



ISSN

فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری علمی- پژوهشی

شماره پیاپی ۴۲

جلد ۱۱، شماره ۳، تابستان ۹۷

صاحب امتیاز: دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

مدیر مسئول: مهدی رهنما

سردبیر: مریم شمس لاهیجانی

اعضاء هیئت تحریریه (به ترتیب حرف الفبا):

بهروز ابطحی: دانشگاه شهید بهشتی دانشیار فیزیولوژی ماهیان

جواد بهار آرا: دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد استاد تکوین جانوری

محمد رضا بیگدلی: دانشگاه شهید بهشتی دانشیار فیزیولوژی پزشکی

زهرا دیلمی خیابانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان استادیار زیست سلولی

مهدی رهنما: دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان دانشیار فیزیولوژی جانوری

شهربانو عریان: دانشگاه خوارزمی تهران استاد فیزیولوژی جانوری

مریم شمس لاهیجانی: دانشگاه شهید بهشتی تهران استادیار جینین شناسی و تکوین

جانوری

محمد مرادی: دانشگاه زنجان استاد زیست شناسی جانوری

مختار مختاری: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون استاد فیزیولوژی جانوری

هیات اجرایی:

مدیر داخلی: شهرزاد نصیری سمنانی

ویراستار علمی: احمد مجد

ویراستار انگلیسی: سعید آریان

ویراستار ادبی: نورج عقدایی

ویراستار استنادی: حامد علیزاده

کارشناس مجله: نیره فقیه راد

ناشر: انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

مسئول نمایه سازی: حامد علیزاده

طراحی و صفحه آرایی: حسن بابایی

نشانی: زنجان، اعتمادیه، خیابان معلم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دفتر مجله فیزیولوژی و تکوین جانوری

صندوق پستی: ۴۵۱۹۵-۱۴۶۴

تلفاکس: ۰۲۴-۳۳۴۶۵۸۹۰

آدرس پست الکترونیکی: apad@iauz.ac.ir

شمارگان: ۱۰۰۰ نسخه

آدرس وب سایت: Journals.iauz.ac.ir

قیمت: ۸۰۰۰۰ ریال

نقل مطالب با ذکر ماخذ بلامانع است

مقالات این فصلنامه در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (ISC)، مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) و بانک اطلاعات نشریات کشور (Magiran) نمایه می‌گردد.

براساس نامه شماره (۹۲/۱۰/۲۲-۳/۱۸/۵۳۷۱۱۳) وزارت علوم تحقیقات و فناوری، به این فصلنامه رتبه علمی پژوهشی اعطا گردیده است.

راهنمای تنظیم و تدوین مقاله در فصل نامه فیزیولوژی و تکوین جانوری

دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

مقاله‌های پژوهشی در زمینه‌های مختلف مرتبط با فیزیولوژی و تکوین جانوری منوط به این که دارای نوآوری بوده و تاکنون متن کامل آن در سایر مجلات به چاپ نرسیده باشند، برای چاپ پذیرفته می‌شوند.

نحوه پذیرش مقاله

الف- مقاله به زبان فارسی و چکیده آن به زبان انگلیسی تدوین شود.

ب- مطالب هر مقاله به صورت زیر تنظیم شود:

عنوان مقاله می‌بایست کوتاه و بیان گر محتوای مقاله و حداکثر در ۲۰ کلمه تنظیم شده باشد.

اسامی نویسندگان در زیر عنوان مقاله آورده شود. نشانی کامل محل کار نویسندگان، با ذکر شماره در زیر اسامی نویسندگان در صفحه اول آورده شود. لازم است که نشانی پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبات به طور کامل ذکر شود. اسم نویسنده مسئول **Bold** و زیر آن خط دار باشد.

چکیده مقاله به زبان فارسی و انگلیسی باید مجموعه‌ای فشرده و گویا از مقاله با تاکید بر زمینه و هدف، روش کار، یافته‌ها و نتیجه گیری به دست آمده باشد و از ۲۵۰ کلمه (حدود ۲۰ سطر) بیشتر نباشد.

واژه‌های کلیدی در انتهای چکیده مقاله متناسب با متن مقاله به تعداد ۳ الی ۵ واژه آورده شود.

مقدمه با طرح مساله و بیان پژوهش‌های انجام شده، لزوم انجام پژوهش را توجیه نماید.

