

بررسی اثر غلظت های مختلف زرده تخم مرغ رقیق کننده تریس بر روی تحرک اسپرم بزهای کرکی

*محمدعلی تولایی^۱، یوسف جعفری آهنگری^۱، سعید حسنی^۱ و محمد نوروزی^۲

^۱گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام خراسان

تاریخ دریافت: ۸۲/۴/۸؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۵/۲۱

چکیده

اثرات غلظت‌های مختلف (۱/۵، ۲/۵، ۴ و ۶ درصد) زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده تریس در شرایط خارج‌سازی پلاسمای منی بر روی درصد تحرک اسپرم بزهای کرکی ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند عباس آباد (واقع در جنوب خراسان) در حالت نگهداری آن به صورت مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. از ۵ بز نر به روش الکتریکی منی اخذ و بلافاصله پلاسمای منی به روش سانتریفیوژ جدا گردید. سپس منی فاقد پلازما به نسبت ۱ به ۲ با رقیق‌کننده تریس در قالب ۴ تیمار (T1، T2، T3 و T4) به ترتیب حاوی ۱/۵، ۲/۵، ۴ و ۶ درصد زرده تخم مرغ رقیق گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. درصد تحرک اسپرم در تیمارهای ۱ تا ۴ به ترتیب ۸۹/۰۷، ۸۴/۹۹، ۷۵/۰۶ و ۶۶/۰۱ بود. بیشترین و کمترین درصد تحرک به ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۶ درصد بدست آمد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با افزایش غلظت زرده تخم مرغ، تحرک اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.001$). بنابراین برای نگهداری اسپرم بز کرکی به صورت مایع پس از خارج‌سازی پلاسمای منی، استفاده از غلظت زرده تخم مرغ به میزان ۱/۵ درصد در رقیق‌کننده تریس، پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تحرک اسپرم، زرده تخم مرغ، تریس، پلاسمای منی و بز کرکی

مقدمه

مایع و منجمد استفاده شده است (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰).

کاهش درجه حرارت و به‌عبارت دیگر شوک سرمایی وارده به اسپرم منجر به کاهش فعالیت، حرکت و فعالیت متابولیکی اسپرم می‌شود (بلاک شاو و همکاران، ۱۹۵۷؛ لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین شوک سرمایی منجر به افزایش نفوذ پذیری اسپرم‌ها نسبت به آلودگی‌ها، یون‌ها، کلسیم و آنزیم‌ها می‌شود (هامر استد و همکاران،

بز کرکی نژاد کشمیر در استان‌های سیستان و بلوچستان و خراسان پراکنده بوده که مرکز پرورش آن در جنوب خراسان واقع می‌باشد. با توجه به سازگاری این نژاد به مراتع خشک جنوب خراسان و تولید کرک مرغوب با قطر حدود ۱۶ میکرون و همچنین تولید گوشت به‌عنوان یک نژاد دو منظوره کرکی - گوشتی در منطقه شناخته شده است (رشیدی، ۱۳۷۸). به‌منظور کاربرد تکنیک تلقیح مصنوعی بز، رقیق‌کننده‌های مختلفی برای افزایش حجم منی بز نر جهت نگهداری در شرایط

تحرك بیشتری را در منی شسته شده نسبت به منی شسته نشده گزارش کردند.

سالامون و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که غلظت زرده تخم مرغ در بافر تریس برای رقیق سازی منی بز نباید از ۲/۵ درصد تجاوز کند. این در حالی است که غلظت زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس مربوط به قوچ بین ۱۴ تا ۲۰ درصد است. کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) در تحقیقی بین غلظت های ۱ تا ۱۰ درصد زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس برای منی شسته شده بز، غلظت ۲ درصد را، بهترین سطح زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس معرفی کردند.

