نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد پنجم، شماره سوم، ۱۳۹٦
http://ejrr.gau.ac.ir

اثرات رقیق‌کننده‌های مختلف و سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر کیفیت منی قوچ دالاق در شرایط انجماد

*آیدین آخوندی[۱]، یوسف مصطفی‌لو[۲]، آشور محمد قره‌باش[۲] و رضا راه‌چمنی[۲]

[۱]فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد و [۲]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ دریافت: ۹٦/۱/٤؛ تاریخ پذیرش: ۹٦/۳/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: در تلقیح مصنوعی حیوانات مزرعه‌ای معمولاً از اسپرم منجمد استفاده می‌شود. یکی از روش‌های مهم جهت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی انجماد اسپرم است که به‌عنوان یکی از روش های کمک باروری می تواند سبب حفظ کیفیت اسپرم شود. از ابتدای به‌کارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده‌های مختلفی جهت حفظ و نگهداری منی در شرایط مایع و منجمد استفاده شده است. ترکیب و ماهیت رقیق‌کننده‌ها از اهمیت زیادی در زنده‌مانی اسپرم برخوردارند. بدین منظور هدف از این پژوهش بررسی اثرات رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تریس-زرده تخم بوقلمون و سطوح مختلف قند تره‌هالوز (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) بر کیفیت منی قوچ دالاق پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نمونه‌های منی از چهار رأس قوچ دالاق ۲ تا ۳ ساله با استفاده از مهبل مصنوعی جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌ها در رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق‌سازی شدند و تیمارهای مختلف قند تره‌هالوز را دریافت نمودند. نمونه‌های منی وارد پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری شدند و به‌مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد خنک شدند و سپس در نیتروژون مایع منجمد گردیدند. پایوت‌های منجمد شده برای ذخیره‌سازی به تانک حاوی ازت منتقل شدند. پس از یخ‌گشایی فراسنجه‌های کیفی اسپرماتوزوآ شامل درصد تحرک اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×٤ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف قند تره‌هالوز (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) و رقیق‌کننده‌های مختلف (شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تریس- زرده تخم بوقلمون) بودند. داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (مدل ۹/۱) با رویه ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱ درصد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد تحرک اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیشترین تحرک اسپرم (۱/۵۹±٤۲/۳۳ درصد)، زنده‌مانی (۱/٦۱±٦۸/۷۳ درصد)، سلامت غشاء (۱/۳۵±٦٦/۰٦ درصد) و اسپرم طبیعی (۱/۲۵±۷۹/٦٦ درصد) در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز به‌دست آمد. تأثیر رقیق‌کننده‌ها نیز بر درصد تحرک اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیشترین تحرک اسپرم (۱/۳۸±٤۲/۵۰ درصد)، زنده‌مانی (۱/۳۹±۷۱/۲۵ درصد)، سلامت غشاء (۱/۱۷±۵۳/۳۰ درصد) و اسپرم طبیعی (۱/۰۸±۷۳/۸۵ درصد) در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون به‌دست آمد.

*مسئول مکاتبه: aidin6925@yahoo.com

نتیجه‌گیری: بطور کلی، با در نظر گرفتن همه شاخص‌های ارزیابی شده در رقیق‌سازی منی قوچ دالاق، افـزودن ۱۲۰ میلـی‌مـولار قند ترهالوز در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون پاسخ بهتری نسبت به دیگر تیمارها پس از فرآیند انجماد- یخ گشایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انجماد، تره‌هالوز، رقیق‌کننده، منی، قوچ دالاق

مقدمه

پرورش حیوانات اهلی در دنیا در چند دهه اخیر با سرعت چشمگیری پیشرفت نموده است و دام‌های مختلف بر حسب طبیعت زندگی‌شان به‌منظور تولید بیشتر بهبود یافته‌اند. پیشرفت سرعت اصلاح ژنتیکی حیوانات اهلی به‌طور مستقیم به میزان زاد و ولد آن‌ها وابسته است، به‌طوری که هر چقدر دام‌ها نتاج بیشتری به وجود بیاورند، پیشرفت سرعت اصلاح ژنتیکی آن‌ها نیز بیشتر خواهد بود. به‌دلیل پایین بودن زاد و ولد گاو و گوسفند در مدت معین نسبت به طیور، پیشرفت سرعت اصلاح ژنتیکی آن‌ها کمتر از طیور می‌باشد. در این راستا تلقیح مصنوعی ابزار مؤثری در پیشبرد و موفقیت صنعت دامپروری می‌باشد (۵).

تلقیح مصنوعی یکی از روش‌های کمک باروری برای بهبود پتانسیل ژنتیکی از طریق استفاده از اسپرم نژادهای برتر می‌باشد. در تلقیح مصنوعی حیوانات مزرعه‌ای، معمولا از اسپرم منجمد استفاده می‌شود. انجماد اسپرم به‌عنوان یکی از روش‌های کمک باروری به حفظ کیفیت اسپرم کمک می‌کند (۲۹). از ابتدای به‌کارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده‌های مختلفی جهت حفظ و نگهداری منی در شرایط مایع و منجمد استفاده شده است. ترکیب و ماهیت رقیق‌کننده‌ها از اهمیت زیادی در زنده‌مانی اسپرم برخوردارند (۹، ۱٦ و ۲۸). محققین استرالیایی پس از مقایسه تعدادی از رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم‌مرغ را برای نگهداری در شرایط مایع و اضافه کردن پنج درصد گلیسرول به بافر تریس را برای نگهداری در شرایط انجماد پیشنهاد نمودند (۲۸).