مواد و روش‌ها شیوه اجرای پژوهش و نحوه پردازش آماری داده‌ها در این بخش ارائه گردد.

نتایج در این بخش از توضیحات مختصری استفاده شود و آنالیز آماری آن‌ها به صورت متن، شکل، نمودار و یا جدول ارائه شود. نتایج به یک شیوه ارائه گردد. شکل‌ها، نمودارها و جدول‌ها باید گویا و دارای شماره باشند و مشخصات آماری و اطلاعات لازم از قبیل نام محورها، مقیاس و راهنمای نمودار روی آن‌ها مشخص باشد.

عنوان جدول‌ها در بالا و توضیح شکل‌ها و نمودارها در زیر آن‌ها به فارسی نوشته شود. اصل نمودارها به صورت دو بعدی بدون حاشیه و تزیینات اضافی تنظیم شود و ابعاد آن‌ها از ۸×۱۲ سانتی متر بزرگ‌تر نباشد. عکس‌ها به صورت فایل‌های مجزا و با کیفیت مناسب جهت چاپ با نام‌های مشخص روی CD ضبط و به دفتر مجله ارسال شود.

عکس‌ها باید دقیق و روشن و به نحوی تهیه شوند که از نظر فنی چاپ آن‌ها با کیفیت مطلوب در مجله مقدر باشد. عکس‌ها و تصاویر باید دارای شماره گذاری متوالی بوده و ترتیب آن‌ها بر اساس ارجاع به آن‌ها در متن باشد.

ابعاد عکس‌های ارائه شده باید در یک اندازه و از ۸×۱۲ سانتی متر بزرگ‌تر نباشد. در پشت اصل عکس، عنوان مقاله و نویسنده و شماره عکس ذکر گردد. عکس‌ها باید اصل بوده و از ارسال فتوکپی و عکس‌های با کیفیت پایین خودداری و محل دقیق عکس‌ها در متن مشخص شود. بهتر است به صورت یک فایل جداگانه jpg تهیه شود.

بحث و نتیجه گیری با توجه به هدف تحقیق و مقایسه با یافته‌های سایر پژوهش‌ها، تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده انجام شود.

تشکر و قدردانی (در صورت لزوم)

منابع به صورت الفبایی (نام خانوادگی اولین مولف) تنظیم گردد و شماره هر مورد در متن داخل پرانتز آورده شود (مقاله) در نوشتن منابع، در صورت استفاده از منابع فارسی ابتدا این منابع و سپس منابع خارجی آورده شود.

مقاله: نام خانوادگی و نام نویسنده (نویسندگان)، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، نام اختصاری مجله، شماره و دوره مجله، صفحات اول و آخر مقاله استفاده شده.

نمونه فارسی:

۱- پورغلام، ر.، اسماعیلی، ف.، فرهومند، ه.، سلطانی، م.، یوسفی، پ.، مهرداد، ح. ۱۳۸۰. بررسی مشخصه های خونی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharygondon idella*) بعد از تماس با سم ارگانوفسفره دیازینون. مجله علمی شیلات ایران. سال سوم. شماره ۲. ص ۱۸-۱.

نمونه انگلیسی:

1. Frieman, S.G., Pearce, F.J. (1982). The role of blood glucose in defense of plasma volume during hemorrhage. *J Trauma*, 22 (3);86-92.

کتاب: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان. عنوان کتاب. شماره چاپ. شهر محل چاپ: ناشر; سال انتشار،

شماره صفحات.

Philips, S. J., Whisnant, J. P. Hypertension and Stroke. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. P.85-93.

مقاله کنفرانس: نام خانوادگی و حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان. تاریخ انتشار، عنوان مقاله کنفرانس، نام کنفرانس..

Jamshidi, J., Pouresmaeili, F. (2012). Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms with bone mineral density in a population of Iranian women. *European Human Genetics Conference*, p. 390.

پایان نامه: نام خانوادگی و حروف اول نام نگارنده. تاریخ انتشار، عنوان پایان نامه. مقطع پایان نامه. دانشگاه و دانشکده. شماره

صفحات.

Kaplan, S. J. (1995). Post-hospital home health care: the elderly access and utilization (dissertation). St Louis (MO): Washington University.

پ- اصطلاح. et al. پس از نام شش نویسنده می آید. بنابراین اگر تعداد نویسندگان بیش از شش نفر باشد پس از نوشتن نام

کامل شش نویسنده. et al. جایگزین نام نویسندگان بعدی گردد.

