و یخگشایی شده بترتیب ۲۰ درصد (آهنگری، ۱۹۹۷)، ۴۰ درصد (لایت فوت و سالامون، ۱۹۷۰) و ۴۵-۳۰ درصد گزارش شده است (سالامون و ماکسول، ۱۹۹۵).

روش تلقیح داخل رحمی که در استرالیا برای اصلاح نژاد گوسفند نژادپشمی پیشنهاد و استفاده شد، بطریق جراحی و یا بدون جراحی و با استفاده از لاپاراسکوپ ۷۰ درصد بره‌زایی را برای اسپرم منجمد نشان داد (جیلان و همکاران، ۱۹۹۷؛ ماکسول و همکاران، ۱۹۹۵)، اما چون نیاز به جراحی و یا ابزار گران قیمت مانند لاپاراسکوپ و تجهیزات مربوطه و مجری آموزش دیده دارد، هزینه‌های انجام آن اقتصادی نیست. بدین منظور محققین دانشگاه گوئلف کانادا ساختار آناتومیکی را شناسایی و مشاهده نمودند که سرویکس گوسفند با متوسط طول ۸ سانتی‌متر دارای ساختمانی متشکل از چند قیف با حلقه‌های غیرمتحدالمرکز و با انتهای باریک است که به مدخل قیف دیگر باز می‌شوند. ترتیب، تعداد، اندازه و فاصله بین حلقه‌ها در میش‌ها، متفاوت است (هالبرت و همکاران، ۱۹۹۰). برای فائق آمدن بر مشکل آناتومیکی سرویکس میش‌ها، آنها روش ترانس سرویکال و یا رحمی را پیشنهاد کردند (هالبرت و همکاران، ۱۹۹۰). در این روش پس از وارد نمودن واژینسکوپ دارای منبع نوری در واژن میش فحل، سوند تلقیح را از دهانه سرویکس عبور داده تا اسپرم را در ابتدای رحم تخلیه نمایند. آنها توانستند در ۸۰ درصد از میش‌های فحل مورد آزمایش، پیپت را از سرویکس عبور داده که در نتیجه آن ۷۰ درصد از میش‌های تلقیح شده بره‌زایی نمایند (باکرل و والتن، ۱۹۹۴).

هدف از این آزمایش بررسی و مقایسه نتایج باروری روش‌های تلقیح مصنوعی سرویکال و رحمی در میش‌های نژاد شال در خارج از فصل تولید مثل بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۴۰ رأس میش ۲ تا ۴ ساله و بدون سابقه سقط جنین، از گله میش‌های نژاد شال موجود در موسسه تحقیقات دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای اجرای آزمایش انتخاب شدند. همه میش‌ها با رنگ روی ناحیه پشت و نیز ثبت شماره فلزی گوش مشخص شدند و در بهاربندهای با سیستم نیمه‌بسته نگهداری می‌شدند و تغذیه آنها بر پایه چرا و تغذیه کمکی با یونجه خشک، کاه و کنسانتره بود. در اواسط بهار به‌منظور ایجاد همزمانی فحلی در میش‌ها از سیدر[1] حاوی هورمون پروژسترون استفاده شد. یازده روز بعد سیدر از مهبل میش‌ها خارج شد و سپس ۳۰۰ واحد بین‌المللی هورمون PMSG بصورت عضلانی به هر میش تزریق شد. میش‌های فحل با استفاده از قوچ تیزر دارای پیش‌بند ، شناسایی، علامت‌گذاری و به دو گروه تلقیح مصنوعی به روش سرویکال (n=۲۱) و رحمی (n=۱۹) تقسیم شدند.

اسپرم از پنج رأس قوچ‌نژاد شال بوسیله مهبل مصنوعی گرفته شد. نمونه‌های اسپرم از نظر خصوصیات حرکتی و غلظت ظاهری اسپرماتوزوآ شدند (ایوانز و ماکسول، ۱۹۸۷). نمونه‌های مناسب با یکدیگر مخلوط و سپس به نسبت ۱ به ۱ شیر استریلیزه و هموژنیزه گاو در ۳۰ درجه سانتی‌گراد رقیق گردیدند. اسپرم رقیق شده وارد پایوت‌های ۰/۲ میلی‌لیتری گردید و در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری شد. پایوت‌های حاوی اسپرم رقیق شده تا ۴ ساعت مورد استفاده قرار گرفت و اسپرم رقیق شده مازاد در پایان

1- CIDR

آزمایش به روش هموسیتومتری برای تعیین غلظت شمارش شد (ایوانز و ماکسول، ۱۹۸۷).