برای حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض آن‌ها بخشی از تحقیقات در زمینه روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص می‌یابد. بنابراین می‌توان با بهبود روش‌های نگهداری اسپرم در جهت نیل به این اهداف تأثیرگذار بود. یکی از روش‌های مهم جهت حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی، انجماد اسپرم است. ذخیره و نگهداری مناسب اسپرم در دوره‌های طولانی‌تر، انتقال موفقیت‌آمیز اسپرم را از مناطق دورتر تسهیل می‌کند و گسترش استفاده از ذخایر ژنتیکی بهتر را امکان‌پذیر می‌سازد. اسپرم در طی نگهداری در شرایط سرمایی با کاهش خواص حیاتی خود مثل تحرک و باروری روبرو می‌شود که این امر می‌تواند یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی باشد (۲۸). باروری اسپرم نگهداری شده در دماهای پایین نصف باروری اسپرم تازه می‌باشد (۸). آسیب‌های ساختاری و غیرساختاری غشاء به‌علت نگهداری سرمایی، نقص‌های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن آکروزوم و دیگر تغییرات نامطلوب در طی کاهش دما می‌توانند از عوامل عمده پایین‌تر بودن باروری اسپرم نگهداری شده در دماهای پایین باشند (۵).

فرآیند انجماد- ذوب موجب آسیب‌هایی مثل شوک سرمایی، تنش اسمزی، تشکیل کریستال‌های یخ و تنش اکسیداتیو شده که در نهایت موجب آسیب انجمادی و از دست دادن قابلیت زیست و باروری اسپرم می‌شود (۱۳). از دلایل اصلی کاهش کیفیت اسپرم تشکیل کریستال یخ در داخل سلول در حین انجماد می‌باشد که هنگام استفاده از یک رقیق‌کننده ایزوتونیک که با قندهای نفوذناپذیر غنی‌سازی شده به حداقل می‌رسد (۵). برای کاهش اثرات زیان‌آور گلیسرول در منی قوچ می‌توان از ترکیب گلیسرول با قند و افزایش فشار اسمزی رقیق‌کننده استفاده کرد (۳۰).

گلیسرول با قندهایی مانند تره‌هالوز و رافینوز اثر سینرژیسم دارد (۱). رقیق‌کننده‌های مکمل با قندهای ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز تمایل زیادی برای محافظت از سلول‌های اسپرم در برابر آسیب‌های انجماد دارند و با ایجاد یک فشار اسمزی و خروج آب از سلول قبل از انجماد باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی در طی فرآیند انجماد می‌شوند (۲۰). این قندها با فسفولیپیدهای غشاء پلاسمایی تعامل داشته و باعث افزایش سیالیت غشاء اسپرم می‌شوند و بقای اسپرم را در زمان انجماد افزایش می‌دهند (۱۳). قند تره‌هالوز دی‌ساکاریدی متشکل از دو واحد گلوکز و قندهای غیر احیا کننده می‌باشد که با غلظت بسیار زیاد در قارچ‌ها، مخمرها و برخی باکتری‌ها وجود دارد. بررسی محتوای مخمرها اثبات کرد که تره‌هالوز به‌عنوان یک محافظت‌کننده با کارآیی بالا و تقویت‌کننده مقاومت ترکیبات سلولی از قبیل غشاء پلاسمایی عمل می‌کند (۱۵).

در حال حاضر زرده تخم‌مرغ یک ترکیب متداول در رقیق‌کننده‌های منی حیوانات اهلی می‌باشد و نشان داده شده است که اثر مفیدی بر انجماد اسپرم به‌عنوان محافظ غشاء پلاسمایی و آکروزوم در برابر آسیب‌های مربوط به تغییر درجه حرارت دارد. فسفولیپیدها، کلسترول و لیپوپروتئین‌های با چگالی کم در زرده تخم‌مرغ ممکن است فاکتورهایی باشند که باعث حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی در فرآیند انجماد- ذوب باشند (۲). گزارش‌های متعددی وجود دارد که زرده تخم از گونه‌های مختلف پرندگان مانند اردک، بلدرچین، کبوتر یا مرغ دارای ترکیبات مختلفی از اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و کلسترول است که می‌تواند اثرات مختلفی در انجماد اسپرم داشته باشد (۷، ۲۳ و ۳۱).

از آنجایی که استفاده از ترکیبات مختلف به‌عنوان رقیق‌کننده اسپرم نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است، بنابراین هدف این تحقیق بررسی اثرات رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تریس- زرده تخم بوقلمون، بر کیفیت منی قوچ دالاق بود. همچنین اثرات افزودن سطوح مختلف قند تره‌هالوز (۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) بر کیفیت منی قوچ دالاق مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی هدف از این پژوهش بهبود کیفیت اسپرم قوچ دالاق با استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف و افزودن قند تره‌هالوز پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مایع منی: پژوهش حاضر در ایستگاه تحقیقاتی پرورش گوسفند دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس در پاییز و زمستان سال ۱۳۹٤ انجام گردید. برای انجام پژوهش از چهار رأس قوچ دالاق بالغ ۳-۲ ساله با وزن ۸۰-۷۵ کیلوگرم استفاده شد. قوچ‌ها با جیره کاملاً مخلوط از یونجه، کاه گندم، دانه ذرت و سبوس گندم دارای ۲/۳ مگاکالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵ درصد پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک تغذیه شدند (۲۵). قوچ‌ها با روش اسپرم‌گیری به وسیله مهبل مصنوعی عادت‌دهی شدند و از این طریق نمونه‌های منی دو بار در هفته جمع‌آوری گردید.