ت- معادل اصطلاحات در متن مقاله به زبان فارسی یا لاتین در داخل پرانتز آورده شود (مقاله نباید دارای زیر نویس باشد).

ث- شماره گذاری مقاله از چکیده مقاله شروع شده و تا پایان مقاله ادامه یابد.

ج- مقاله ترجیحاً کم تر از ۵ و بیش از ۱۵ صفحه نباشد و با نرم افزار Word2007 تایپ شود. ارسال CD الزامی است.

چ- مسئولیت صحت و سقم مطالب هر مقاله بر عهده نویسنده (نویسندگان) آن خواهد بود. ضمناً اسامی نویسندگان مقاله (اولویت قرار گرفتن و یا هر گونه تغییر تا پایان بررسی مقاله) صرفاً با امضای نویسنده مسئول امکان پذیر است.

ح- مجله حق رد، قبول، اصلاح، ویرایش و خلاصه نمودن مقاله را برای خود محفوظ می دارد. مقالات دریافتی به هیچ عنوان

مسترد نخواهد شد.

خ- کلیه مقالات منطبق با شرایط فوق، بلافاصله پس از وصول توسط هیئت تحریریه مورد بررسی قرار گرفته و در صورت تأیید

مقاله ضمن اعلام به نویسنده، جهت داوری ارسال می گردد.

د- مقاله در یک نسخه اصل و سه نسخه کپی از مقاله (نسخ کپی فاقد اسم، آدرس نویسنده و تشکر و قدردانی باشد) به دفتر

مجله ارسال گردد. ضمناً توجه گردد همراه مقاله در یک صفحه مجزا عنوان مقاله (فارسی و انگلیسی)، نام و نام خانوادگی

نویسندگان (فارسی و انگلیسی)، مرتبه علمی و محل اشتغال آنها به همراه شماره تلفن محل کار و آدرس پست الکترونیکی

نویسنده مسئول جهت تسریع در مکاتبات بعدی ذکر شود و یک تعهدنامه با امضای تمام نویسندگان به پیوست آن ارسال گردد.

ذ- در کلیه مراحل بررسی مقاله، ایرادات و اصلاحات مورد نیاز جهت تامین نظر داوری برای نویسنده ارسال می شود و در

صورت تأیید نهایی مقاله ضمن اعلام به نویسنده، در نوبت چاپ قرار می گیرد. نسخه های مجله پس از چاپ به تعداد نویسندگان

هر مقاله به آدرس نویسنده مسئول ارسال خواهد شد.



فهرست مطالب

اثرات سطوح مختلف تورهالوز و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در

شرایط مایع.....۱
آیدین آخوندی، یوسف مصطفی‌لو، آشورمحمد قره‌باش، رضا راه‌چمنی

بررسی اثر ضد التهابی عصاره اتانولی گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra L.*) در موش کوچک آزمایشگاهی نر

بالغ نژاد NMRI.....۱۵
مریم شریفی سلطانی، اکرم عیدی، سید علی حائری روحانی

تأثیر تراکم ذخیره‌سازی بر شاخص‌های رشد و استرس بچه تاسماهی سبیری (*Acipenserbaerii*) پرورش یافته در

مخازن فایبرگلاس.....۲۷
میرحامدسیدحسینی، علی رضا علی‌پور، ایوب یوسفی جوردھی، هوشنگ یگانه

الگوی بیان فاکتور نکروز تومور- آلفا (Tumor Necrosis Factor- α) تحت تأثیر عصاره هیدروالکلی

زنجبیل (*Zingiber officinale*).....۴۱
زینب صحرائیان

اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه آنگوزه (*Ferula assafoetida*) در جیره غذایی بر بیان ژن‌های مرتبط با

ایمنی (TNF- α و IL1B) در ماهی گورخری (*Danio rerio*).....۵۵
رقیبه صفری، فاطمه واحدی امیری، علی شعبانی، سید حسین حسینی فر، حامد کلنگی میاندره

اثرات *Pediococcus acidilactici* به عنوان پروبیوتیک بر هماتولوژی، فراسنج‌های خونی و هیستوپاتولوژی روده

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.....۶۷
خدیدجه عطایی، سید محمد علی جلالی، فرود یداللهی، آذر همت زاده

اثر سطوح مختلف پروتئین جیره بر شاخص‌های رشد و ترکیب بیوشیمیایی بدن خیار دریایی (*Holothuria scabra*)