تلقیح مصنوعی میش‌های فحل ۵۰ ساعت پس از تزریق هورمون PMSG انجام شد. میش را به پشت روی چهار پایه مخصوصی که برای این منظور ساخته شد، قرار داده و تلقیح کننده پس از بالازدن دنبه میش، نوک واژینوسکوپ آغشته به ژل را با زاویه ٤٥ درجه وارد واژن میش نمود. دهانه واژینسکوپ را باز نموده و منبع نوری را نیز با همان دست نگاه داشته سپس با دست دیگر پنس ثابت کننده را وارد کرده و بعد از پیدا کردن دهانه سرویکس لبه بالایی آن را با نوک پنس گرفته و ثابت نمود. پیپت تلقیح مصنوعی را پس از واژن وارد چین اول سرویکس نموده و با چرخاندن آن در جهت عقربه‌های ساعت و برعکس به همراه کمی فشار بطرف جلو از چین‌های سرویکس به پیش برده تا به انتهای سرویکس و یا ابتدای بدنه رحم رسیده و اقدام به تخلیه اسپرم شد (هالبرت و همکاران، ۱۹۹۰). پس از تزریق اسپرم به آرامی پیپت با چرخش به عقب کشیده شد. تلقیح مصنوعی در چین‌های اول تا سوم سرویکس به‌عنوان تلقیح سرویکال و تلقیح مصنوعی در انتهای سرویکس و ابتدای رحم به‌عنوان تلقیح به روش در نظر گرفته شد. پس از اتمام تلقیح مصنوعی، پنس نگهدارنده دهانه سرویکس آزاد شد و منبع نوری و واژینوسکوب نیز از واژن خارج شدند. میزان عدم بازگشت به فحلی میش‌ها ١٦ تا ١٧ روز پس از تلقیح مصنوعی ثبت شد. تشخیص آبستنی به روش سونوگرافی رکتال ۳۰ روز پس از تلقیح مصنوعی انجام شد. در این روش بعد از مقید کردن میش، پراب[1] آغشته به ژل روان‌کننده[2] را وارد رکتوم میش نموده و مقداری بطرف جلو برده تا از مثانه پر به‌عنوان نشانگر[3] برای دیدن رحم استفاده شود. در میش‌های آبستن، جنین و تحرک آن و کیسه‌های جنینی دیده شد و تشخیص انجام گرفت (باکرل و والتون، ١٩٩٤).

نتایج

نتایج آبستنی میش‌های مورد آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه‌های اسپرم جمع‌آوری شده به شکل خامه‌ای و شیری با غلظت ظاهری نمونه‌های اسپرم نمونه‌های اسپرم معادل ۲۵۰۰-۲۰۰۰ میلیون سلول اسپرماتوزوآ در هر میلی‌لیتر تخمین زده شد. نتایج شمارش هموسیتومتری نیز غلظت اسپرماتوزوآی استفاده شد در آزمایش را معادل ۲۵۰۰ میلیون سلول اسپرماتوزوآ در هر میلی‌لیتر اسپرم نشان داد.

میزان همزمانی فحلی در میش‌ها صد درصد بود که بیشترین فراوانی فحلی حدود ۳۵ ساعت پس از تزریق هورمون PMSG مشاهده شد (شکل ۱). میزان عدم بازگشت به فحلی در میش‌های تلقیح شده نیز صد در صد بود. میزان آبستنی به تفکیک در میش‌هایی که اسپرم در چین‌های اول و دوم سرویکس تزریق شد ۲۵، در میش‌هایی که در چین‌های سوم تا انتهای سرویکس تزریق شد ٥٣/٥ و در میش‌هایی که کاملاً در رحم تزریق شد ٦٢/٥ درصد بطور نسبی بود. ولی بطور کلی برای روش‌های سرویکال و رحمی به‌ترتیب ٤٢/٥ و ٥٢/٥ درصد بود. آزمون کای مربع نشان داد که اثر مکان تزریق اسپرم بر نتایج آبستنی میش‌های تلقیح شده معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

میزان آبستنی در میش‌های جوان تا سن ۲۰ ماهه، بالاتر از میش‌هایی بود که بیش از ۳۰ ماه سن داشتند (به‌ترتیب ٥٢ و ٤٠). همچنین در هنگام تلقیح مصنوعی تعداد ٥ راس میش دارای ترشحات بودند که پس از تلقیح، ۱ راس از آنها آبستن شد. میزان آبستنی میش‌هایی که بدون ترشحات چرکی در واژن یا سرویکس بودند معادل ٥١/٤ درصد بود.