ارزیابی اولیه نمونه منی: نمونه‌های منی با مهبل مصنوعی، از قوچ‌های انتخاب شده جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌گیری لوله‌های جمع‌آوری منی برای جلوگیری از آسیب به اسپرم تا زمان انتقال به آزمایشگاه درون فلاسک عایق با آب دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. 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 می‌باشد که به‌منظور تعیین نمونه‌های مطلوب انجام می‌شد و در صورت مطلوب نبودن نمونه حذف می‌گردید. برای تعیین حجم منی از لوله‌های درجه‌بندی شده و برای تعیین غلظت از لام هموسیتومتر استفاده

شد. برای تعیین تحرک موجی یک قطره از نمونه منی رقیق نشده بر روی لام تمیز گرم قرار داده شد و تحرک موجی اسپرم از صفر تا ۵ امتیازبندی گردید (۱۰ و ۲۰). 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 شد و سپس یک قطره کوچک از نمونه رقیق شده بر روی لام تمیز گرم ریخته و یک لامل تمیز بر روی آن قرار داده شد و با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری در چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیشرونده داشتند، تعیین گردید (۲۰ و ۲۲). برای تعیین درصد اسپرم غیرطبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. حجم منی بین ۰/۵ تا ۲ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $۲/۵\times۱۰^{۹}$، تحرک بیش از ۷۰ درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر انزال به‌عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته می‌شد. پس از بررسی اولیه و اطمینان از مناسب بودن نمونه‌ها به‌منظور جلوگیری از اثرات فردی نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی مایع منی: رقیق‌کننده پایه تریس (252859، Sigma-Aldrich، USA) براساس جدول ۱ تهیه شد (۲۷). pH رقیق‌کننده پایه حدود ۷ و اسمولاریته ۳۲۰ میلی‌اسمز بود که به‌ترتیب با دستگاه pH متر و اسمومتر اندازه‌گیری شدند (۱). سپس رقیق‌کننده‌های مختلف تهیه شدند که شامل: ۱- شیر پاستوریزه و هموژنیزه کم‌چرب (۳، ۱۲و ۲۷). ۲- محیط پایه تریس حاوی ١٦ درصد (حجمی/ حجمی) زرده تخم‌مرغ و ۳- محیط پایه تریس حاوی ١٦ درصد زرده تخم بوقلمون بود (٢٦). در مرحله بعد هر کدام از رقیق‌کننده‌ها به چهار لوله آزمایش تقسیم شدند و سپس سطوح مختلف (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) قند تره‌هالوز (0167، Sigma-Aldrich، USA) به لوله‌های حاوی رقیق‌کننده‌ها اضافه شدند. نمونه‌های منی بعد از مخلوط شدن به سه قسمت مساوی تقسیم شدند 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 رقیق‌سازی پر کردن پایوت‌ها در محیط یخچال انجام گردید که به‌این منظور از پایوت ۰/۵ میلی‌لیتری استفاده شد که پر کردن آن‌ها به روش دستی و با استفاده از سرنگ انسولین صورت گرفت. به‌این ترتیب که انتهای باز پایوت در داخل لوله آزمایش حاوی منی رقیق شده قرار داده شد و با سرنگ به داخل پایوت کشیده شد. با رسیدن نمونه به انتهای سیمانی پایوت خود به خود، یک طرف آن بسته می‌شود و طرف دیگر آن به‌صورت دستی بسته شد. سپس پایوت‌ها به‌مدت ۱۵۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن‌ها به ٤ درجه سانتی‌گراد برسد. هدف از قرار دادن پایوت در یخچال سرد شدن تدریجی نمونه‌ها است که در این زمان اسپرم با محیط به تعادل می‌رسد و آب‌گیری سلول‌های اسپرم توسط ماده سرما محافظ (گلیسرول) انجام می‌شود.

انجماد پایوت‌ها و یخ‌گشایی: انجماد پایوت‌ها به روش دستی انجام گرفت. بعد از رسیدن به دمای تعادل، پایوت‌ها به فاصله ٤ سانتی‌متری بالای سطح بخار نیتروژن قرار گرفته و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. در نهایت پایوت‌های مربوط به هر گروه تیماری تا زمان یخ‌گشایی در مخزن تانک حاوی نیتروژن مایع نگهداری شدند. برای یخ‌گشایی پایوت‌ها به‌مدت ٤٥ ثانیه در حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا نمونه‌ها ذوب شوند و مورد ارزیابی قرار بگیرند.

ارزیابی نمونه‌ها پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

تحرک اسپرم: به‌منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوآ، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده از هر پایوت بر روی لام تمیز گرم شده قرار داده شد. سپس بر روی آن یک لامل تمیز گذاشته شد تا نمونه به‌طور یکنواخت زیر سطح لامل پخش شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به‌صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیشرونده داشتند، تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات به‌عنوان درصد تحرک اسپرم ثبت شد. (۱۰، ۲۰، ۲۲ و ۲۷).