ایوانس و همکاران (۱۹۸۷) برای رفع مشکل پلاسمای منی بز خارج سازی پلاسمای منی، کاهش درصد زرده تخم مرغ و استفاده از رقیق کننده های فاقد زرده تخم مرغ مانند شیر را پیشنهاد کردند. ریتار و همکاران (۱۹۹۱) استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم مرغ در بافر تریس را برای نگهداری منی بز آنقوره توصیه نمودند.

هدف از این مطالعه یافتن غلظت بهینه زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس در شرایط خارج سازی پلاسمای منی و بررسی تأثیر آن بر روی درصد اسپرم متحرک در حالت نگهداری منی بز کرکی به صورت مایع بود.

مواد و روش ها

این تحقیق در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند عباس آباد استان خراسان واقع در کیلومتر ۳۰ جاده مشهد - سرخس بین ماه های مهر تا دی سال ۱۳۸۱ انجام شد. از ۵ رأس بز نر ۲ ساله نژاد کرکی به وزن 48 ± 3 کیلوگرم موجود در ایستگاه اسپرم گیری به وسیله دستگاه شوک الکتریکی مدل UA 421, Imv, France انجام شد. برای اسپرم گیری ابتدا بز نر مقید شده و سپس میله پلاستیکی حامل الکتروود با ژل استریل لوبریکانت آغشته و از طریق مقعد وارد راست روده حیوان گردید. ولتاژ مورد نیاز برای تحریک جهت انزال حداکثر ۱۲ ولت بود (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹). منی اخذ شده، پس از

۱۹۷۸؛ هینکوسکا- گالچوا و همکاران، ۱۹۸۸؛ لبوئوف و همکاران، ۱۹۹۱ و مازور، ۱۹۷۰). سلول اسپرماتوزوآ در نبود ترکیبات محافظت کننده مانند زرده تخم مرغ، به شوک سرمایی دچار می شود (هینکوسکا- گالچوا و همکاران، ۱۹۸۸). تأثیر مخرب پلاسمای منی بز بر قابلیت زنده ماندن و تحرك اسپرماتوزوآ در رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ مشکل به خصوص در نگهداری منی بز بوده است و این تأثیر به آنزیمی نسبت داده شده که منشاء آن از ترشحات غده پیازی پیشابراهی^۱ در پلاسمای منی بوده و آنزیم منعقد کننده زرده تخم مرغ^۲ نامیده می شود. این آنزیم به عنوان یک فسفولیپاز A شناسایی گردیده که لستین زرده تخم مرغ را به اسیدهای چرب و لیزولستین هیدرولیز می کند (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). جزء اخیر، لیزولستین، برای اسپرماتوزوآی بز سمی است (لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰). آنزیم *EYCE* بر پیوند استر با گروه های آسیل فسفولیپید زرده تخم مرغ عمل می کند تا اسیدهای چرب اشباع، اسید پالمیتیک و اسید استئاریک، و غیر اشباع، اسید اولئیک و اسید لینولئیک، را آزاد سازد که به کاهش ناگهانی pH تا حد ۶ منجر می شود (آمواه و همکاران، ۱۹۹۷). از این رو توصیه شده است که پلاسمای منی در بز باید تا حد امکان خارج گردد و اینکار با شستن اسپرمها بلافاصله بعد از جمع آوری منی صورت می گیرد (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹). همچنین بخاطر تأثیر زیان بار پلاسمای منی بز بر بقاء و تحرك اسپرماتوزوآ در رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ توصیه می شود که میزان زرده تخم مرغ در این رقیق کننده ها نسبت به رقیق کننده های منی قوچ باید کمتر باشد (ایوانس و همکاران، ۱۹۸۷؛ لبوئوف و همکاران، ۲۰۰۰).

ایوانس و همکاران (۱۹۸۰) در بررسی تأثیر خارج سازی پلاسمای منی بز بر روی درصد تحرك اسپرم در رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ، درصد اسپرم

نشده را روی یک لام گرم شده قرار داده و حرکت موجی اسپرم‌ها با بزرگنمایی $10\times$ مورد ارزیابی قرار گرفت، به طوری که اسپرم‌های فاقد حرکت موجی، امتیاز صفر و اسپرم‌های دارای حرکت موجی شدید، امتیاز ۵ را دریافت می‌کنند. امتیاز دهی بین این دو دامنه بستگی به شدت حرکت موجی اسپرم‌ها دارد. درصد تحرک اسپرم بین صفر تا ۱۰۰ امتیاز داده می‌شود (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹).