---

[1] Probe
[2] Lubricant gely
[3] Land mark

بحث

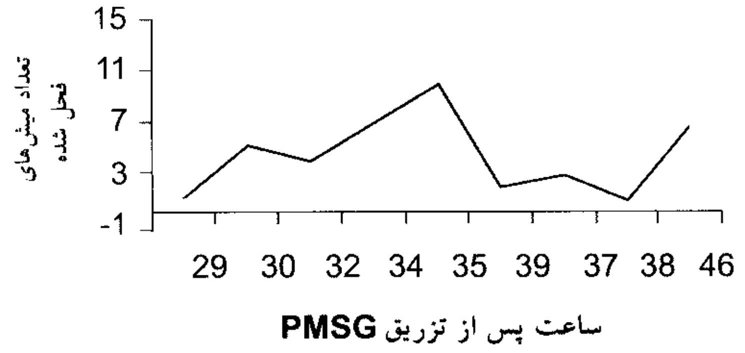
هالبرت و همکاران (۱۹۹۰) گزارش نمودن که تعداد چین‌های سرویکس میش‌های آزمایش در کانادا بین ۳ تا ۷ عدد می‌باشد. در این آزمایش نشان داده شد که با بکارگیری پیپت مخصوص تلقیح مصنوعی که نوک آن کمی خمیده باشد، امکان عبور از چین‌های سرویکس میش‌های نژاد شال فراهم می‌شود. علت تلقیح در چین‌های متفاوت سرویکس در این آزمایش، عدم اجازه یکنواخت میش‌ها به عبور پیپت از سرویکس بود. چین‌های انتهایی سرویکس و بدنه رحم بسیار نزدیک به یکدیگر بوده، در نتیجه پس از عبور پیپت از چین‌های سرویکس، نتایج آبستنی برای انتهای سرویکس و ابتدای رحم یکجا گزارش شد. گزارش‌های محققین مشکل عبور پیپت تلقیح مصنوعی از چین‌های سرویکس را به ساختار ویژه سرویکس و همچنین ارتباط آن با میزان بسته بودن سرویکس، بویژه در فصل غیر تولید مثلی می‌دانند (گردون، ۱۹۹۰؛ اکالاگان، ۱۹۸۹).

میزان عدم بازگشت به فحلی میش‌های تلقیح شده، صد در صد بود، اما دلایل پایین‌تر بودن نتایج بره‌زایی در این آزمایش ٤۷/۵ درصد بود. در مقایسه با گزارش‌های محققین دیگر (گردون، ۱۹۹۰؛ ماکسول و سالامون، ۱۹۹۳) و بویژه معرفی کننده روش عبور پیپت از چین‌های سرویکس از کشور کانادا (باکرل و والتون، ۱۹۹٤) که بترتیب ۷۵، ٦۸ و ۷۰ درصد بره‌زایی بطور نسبی بود می‌توان به خارج از فصل بودن زمان تلقیح مصنوعی، عدم عبور کامل پیپت از چین‌های سرویکس در این آزمایش و به عبارت دیگر باز نشدن کامل مجرای سرویکس نسبت داد. همچنین احتمال دارد تفاوت نتایج درصد عدم بازگشت میش‌ها به فحلی و میزان بره‌زایی را بتوان به افزایش مرگ و میرجنینی در دوران اولیه بارداری[1] که در این آزمایش همزمان با شروع فصل تابستان بود، نسبت داد (میشل و همکاران، ۱۹۹٦).

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تأثیر روش‌های تلقیح مصنوعی سرویکال و رحمی بر نتایج آبستنی میش‌های شال معنی‌دار نبود ($P > ۰/۰۵$).