زنده‌مانی اسپرم: برای اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده شد. برای ساخت رنگ، ۰/۸۵ گرم ائوزین، ۵ گرم نگروزین، ۱/٤٥ گرم سدیم سیترات آنیدرات را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و محلول به‌دست آمده 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 شد. برای رنگ‌آمیزی یک قطره منی رقیق شده 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 سپس لام در داخل انکوباتور گذاشته شد تا خشک شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به‌صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید زنده- مرده بودن حداقل ۲۰۰ اسپرم تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات به‌عنوان 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، قرمز رنگ دیده می‌شود. در صورت زنده بودن اسپرم، غشاء پلاسمایی دست نخورده و سالم بوده و مانع نفوذ رنگ به داخل سلول‌ها می‌شود و اسپرم سالم به‌صورت فاقد رنگ در زمینه تیره حاصل از رنگ نگروزین، قابل مشاهده خواهد بود (۱۰ و ۲۷).

یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم: برای بررسی سلامت غشاء اسپرم از محلول هاست مطابق با روش Revell و Mrode استفاده شد (۲۳). 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 محلول هاست اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل ۳ 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 ٤٠× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به‌صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم دارای غشاء یکپارچه محاسبه شد (٢٦).

ریخت‌شناسی اسپرم: برای ارزیابی اسپرم با مورفولوژی طبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل ٦٢/٥ 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 ٢١/٦٨٢ گرمی سدیم هیدروژن فسفات آنیدرات در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ٢٢/٢٥٤ گرم فسفات پتاسیم 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 ٤٠× میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به‌صورت تصادفی

در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ سلول اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم طبیعی محاسبه شد. اسپرم غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم در نظر گرفته شد (۱٤).

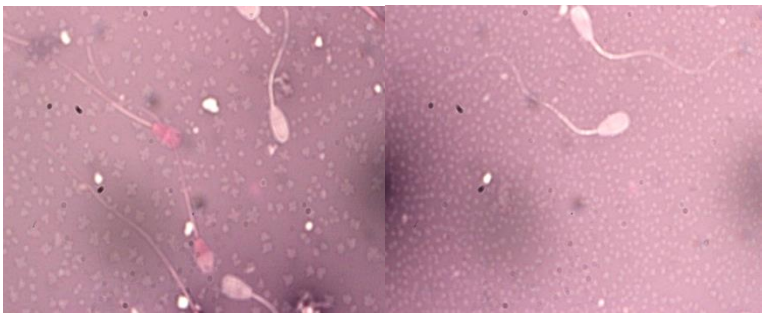
تجزیه و تحلیل آماری: طرح آماری آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×٤ می‌باشد. داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS[1] (مدل ۹/۱) و با رویه ANOVA[2] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱ درصد انجام شد. آزمایش به‌صورت ۵ تکرار در هر تیمار انجام گرفت. مدل آماری طرح به‌صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ijk=} \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

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

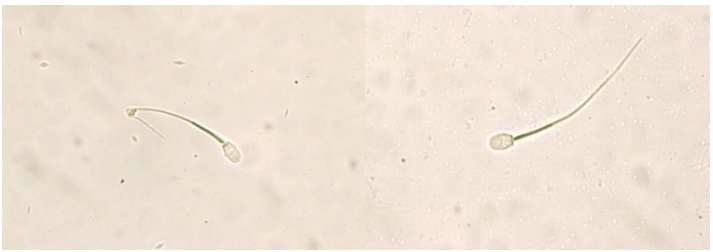
Table 1. Tris diluent composition for storage of ram semen in frozen condition.

اجزای رقیق‌کننده (diluent components)	در ۱۰۰ میلی‌لیتر (The 100 mL)
تریس (گرم) Tris (g)	3.876
فروکتوز (گرم) Fructose (g)	0.523
اسید سیتریک (گرم) Citric acid (g)	2.123
زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر) Chicken egg yolk (mL)	16
گلیسرول (میلی‌لیتر) Glycerol (mL)	5.3
پنی‌سیلین Penicillin (IU)	100000
استرپتومایسین (میلی‌گرم) Streptomycin (mg)	100
آب مقطر تا حجم (میلی‌لیتر) Distilled water to volume (mL)	100



تصویر ۱- اسپرم رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ (۱۰۰×).

Image 1. Stained sperm under the microscope.



تصویر ۲- اسپرم در محلول‌هاست در زیر میکروسکوپ (٤۰×).

Image 2. Sperm in Host solution under the microscope.

1- SAS, 1996. SAS/STAT Software
2- ANOVA (Analysis of variance)

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

Image 3. Sperm in Hancock solution under the microscope.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های اسپرم پس از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی

درصد اسپرم متحرک: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). در حالی‌که اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم متحرک در سطوح صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز به‌ترتیب ۳۸/۶۶، ۳۳/۳۳، ۳۴/۳۳، ۴۲/۳۳ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد تحرک اسپرم (۴۲/۳۳ درصد) در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز و کمترین درصد تحرک اسپرم (۳۳/۳۳ درصد) در سطح ۸۰ میلی‌مولار قند به‌دست آمد. میانگین درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون به ترتیب ۲۷/۲۵، ۴۱/۷۵، ۴۲/۵۰ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد تحرک اسپرم (۴۲/۵۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون و کمترین درصد تحرک اسپرم (۲۷/۲۵ درصد) در رقیق‌کننده شیر به‌دست آمد.

درصد اسپرم زنده: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). در حالی‌که اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم زنده در سطوح صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز به ترتیب ۶۲/۴۶، ۵۵/۴۶، ۵۹/۲۶، ۶۸/۷۳ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم (۶۸/۷۳ درصد) در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز و کمترین درصد زنده‌مانی اسپرم (۵۵/۴۶ درصد) در سطح ۸۰ میلی‌مولار قند به‌دست آمد. میانگین درصد اسپرم زنده در رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون به‌ترتیب ۴۳/۰۵، ۷۰/۱۵، ۷۱/۲۵ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم (۷۱/۲۵ درصد) در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون و کمترین درصد زنده‌مانی اسپرم (۴۳/۰۵ درصد) در رقیق‌کننده شیر به‌دست آمد.