نمونه‌ها برای خارج‌سازی پلاسمای منی به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول رینگری که در حمام بن ماری ۳۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود رقیق شدند. سپس این نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در $1000\times g$ سانتریفوژ شدند (قزوینیان و همکاران، ۱۳۷۹).

رقیق‌کننده تریس، مورد استفاده در آزمایش همراه با نمونه‌های منی در حمام بن ماری ۳۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا اختلاف دمایی با منی نداشته باشند. نمونه‌های رقیق شده از حمام بن ماری به داخل یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند و دمای آنها در عرض ۱/۵ ساعت به ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. دمای اسپرم در این درجه حفظ گردید تا از نمونه‌ها ارزیابی به عمل آید. جهت ارزیابی، گسترشی از هر نمونه بر روی لامل تهیه و با بزرگنمایی $40\times$ در زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

ارزیابی اولیه از نظر درصد اسپرم زنده و فعال و حرکت موجی بالاتر از ۳، مخلوط شده و سپس به دو گروه تقسیم گردید. برای خارج‌سازی پلاسمای منی نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۲۰ با محلول رینگری و دو بار به مدت ۱۰ دقیقه در $1000\times g$ سانتریفوژ گردید. رقیق‌سازی اسپرم با رقیق‌کننده‌های آزمایش بلافاصله پس از پایان سانتریفوژ، انجام شد. ترکیب رقیق‌کننده تریس بجز در مورد زرده تخم‌مرغ برای تمام تیمارهای آزمایشی مشابه بود (جدول ۱).

۴ سطح مختلف زرده تخم‌مرغ ۱/۵، ۲/۵، ۴ و ۶ درصد در رقیق‌کننده تریس بکار برده شد و سپس نمونه‌ها به صورت مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار داده شدند تا ۶ ساعت بعد از نگهداری، از لحاظ درصد تحرک اسپرماتوزوآ مورد ارزیابی قرار گیرند.

به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوآ، یک قطره اسپرم و یک قطره سرم نمکی ۰/۹ درصد بر روی لام از پیش گرم شده (۳۷ درجه سانتی‌گراد)، قرار داده شد. سپس روی آن لامل قرار داده شد تا نمونه به طور یکنواخت گسترش یابد. با مشاهده مستقیم و شمارش سلول‌های اسپرماتوزوآی دارای حرکت مستقیم جلو رونده در میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40\times$ درصد تحرک اسپرم تعیین گردید (ایوانس و همکاران، ۱۹۸۷). به منظور تعیین حرکت موجی اسپرماتوزوآ یک قطره از نمونه منی گرفته شده و رقیق

جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده‌های آزمایش

ترکیب رقیق‌کننده‌ها	رقیق‌کننده ۱	رقیق‌کننده ۲	رقیق‌کننده ۳	رقیق‌کننده ۴
تریس (g)	۳/۶۳۴	۳/۶۳۴	۳/۶۳۴	۳/۶۳۴
فروکتوز (g)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
اسید سیتریک (g)	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹
پنی سیلین G (۳۰۰۰۰ IU) استرپتومایسن (۳ g)	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
زرده تخم‌مرغ (ml)	۱/۵	۲/۵	۴	۶
آب مقطر تا حجم (ml)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

این تحقیق شامل ۲۰ واحد آزمایشی، حاصل ۴ تیمار با ۵ تکرار بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (سلطانی، ۱۳۷۷). داده‌های حاصل از هر مرحله از آزمایش مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها در صورت معنی‌دار بودن اثرات تیمارهای آزمایشی، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. به دلیل درصدی بودن داده‌ها، از تبدیل زاویه‌ای به صورت زیر استفاده شد (گیل، ۱۹۸۷).