در مرحله جوانی.....۷۵
حمید علاف نویریان، آبتین بیابانی

بررسی اثر عصاره آبی برگ گیاه زرشک خوراکی (*Berberis vulgaris*) بر آنژیوژنز در پرده کوریوآلانتوئیک

جنین جوجه.....۸۵
شیمایا شایسته پور، سعیده ظفر بالانژاد، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی

اثرات سطوح مختلف تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در شرایط مایع

آیدین آخوندی^۱، یوسف مصطفی‌لو^۲، آشورمحمد قره‌باش^۲، رضا راه‌چمنی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام دانشگاه گنبد کاووس، گرگان، ایران. aidin6925@yahoo.com

۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: تلقیح مصنوعی در گوسفند یک راه موثر جهت بهبود ژنتیکی و مدیریت تولیدمثل می‌باشد. یکی از مراحل مهم و حیاتی تلقیح مصنوعی محافظت از اسپرم قوچ طی فرآیند ذخیره‌سازی است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده‌های تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-زرده تخم بوقلمون بر خصوصیات منی قوچ دالاق در شرایط نگهداری به صورت مایع بود.

روش کار: در این تحقیق نمونه‌های منی از چهار رأس قوچ دالاق ۲ تا ۳ ساله جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق‌سازی و تیمارهای مختلف قند را دریافت نمودند. نمونه‌های منی وارد پایوت‌های ۰/۵ میلی‌لیتری گردیدند و به یخچال (دمای ۵°C) منتقل شدند. سپس در زمان‌های مختلف خصوصیات اسپرم، شامل درصد اسپرم متحرک، زنده، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×۴ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی برای هر رقیق‌کننده به صورت مجزا انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف قند تره‌هالوز (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ mm) زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ۲۴ و ۴۸ h) بودند. داده‌ها در محیط اکسل پردازش و با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه ANOVA و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱٪ انجام شد.

یافته‌ها: تأثیر سطوح مختلف قند و زمان‌های مختلف نگهداری در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون بر خصوصیات اسپرم معنی‌دار بود ($P < 0/01$). اثر متقابل سطوح قند و زمان‌ها در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ و تخم بوقلمون بر درصد تحرک و سلامت غشاء معنی‌دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد تحرک ($0/86 \pm 0/03$) و زنده‌مانی اسپرم ($0/94 \pm 0/02$) و اسپرم طبیعی ($0/88 \pm 0/02$) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار قند و در زمان صفر به دست آمد. بیشترین درصد سلامت غشاء ($0/72 \pm 0/02$) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی صفر میلی‌مولار قند و در زمان صفر بود.

نتیجه‌گیری: برای رقیق نمودن منی قوچ دالاق استفاده از سطح ۱۲۰ قند تره‌هالوز در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون در ساعات اولیه ذخیره‌سازی در شرایط مایع موثر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تره‌هالوز، رقیق‌کننده، مایع منی، قوچ دالاق.

مقدمه

را می‌توان به دو حالت مایع و منجمد، ذخیره و سپس تلقیح کرد (۵). اسپرم طی نگهداری در شرایط سرمایی با کاهش خواص حیاتی از قبیل تحرک و باروری روبرو می‌گردد که این امر می‌تواند به عنوان یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی در نظر گرفته شود (۲۸). فرآیند انجماد می‌تواند بر عملکرد و

عملیات تلقیح مصنوعی همواره به عنوان یکی از راهکارهای اساسی در اصلاح نژاد گوسفندان به خصوص در آزمون نتایج و ارزیابی قوچ مطرح می‌باشد. یکی از مراحل مهم و حیاتی این فرآیند محافظت از اسپرم قوچ طی عملیات ذخیره‌سازی است (۲۲). پس از اسپرم‌گیری و ارزیابی آن، نمونه منی