درصد اسپرم با غشاء سالم: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد سلامت غشاء اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). در حالی‌که اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد سلامت غشاء اسپرم معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد سلامت غشاء در سطوح صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز به‌ترتیب ۵۰/۰۶، ۴۳/۳۳، ۴۴/۲۶، ۶۶/۰۶ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد سلامت غشاء (۶۶/۰۶ درصد) در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز و کمترین درصد سلامت غشاء (۴۳/۳۳ درصد) در سطح ۸۰ میلی‌مولار قند به‌دست آمد. میانگین درصد سلامت غشاء در رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون به‌ترتیب ۴۷/۲۵، ۵۲/۲۵، ۵۳/۳۰ درصد بودند (جدول ۲). بیشترین درصد سلامت غشاء (۵۳/۳۰ درصد)

در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون و کمترین درصد سلامت غشاء (٤٧/٢٥ درصد) در رقیق‌کننده شیر به‌دست آمد.

درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند ترهالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار بود (P<٠/٠١). در حالی‌که اثر متقابل سطوح مختلف قند ترهالوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). میانگین درصد اسپرم طبیعی در سطوح صفر، ٨٠، ١٠٠ و ١٢٠ میلی‌مولار قند ترهالوز به‌ترتیب ٧٣/٠٠، ٥٥/٨٦، ٧٧/٥٣، ٧٩/٦٦ درصد بودند (جدول ٢). بیشترین درصد اسپرم طبیعی (٧٩/٦٦ درصد) در سطح ١٢٠ میلی‌مولار قند ترهالوز و کمترین درصد اسپرم طبیعی (٥٥/٨٦ درصد) در سطح ٨٠ میلی‌مولار قند به‌دست آمد. میانگین درصد اسپرم زنده در رقیق‌کننده‌های شیر، تریس- زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون به‌ترتیب ٦٩/٣٠، ٧١/٤٠، ٧٣/٨٥ درصد بودند (جدول ٢). بیشترین درصد اسپرم طبیعی (٧٣/٨٥ درصد) در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون و کمترین درصد اسپرم طبیعی (٦٩/٣٠ درصد) در رقیق‌کننده شیر به‌دست آمد.

جدول ٢- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف قند ترهالوز و رقیق‌کننده‌های مختلف بر فراسنجه‌های اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی.

Table 2. Mean comparisons of different levels of sugar trehalose and different extenders on parameters of sperm after freezing and thawing.

درصد اسپرم طبیعی (Sperm normality) (%)	درصد سلامت غشاء (Membrane integrity) (%)	درصد زنده‌مانی (Viability) (%)	درصد تحرک (Motility) (%)	منابع تغییر (Sources Change)
				سطوح ترهالوز (میلی‌مولار) Trehalose levels (mM)
73.00^{b}	50.06^{b}	62.46^{b}	38.66^{b}	0
55.86^{c}	43.33^{c}	55.46^{c}	33.33^{c}	80
77.53^{a}	44.26^{c}	$59.26^{b,c}$	34.33^{c}	100
79.66^{a}	66.06^{a}	68.73^{a}	42.33^{a}	120
1.25	1.35	1.61	1.59	SE
0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	P value
				رقیق‌کننده‌ها (diluents)
69.30^{b}	47.25^{b}	43.05^{b}	27.25^{b}	شیر (Milk)
$71.40^{a,b}$	52.25^{a}	70.15^{a}	41.75^{a}	تریس- زرده تخم‌مرغ (Tris-chicken egg yolk)
73.85^{a}	53.30^{a}	71.25^{a}	42.50^{a}	تریس- زرده تخم‌بوقلمون (Tris-turkey egg yolk)
1.08	1.17	1.39	1.38	SE
0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	P value

a-c تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<٠/٠١).

(a-c difference between the numbers in each column, with dissimilar letters is significant) (P<0.01).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و رقیق‌کننده‌های مختلف بر فراسنجه‌های اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی.

Table 3. Mean comparisons interaction of different levels of sugar trehalose and different extenders on parameters of sperm after freezing and thawing.

درصد اسپرم طبیعی (Sperm normality) (%)	درصد سلامت غشاء (Membrane integrity) (%)	درصد زنده‌مانی (Viability) (%)	درصد تحرک (Motility) (%)	منابع تغییر (Sources Change)
70.00	40.00	45.20	27.00	تره‌هالوز صفر در شیر (Trehalose 0 in milk)
74.40	56.20	73.20	44.00	تره‌هالوز صفر در زرده تخم‌مرغ (Trehalose 0 in egg yolk)
74.60	54.40	69.00	45.00	رافینوز صفر در تخم بوقلمون (Trehalose 0 in Turkey egg yolk)
54.80	44.00	38.00	24.00	تره‌هالوز ۸۰ در شیر (Trehalose 80 in milk)
55.00	61.40	67.40	38.00	تره‌هالوز ۸۰ در زرده تخم‌مرغ (Trehalose 80 in egg yolk)
57.80	58.20	61.00	38.00	تره‌هالوز ۸۰ در زرده تخم بوقلمون (Trehalose 80 in Turkey egg yolk)
75.80	43.60	38.80	23.00	تره‌هالوز ۱۰۰ در شیر (Trehalose 100 in milk)
76.40	45.20	65.00	39.00	تره‌هالوز ۱۰۰ در زرده تخم‌مرغ (Trehalose 100 in egg yolk)
80.40	45.00	74.00	41.00	تره‌هالوز ۱۰۰ در زرده تخم بوقلمون (Trehalose 100 in Turkey egg yolk)
76.60	65. 20	50.20	35.00	رافینوز ۱۲۰ در شیر (Trehalose 120 in milk)
79.80	43.20	75.00	46.00	رافینوز ۱۲۰ در زرده تخم‌مرغ (Trehalose 120 in egg yolk)
82.60	65.40	81.00	46.00	رافینوز ۱۲۰ در زرده تخم بوقلمون (Trehalose 120 in Turkey egg yolk)
2.17	2.34	2.78	2.76	SE
0.9401	0.0778	0.0788	0.3592	P value