$$Y \text{ (DEG)} = \text{Arc sin} ((x/100) ^ 0.5$$

نتایج و بحث

نتایج حاصل در جدول ۲ نشان داد که تفاوت اثر سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس در حالت خارج‌سازی پلاسمای منی، در شرایط نگهداری به صورت مایع بر روی درصد تحرک اسپرم معنی‌دار بود ($p < 0.05$). مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد این اختلاف را نشان می‌دهد (جدول ۳). بیشترین درصد اسپرم‌های متحرک در غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ و کمترین درصد اسپرم‌های متحرک در غلظت ۶ درصد زرده تخم‌مرغ مشاهده گردید (جدول ۳). بدین ترتیب که با افزایش درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس، درصد تحرک اسپرم بز کرکی کاهش یافت.

نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج گزارش شده توسط ایوانس و همکاران (۱۹۸۷ و ۱۹۸۰)، ریتار و همکاران (۱۹۹۱)، کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) و سالامون و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت. ایوانس و همکاران (۱۹۸۷ و ۱۹۸۰) برای رقیق‌سازی منی بز از بین غلظت‌های متفاوت زرده تخم‌مرغ، غلظت‌های کمتر از ۳ درصد را همراه با خارج‌سازی پلاسمای منی پیشنهاد کردند. ریتار و همکاران (۱۹۹۱) نیز استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ را به‌عنوان غلظت بهینه معرفی کردند. کورتیل و همکاران (۱۹۷۸) در تحقیقی بین غلظت‌های ۱ تا ۱۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس برای منی شسته شده بز، غلظت ۲ درصد را، بهترین سطح زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس معرفی کردند و سالامون و همکاران (۲۰۰۰) بیان داشتند که غلظت زرده تخم‌مرغ در بافر تریس برای رقیق‌سازی منی بز نباید از ۲/۵ درصد تجاوز کند.

علی‌رغم کاربرد تکنیک خارج‌سازی پلاسمای منی به دلیل عدم خارج‌سازی کامل، مقداری از عوامل مخرب در نمونه سانتریفیوژ شده باقی مانده که در حضور سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ تأثیر متفاوتی بر اسپرماتوزوآ خواهد گذاشت (ریتار و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به نتایج بدست آمده در شرایط انجام این آزمایش، شستشوی اسپرم به‌منظور خارج‌سازی پلاسمای منی و سپس استفاده از غلظت ۱/۵ درصد زرده تخم‌مرغ در بافر تریس برای رقیق‌سازی جهت نگهداری منی بز کرکی به صورت مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ضروری می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس با درصدهای مختلف زرده تخم‌مرغ در نگهداری منی به صورت مایع

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ	۳	۸۰۳/۳۰	۲۶۷/۷۶ **
خطا	۱۶	۴۴/۷۵	۲/۷۹

** معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0.001$.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد اسپرماتوزوای متحرک در رقیق‌کننده تریس در شرایط نگهداری به صورت مایع در سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ

سطوح مختلف زرده تخم‌مرغ	میانگین داده‌های تبدیل شده	میانگین داده‌ها به درصد
۱/۵	۷۰/۶۹ (۰/۷۴) ^a	۸۹/۰۷ (۰/۷۴) ^a
۲/۵	۶۷/۲۱ (۰/۷۴) ^b	۸۴/۹۹ (۰/۷۴) ^b
۴	۶۰/۰۴ (۰/۷۴) ^c	۷۵/۰۶ (۰/۷۴) ^c
۶	۵۴/۳۴ (۰/۷۴) ^d	۶۶/۰۱ (۰/۷۴) ^d