باروری اسپرم حتی با به کارگیری آخرین پیشرفت‌ها در تکنولوژی نیز مضر باشد. بنابراین با توجه به مشکلات بوجود آمده طی عملیات انجماد و خنک‌سازی منی در نشخوارکنندگان کوچک، تلقیح مصنوعی در این حیوانات به صورت منی تازه و سرد شده صورت می‌گیرد (۱۷). ذخیره منی در شرایط مایع از طریق کاهش متابولیسم اسپرم با استفاده از کاهش دما و مواد شیمیایی انجام می‌شود تا از پیر شدن اسپرم در مدت ذخیره‌سازی جلوگیری گردد (۱۱). هنگام ذخیره‌سازی مایع منی به صورت مایع در ۵ درجه سانتی‌گراد، تحرک، سلامت غشاء و باروری اسپرم به صورت تدریجی کاهش می‌یابد (۲۲). از جمله دلایل این کاهش را می‌توان به اکسیژن فعال تولید شده توسط اجزای سلولی اسپرم مانند سوپراکسید هیدروژن پراکسید و هیدروپراکسیدهای لیپیدی، در نتیجه پراکسیداسیون لیپید غشاء اسپرم نسبت داد (۳). اثرات پراکسیداسیون لیپیدی شامل از دست دادن غیرقابل برگشت تحرک، آسیب به DNA و کاهش باروری اسپرم می‌باشد (۲۳). مایع منی قوچ به طور معمول شامل آنتی‌اکسیدان‌های تائورین، هیپوتائورین، کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز است که می‌تواند تا حدودی پراکسیداسیون لیپیدی را جبران کند (۱۱). هر چند استفاده از قند تره‌هالوز به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح نیست اما اثر محافظتی آن بر اثرات مخرب درجه حرارت پایین در غشاء اسپرم قوچ اثبات شده است (۲۲). نگهداری اسپرم در دوره‌های کوتاه مدت و بلند مدت می‌تواند کمک مؤثری در موفقیت تلقیح مصنوعی داشته باشد. ذخیره‌سازی و نگهداری مناسب اسپرم، انتقال موفقیت‌آمیز اسپرم را از مناطق دورتر تسهیل کرده و گسترش استفاده از ذخایر ژنتیکی بهتر را امکان‌پذیر می‌سازد. اما معمولاً اسپرماتوزوئیدها در طی نگهداری دچار استرس حرارتی شده و در دماهای

پایین، خواص حیاتی آن‌ها از قبیل تحرک و زنده‌مانی کاهش می‌یابد که این موضوع به عنوان یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از آنها در تلقیح مصنوعی در نظر گرفته می‌شود. برای حل این مشکل استفاده از یک رقیق‌کننده مطلوب علاوه بر افزایش حجم منی باعث افزایش قابلیت نگهداری و هم‌چنین افزایش طول عمر اسپرم می‌گردد (۲۸). از ابتدای به کارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی تا به امروز تحقیقات متعددی در خصوص استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف جهت نگهداری منی در شرایط مایع و منجمد انجام شده است. در یکی از این تحقیقات انجام شده گروهی از محققین استرالیایی پس از مقایسه رقیق‌کننده‌های مختلف اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم‌مرغ را برای نگهداری در شرایط مایع و اضافه کردن ۵٪ گلیسرول به بافر تریس را برای نگهداری در شرایط انجماد، پیشنهاد نمودند (۲۸). امروزه استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان یک ترکیب متداول در رقیق‌کننده‌های منی در حیوانات اهلی شناخته شده و اثرات مفید آن بر انجماد اسپرم به عنوان یک محافظ غشاء پلاسمایی و آکروزوم در برابر آسیب‌های مربوط به تغییر درجه حرارت اثبات شده است. به عنوان مثال ترکیبات فسفولیپیدی، کلسترول و لیوپروتئین‌های با چگالی کم موجود در زرده تخم‌مرغ ممکن است از جمله فاکتورهایی باشند که باعث حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی در فرآیند انجماد- ذوب می‌باشند (۴). در تأیید این موارد Choi و همکاران (۲۰۰۲)، Moreno و همکاران (۲۰۰۸) و Su و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات خود گزارش دادند که استفاده از زرده تخم‌گونه‌های مختلف پرنده‌گان مانند اردک، بلدرچین، کبوتر و مرغ دارای ترکیبات مختلفی از اسیدهای چرب، فسفولیپیدها و کلسترول است که می‌تواند اثرات مختلفی در انجماد اسپرم داشته

کیلوگرم با جیره کاملاً مخلوط از یونجه، کاه گندم، دانه ذرت و سبوس گندم دارای ۲/۳ مگا کالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵٪ پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک تغذیه شدند. قوچ‌ها با روش اسپرم‌گیری به وسیله مهبل مصنوعی عادت دهی و از این طریق نمونه‌های منی هفته‌ای دو بار جمع‌آوری گردید.