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

(a-c difference between the numbers in each column, with dissimilar letters is significant) (P<0.01)

لیو و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که 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 انجماد می‌شوند و همچنین این قندها به غشاء پلاسمایی اسپرم نفوذ می‌کنند و با گروه سر قطبی فسفولیپیدهای غشاء تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهند و در نتیجه از آسیب به لیپید غشاء جلوگیری می‌کنند (۲۱).

در زمینه استفاده از قندهای مختلف در رقیق‌کننده‌های منی گزارش‌های متعددی وجود دارد. آزمایش‌های انجام شده توسط بهلول و همکاران (۲۰۱٤) و نجفی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دهنده بهبود کیفیت اسپرم در رقیق‌کننده پایه لسیتین سویا حاوی قند تره‌هالوز بودند. در این مطالعات از سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز استفاده

شده که بالاترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم و یکپارچگی غشاء در رقیق‌کننده پایه حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز به‌دست آمد (٦ و ٢٤). در مطالعه دیگری جعفراوغلی و همکاران (۲۰۱۱) اثر افزودن غلظت‌های مختلف (۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) 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 به‌دست آمد (۱۸). در آزمایشی آیسن و همکاران (۲۰۰۲) اثر افزودن سطوح مختلف قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده پایه تریس- زرده تخم‌مرغ را بر قدرت باروری اسپرم قوچ بررسی کردند. نتایج مطلوب با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تره‌هالوز به‌دست آمد (۱). در این مطالعات در سطوح بالاتر قند (۱۰۰ میلی‌مولار) کیفیت اسپرم بهتر حفظ شده است.

در پژوهش حاضر با وجود این‌که درصد تحرک و زنده‌مانی در دو سطح ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تره‌هالوز پایین‌تر از تیمار شاهد بودند ولی در کل در بین سطوح مختلف قند تره‌هالوز، با افزایش سطح قند کیفیت اسپرم بهتر حفظ شده که در این مورد با نتایج آزمایشات بالا مطابقت داشت. درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند بالاتر بود و نسبت به سایر سطوح و تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. کمترین درصد تحرک و زنده‌مانی در سطح ۸۰ میلی‌مولار به‌دست آمد که اختلاف چندانی بین دو سطح ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده نشد. درصد سلامت غشاء و اسپرم طبیعی نیز با افزایش سطح قند بیشتر شدند که بالاترین درصد سلامت غشاء و اسپرم طبیعی در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار تره‌هالوز و پایین‌ترین درصد سلامت غشاء و اسپرم طبیعی در سطح ۸۰ میلی‌مولار به‌دست آمد.

رقیق‌کننده شیر در مایع منی قوچ به‌طور گسترده استفاده می‌شود. پروتئین شیر و لاکتوز از عوامل محافظت‌کننده اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌باشند. بنابراین رقیق‌کننده پایه شیر اجزایی برای محافظت اسپرم در برابر شوک‌سرمایی طی فرآیند انجماد- ذوب دارد (۲۷). برای رقیق‌سازی اسپرم قوچ رقیق‌کننده طبیعی شیر گاو می‌باشد که به‌صورت شیر پس‌چرخ یا پودر برای رقیق کردن اسپرم استفاده می‌شود. در بعضی از کشورها شیر استریلیزه که ماندگاری بیشتری دارد استفاده می‌شود (۲۷). آری و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای اثر استفاده از شیر گاو و بز به‌عنوان رقیق‌کننده در انجماد اسپرم قوچ را بررسی کردند. نتایج نشان داد بالاترین درصد تحرک در رقیق‌کننده شیر گاو بدون چربی و شیر بز نیمه‌چرب نسبت به رقیق‌کننده تریس بود (۳). فولادوند و همکاران (۲۰۱٤) اثرات سه رقیق‌کننده لسیتین، شیر و زرده تخم‌مرغ بر نگهداری منی قوچ در شرایط سرد را بررسی کردند که نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از لسیتین سویا در مقایسه با رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ و شیر کاهش معناداری در کیفیت اسپرم ایجاد نمی‌کند (۱۲).

در آزمایشی کولاکسیز و همکاران (۲۰۱۰) اثر محافظتی زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان در طی انجماد اسپرم قوچ را بررسی کردند. رقیق‌کننده پایه همراه با زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان (مرغ خانگی، غاز، بوقلمون، اردک، بلدرچین ژاپنی و کبک) بود. زرده تخم کبک بهترین اثر محافظتی از نظر تحرک و زنده‌مانی اسپرم را در مقایسه با پنج زرده تخم دیگر نشان داد (۱۹). در آزمایشی طالب‌علی و همکاران (۲۰۱۳) اثر جایگزینی زرده تخم‌مرغ با زرده‌هایی از منابع دیگر در رقیق‌کننده‌های منی قوچ و تأثیر آن بر باروری در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کردند. نمونه‌های منی با رقیق‌کننده پایه همراه با زرده تخم گونه‌های مختلف پرندگان (کبک، شترمرغ، بوقلمون و اردک) رقیق شدند. استفاده از این زرده‌ها در رقیق‌کننده به‌طور قابل‌توجهی تعداد تشکیل بلاستوسیت را در مقایسه با رقیق‌کننده پایه افزایش داد (۳۲).