جدول ۱ـ نتایج آبستنی میش‌های مورد آزمایش پس از تلقیح مصنوعی.

میش‌ها و روش آزمایش	روش سرویکال	روش رحمی
تعداد میش‌های تلقیح شده	۲۱	۱۹
تعداد میش‌های آبستن شده	۹	۱۰
درصد آبستنی میش‌ها	٤۲/۵	۵۲/۵



شکل ۱- ارتباط بین تزریق PMSG و فراوانی فحلی میش‌ها.

---

[1] Early embryonic mortality

منابع

1.Ahangari, Y.J. 1997. A comparison between tris and milk diluent for liquid storage of ram semen in Iran. Proc. Of the Brit. Soc. Of Anim. Sci., UK.

2.Buckrell, B.C., and Walton, J.S. 1994. Further development of a technique for transcervical insemination in sheep using previously frozen semen. Theriogenology. 42: 601-611.

3.Evans, G. 1988. Current topics in artificial insemination of sheep. Aust. J. Biol. Sci., 41:103-116.

4.Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goat, Butterworths.

5.Gillan, L., Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1997. The capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. 9, 481-487.

6.Gordon, I. 1999. Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International. UK.

7.Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., and Buckrell, B.C. 1990. The structure of the cervical canal of the ewe. Theriogenology. 33(5): 977-995.

8.Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., and Buckrell, B.C. 1990. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. Theriogenology. 33(5): 993-1010.

9.Lightfoot, R.J., and Salamon, S. 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of ewes. J. Reprod. Fertil. 22:339-408.

10.Maxweel, W.M.C., and Salamon, S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. Reprod. Fertil. Dev. 5:613-638.

11.Maxwell, W.M.C., Landers, A.J. and Evans, G. 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellet, straws and minitubes. Theriogenology. 43: 1201-1210.

12.Mitchell, L.M., King, M.E., and Wallace, J.M. 1996. Effect of mating season and body condition on ovulation, fertilization and pregnancy rates in crossbred ewes. Theriogenology. 45:293.

13.O'Callaghan, D. 1989. Controlled breeding in sheep. Irish Vet. News/ June:17-26.

14.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C., 1995. Frozen storage of ram semen. I. proccessing freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Reprod. Sci. 37:185-249.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(3), Aug - Sep 2005
www.magiran.com/jasnr

Comparison of methods of cervical and uterine artificial insemination of Shall ewes on pregnancy rate in non-breeding season

Y.J. Ahangari[1], F. Gharagozloo[2] and A. Javan[2]
[1]Dept. of Animal Sci., Gorgan University of Agriculture Science and Natural Research, Gorgan, Iran.
[2]College of veterinary, Tehran University.

Abstract

Forty Shall breed of 2-4 years old ewes were selected in Research Centre of Faculty of Veterinary, University of Tehran. In spring, estrus synchronization of ewes were carried out using CIDR containing progestrone hormone for a period of 12 days with an intramuscularly injection of PMSG after its removal from vagina. Semen samples was collected from five Shall breed of rams using an artificial vagina. Suitable semen samples were pooled and diluted with sterilized and homogenized cow milk at 30^{oC}. Straws were filled with 0.2 ml of diluted semen and stored at 18^{oC} for 4 hours until use. Concentration of diluted semen was measured by haemocytometry method. Estrus synchronized ewes detected by a teasere ram and divided into two groups for cervical and uterine insemination. After 50 hours of PMSG injection, artificial insemination was carrid out by placing a vaginoscope into vagina, fixing the cervix by a forceps, forcing a bented-tip pipette, specially designed to pass the cervical folds through cervical lumen. Pipette was pushed forward by gentle rotation as far as possible and semen was injected either in cervical folds or in uterine body. Non-return and pregnancy rates of ewes were measured after 16-17 and 30 days of artificial insemination. All ewes were synchronized and non-return rates of inseminated ewas was 100%. Mean pregnancy rate of inseminated ewas was 47.5%, for young and aged ewas 52 and 43% respectively. Mean pregnancy percentages of ewas inseminated cervically were 42.5 and 52.5 for uterine insemination. The Results showed that effect of place of injection of semen on ewas pregnancy rates was not significant (P>0.05).

Keywords: Ewe artificial insemination; Shall breed