منابع

۱. رشیدی، ا. ۱۳۷۸. پرورش صنعتی دام‌های کوچک (گوسفند و بز)، رکوردگیری و ثبت مشخصات. مؤسسه فرهنگی هنری شقایق روستا، تهران.
۲. سلطانی، ا. ۱۳۷۷. کاربرد نرم افزار SAS در تجزیه‌های آماری (برای رشته‌های کشاورزی). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۶۷ صفحه.
۳. قزوینیان، خ.، و جواهری وایقان، ع. ۱۳۷۹. فیزیولوژی تولید مثل و تلقیح مصنوعی کاربردی در گوسفند و بز (ترجمه). انتشارات دانشگاه سمنان. ۲۷۳ صفحه.
4. Amoah, E.A., and Gelaye, S. 1997. Biotechnological advances in goat reproduction. J. Anim. Sci. 75: 578- 585.
5. Blackshaw, A.W., and Salisbury, G.W. 1957. Factors influencing Metabolic activity of bull spermatozoa II: Cold-shock and its Prevention. J. Dairy. Sci. 40: 1099-1106.
6. Corteel, J.M., and Marcellier, N. 1978. Production, storage, and artificial insemination of goat semen: In: Gall, C.(Ed), Goat production. Academic press, London, pp. 171- 191.
7. Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworth's Co. Ltd. P: 523.
8. Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1980. Effect of seminal plasma removal on viability, motility and fertility of goat spermatozoa.
9. Gill, J.L. 1987. Design and analysis of experiment in the animal and medical science. 2: 320- 321.
10. Hammer Stedt, R.H., Keith, A.D., Snipes, W., Amman, R.P., Arruda, D., and Griel, L.C. 1978. Use of spin labels to evaluate effect of cold shock and osmolality on sperm. J. Biol. Reprod. 18: 686- 696.
11. Hinkovska- Galcheva, V., Peeva, Momchilova- Ppankova, A., Petkova, D., and Koumanov, K. 1988. Phosphatidylecholin and phosphatidylethanolamin derivatives, membrane fluidity and changes in the lipolytic activity of ram spermatozoa plasma membranes during cryopreservation. Int. J. Bioch. 20:867-871.
12. Leboeuf, B. 1991. Effect of different diluents on viability of goat spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 18: 209- 220.
13. Leboeuf, B., Restall, B., and Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. J. Anim. Reprod. Sci., 62: 113- 142.
14. Mazur, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological system. Science. N. Y. 166: 939.
15. Ritar, A.J., and Salamon, S. 1991. Semen processing in goats. Sept. J. Biol. Sci., 35: 305- 312.
16. Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. J. Anim. Reprod. Sci., 62: 77- 111.

Effect of different concentrations of egg yolk in tris diluent on spermatozoa motility of Cashmere goats

M.A. Tavallaee¹, Y.J. Ahangari¹, S. Hasani¹ and M. Nowrozi²

¹Department of Animal Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, ²Khorasan Research Center of Natural Resources and Livestock Affairs

Abstract

Effects of various concentrations of egg-yolk of 1.5, 2.5, 4 and 6% in tris diluent on the motility percentage of South Khorasan Cashmere goat's spermatozoa, after removing seminal plasma, in liquid storage at 4°C were studied in sheep breeding center of Abbas-abbad, Khorasan. Semen samples from five cashmere bucks were collected by an electro-ejaculator and centrifuged for seminal plasma removal. Washed semen samples were then extended in four diluents of tris buffers containing 1.5, 2.5, 4 and 6% egg-yolk, at a ratio of one part semen to two parts diluent. This experiment was carried out in a completely randomized design with 5 replications. The motility percentage of spermatozoa was 89.07, 84.99, 75.06 and, 66.01 in tris buffers containing 1.5, 2.5, 4 and, 6% egg-yolk, respectively. The motility percentage was highest in 1.5% and lowest in 6% egg-yolk concentration. The results show a significant decrease in sperm motility by increasing the egg-yolk in tris buffer ($P < 0.001$). Therefore, using egg-yolk concentration of 1.5% in tris diluent after the removal of seminal plasma is recommended for liquid storage of Cashmere goat semen.

Keywords: Spermatozoa motility; Egg-yolk; Tris; Seminal plasma; Cashmere goats