هومز و وب (۲۰۰۶) گزارش کردند که اثر محافظتی زرده تخم بوقلمون بر روی اسپرم اسب نر نسبت به زرده تخم‌مرغ بیشتر می‌باشد که علت آن می‌تواند به‌دلیل بالا بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون باشد (۱۷). در این تحقیق رقیق‌کننده‌های مختلف بر فراسنجه‌های اسپرم تأثیر مثبت داشتند که بالاترین درصد تحرک اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون به‌دست آمد که با نتایج آزمایشات بالا مطابقت داشت. کمترین درصد تحرک اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده شیر به‌دست آمد. بین فراسنجه‌های اسپرم در دو رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و تریس- زرده تخم بوقلمون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی فراسنجه‌های اسپرم بین رقیق‌کننده‌های تریس- زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون با رقیق‌کننده شیر تفاوت معنی‌داری نشان دادند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و بررسی مطالعات انجام شده در مورد اثر رقیق‌کننده‌های مختلف می‌توان نتیجه گرفت که کیفیت اسپرم قوچ در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ نسبت به رقیق‌کننده شیر و همچنین در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون نسبت به تریس- زرده تخم‌مرغ بهتر حفظ می‌شود که دلیل آن می‌تواند لیپوپروتئین و لسیتین موجود در زرده تخم‌مرغ و همچنین بالا بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون باشد. بایلی و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که وارد شدن شوک سرمایی، در طی فرآیند انجماد باعث کاهش فعالیت متابولیکی تنفس سلولی و درصد تحرک اسپرم می‌شود (۵). در این تحقیق درصد تحرک اسپرم نسبت به درصد زنده‌مانی کمتر بود که دلیل آن می‌تواند ایجاد شوک سرمایی در طی فرآیند انجماد- ذوب باشد. به عبارتی شوک سرمایی تحرک اسپرم را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سطح ۱۲۰ میلی‌مولار قند تره‌هالوز می‌تواند کیفیت منی قوچ دالاق را بالا ببرد و همچنین استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم بوقلمون به جای رقیق‌کننده‌های معمول (شیر یا تریس- زرده تخم‌مرغ) برای رقیق نمودن اسپرم قوچ دالاق بر تحرک و زنده‌مانی آن مؤثر باشد.

برای این‌که بتوانیم حداکثر میزان استفاده از قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده را به‌دست آوریم پیشنهاد می‌گردد مقادیر بالاتر از ۱۲۰ میلی‌مول قند تره‌هالوز مورد استفاده قرار گیرد و همچنین برای به‌دست آوردن بهترین رقیق‌کننده مورد استفاده برای منی قوچ دالاق پیشنهاد می‌گردد زرده تخم پرندگان دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Aisen, E.G., Medina, V.H., and Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post- thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology. 57: 7.1801-1808.
2. Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L., and Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. Theriogenology. 61: 5.895-907.
3. Ari, U.Ç., Kulaksiz, R., and Öztörkler, Y. 2011. Freezability of Tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. Reproduction in Domestic Animals. 46: 6.975-979.
4. Badr, M.R., Abdelmalak, M.G., and Hassan, M.H. 2010. Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. Reproduction and Infertility. 1: 50-57.
5. Baily, J.F., Bilodeau, J.F., and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology. 21: 1.1-7.
6. Bohlool, Z.H., Mohammadi, M., Roostaei Mehr, M.A., and Ghavi Hossein-Zadeh, N. 2014. Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents. Animal Production Science. 55: 5.666-671.
7. Choi, S.H., Song, K.T., and Oh, H.R. 2001. Cholesterol contents and fatty acid composition of chukar, pheasant, guinea fowl and quail egg yolk. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 14: 6.831-836.
8. Crabo, B.G. 1991. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. In: Johnson, L.A., D. Rath. Boar semen preservation. Berlin: Paul. Parey. Scientific Publishers. Pp: 3-9.
9. Curry, M.R., Millar, J.D., and Watson, P.F. 1994. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to confirm with empirical observations. Biology of Reproduction. 51: 5.1014-1021.
10. Evans, G., and Maxwell W.C. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Sydney, 194p.
11. Fernandez-Santos, M.R., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Esteso, M.C., Soler, A.J., DePaz, P., Anel, L., and Garde, J.J. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Theriogenology. 67: 4.738-753.
12. Fouladvand, F., Karimi, K., Zhandi, M., and Tofighi, K. 2014. Comparison the effects of lecitine, egg yolk and milk as extenders on preservation of Zandi ram semen in cool condition. Scientific Research Journal of Animal Environment. 6: 1.83-90. (In Persian)
13. Gholami, M., Faraji, Z., and Zamiri, M.J. 2012. Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. Iranian Journal of Veterinary Research. 13: 1.23-27.
14. Hancock, J. 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society. 76: 84-97.
15. Hami, K., and Molla hoseini, M. 2011. Production of sugar trehalose by yeasts and aspects of biotechnology with emphasis on applications in the food industry. first national seminar on food security. Pp: 1-7. (In Persian)
16. Hammersted, R.H., Graham, J.K., and Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Andrology. 11: 1.73-88.
17. Humes, R., and Webb, G. 2006. Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. Animal Production Science. 94 :4.62-63.
18. Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., and Zamiri, M.J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents whit sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Reserch. 96: 1.58-63.
19. Kulaksız, R., Cebi, C., Akcay, E., and Daskın, A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. Small Ruminant Research. 88: 1.12-15.

20. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., and Stewart, D.L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. Reproduction and Fertility. 47: 283-291.
21. Lio, Z., Foote, R.H., and Brockett, C.C. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology. 37: 3.219-230.
22. Martin, I.C.A. 1963. The freezing of dog spermatozoa to -79°C. Research in Veterinary Science. 4: 304.
23. Moreno, J.S., Coloma, M.A., Diaz, A.T., Brunet, A.G., Pastor, A.P., Soria, A.Z., Carrizosa, J.A., Urritia, B., and Sebastian, A.L. 2008. A comparision of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation. Cryobiology. 57: 1.25-29.
24. Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari Sharif, A., Khodaei Motlagh, M., and Martinez-Pastor, F. 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: 3.275-282.
25. NRC, 1985. Nutrient Requirements of Sheep. National Research Council. Academy Press, USA.
26. Revell, S., and Mrode, R. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science. 36: 1-2.77-86.
27. Safdarian, M. 2007. Artificial insemination of sheep and goats. The first edition. Institute of Applied Science Agriculture, 232p. (In Persian)
28. Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Animal Production Science. 62: 1-3.77-111.
29. Sharafi, M., Eghbalsaied, S., Nili, N., and Nasr-Esfahani, M.H. 2009. Ram semen in vitro fertility after cryopreservation using soybean lectin and egg yolk based extenders. Reproduction in Domestic Animals. 44: 90-95.
30. Soylu, M.K., Nur, Z., Ustuner, B., Dogan, I., Sagirkaya, H., Gunay, U., and Ak, K. 2007. Effects of different cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. Bulletin-Veterinary Instiute In Pulawy. 51: 2.241-247.
31. Su, L., Li, X., Quan, X., Yang, S., Li, Y., He, X., and Tang, X. 2008. A comparision of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. Animal Production Science. 104: 2-4.212-219.
32. Talib, Ali, A., Bomboi, G., and Floris, B. 2013. Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. Small Ruminant Research. 113: 2-3.405- 41.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 5(3), 2017
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of different extenders and different levels of trehalose sugar on quality of Dalagh ram semen in frozen condition

***A. Akhundi[1], Y. Mostafalu[2], A.M. Gharehbash[2] and R. Rahchamani[2]**
[1]M.Sc. Gratuated ans [2]Assistant Prof., Dept., of Animal Sciences, Agriculture and Natural Reseources Faculty, Gonbad Kavous University, Iran
Received: 03/24/2017; Accepted: 06/19/2017

Abstract

Background and objectives: Frozen semen is usually used in artificial insemination of farm animals. Sperm cryopreservation is one of the important methods for maintaining and preserving genetic resources, which as one of the methods of assisted reproductive, can maintain the quality of sperm. Since beginning the time of artificial insemination technique, different diluents have been used to maintain and preserve semen in liquid and frozen condition. Composition of extenders and their nature are of great importance in the viability of sperm. To this end, the aim of this research was to evaluate effects of milk, Tris-chicken egg yolk and Tris-turkey egg yolk extenders and different levels of trehalose sugar (0, 80, 100 and 120 mM) on Dalagh ram semen quality after the freezing-thawing process.

Materials and methods: In this research, semen samples were collected from four Dalagh rams in the age of 2-3 years using artificial vagina. Then samples were diluted in different extenders and received different trehalose sugar treatments. Semen samples were aspirated into 0.5 ml straws and cooled to 4°C within 150 min and then they were frozen in liquid nitrogen. Frozen straws were transferred to a tank containing liquid nitrogen. After thawing, spermatozoa quality parameters including the percentage of sperm motility, viability, membrane integrity and sperm normality were evaluated. This experiment was carried out in 4 × 3 factorial arrangement in completely randomized design. Treatments were included different levels of trehalose sugar (0, 80, 100, 120 mM) and different extenders (milk and Tris-chicken egg yolk and Tris-turkey egg yolk). The obtained data from this study were analyzed by ANOVA procedure of Statistical Analysis System SAS (version 9.1). Comparison of data means were performed by Tukey test at the level of 1% error.

Results: The results of this research showed the effects of different levels of trehalose sugar, on the percentage of sperm motility, viability, membrane integrity and sperm normality were significant ($P<0.01$). The highest sperm motility (42.33±1.59%), viability (68.73±1.61%), membrane integrity (66.06±1.35%) and sperm normality (79.66±1.25%) were obtained in 120 mM trehalose sugar. The effects of extenders, on the percentage of sperm motility, viability, membrane integrity and sperm normality were also significant ($P<0.01$). The highest sperm motility (42.50±1.38%), viability (71.25±1.39%), membrane integrity (53.30±1.17%) and sperm normality (73.85±1.08%) were obtained in Tris-turkey egg yolk extender.

Conclusion: In general, considering all the indices evaluated for the dilution of Dalagh ram semen, the addition of 120 mM trehalose sugar in Tris-turkey egg yolk extender showed a better response than the other treatments after the freezing-thawing process.
Keywords: Frozen, Trehalose, Extender, Semen, Ram Dalagh

*Corresponding author: aidin6925@yahoo.com