ارزیابی اولیه نمونه منی

پس از تهیه نمونه‌های منی به منظور جلوگیری از آسیب به اسپرم‌ها، لوله‌های جمع‌آوری منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه درون فلاسک عایق با آب دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده 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 می‌باشند، به منظور تعیین نمونه‌های مطلوب انجام شد که در صورت مطلوب نبودن، نمونه حذف می‌گردید. برای تعیین حجم منی از لوله‌های درجه‌بندی شده و برای تعیین غلظت آن از لام هموسیتر استفاده گردید. برای تعیین تحرک موجی نیز یک قطره از نمونه منی رقیق نشده بر روی لام گرم قرار داده شد و تحرک موجی اسپرم از صفر تا ۵ امتیازبندی گردید (۱۸، ۹). 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 و سپس یک قطره کوچک از نمونه رقیق شده بر روی لام گرم ریخته و یک لامل بر روی آن قرار داده و با استفاده از میکروسکوب نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰× در چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند، تعیین گردید (۲۱، ۱۸). برای تعیین درصد اسپرم غیرطبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. حجم منی بین ۰/۵ تا ۲

باشد (۲۹، ۲۴، ۸). Lio و همکاران (۱۹۹۸) نیز در مطالعه خود گزارش دادند که استفاده از رقیق‌کننده‌های مکمل با قندهای مختلف مانند ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز تمایل زیادی برای محافظت از سلول‌های اسپرم داشته و با ایجاد یک فشار اسمزی و خروج آب از سلول باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی طی فرآیند کاهش دما می‌گردند (۱۹). قند تره‌هالوز یک دی‌ساکارید متشکل از دو واحد گلوکز و قندهای غیر احیاکننده است که با غلظت بسیار زیادی در قارچ‌ها، مخمرها و برخی از باکتری‌ها یافت می‌شود. در همین ارتباط بررسی محتوای مخمرها ثابت کرده است که استفاده از قند تره‌هالوز می‌تواند به عنوان یک محافظت‌کننده با کارآیی بالا و تقویت‌کننده ترکیبات سلولی از قبیل غشاء پلاسمایی عمل نماید. این یافته‌ها باعث مطرح شدن قند تره‌هالوز به عنوان یک ماده محافظ گردیده است (۱). از آن جایی که استفاده از ترکیبات مختلف به عنوان رقیق‌کننده اسپرم نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است، بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات مختلف رقیق‌کننده‌های تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-زرده تخم بوقلمون، به همراه افزودن سطوح مختلف قند تره‌هالوز (۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ mM) بر خصوصیات منی قوچ دالاق است. به طور کلی هدف از این طرح بهبود توانایی تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ دالاق با استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف و افزودن قند تره‌هالوز در فواصل زمانی طولانی‌تر در شرایط نگهداری به صورت مایع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مایع منی

تحقیق حاضر در فصول پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ در ایستگاه پرورش گوسفند دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. بدین منظور تعداد چهار رأس قوچ دالاق ۳-۲ ساله با وزن ۷۵-۸۰

ساعت) از لحاظ صفات درصد تحرک و زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی نمونه‌ها

تحرک اسپرم: به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوآ، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق‌شده از هر پایوت بر روی لام گرم شده قرار داده شد. سپس بر روی آن یک لامل تمیز گذاشته شد تا نمونه به طور یکنواخت زیر سطح لامل پخش شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی $\times 40$ میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند، تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات به عنوان درصد تحرک اسپرم ثبت شد (۲۷، ۲۱، ۹).

زنده‌مانی اسپرم: جهت اندازه‌گیری درصد اسپرم زنده از رنگ‌آمیزی ائوزین و نگرزین استفاده گردید. برای ساخت رنگ، $0/85$ گرم ائوزین، 5 گرم نگرزین، $1/45$ گرم سدیم سترات آیدرات را در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و محلول به دست‌آمده 20 دقیقه جوشانده شد. پس از رسیدن دمای محلول به دمای محیط، محلول دو بار از فیلتر عبور داده شد و در شیشه‌ای تیره ریخته و برای رنگ‌آمیزی یک قطره منی رقیق‌شده 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 لام در داخل انکوباتور گذاشته شد تا خشک شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی $\times 40$ میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید زنده‌مرده بودن حداقل 200 اسپرم تعیین گردید. میانگین حاصل از مشاهدات بعنوان 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،

میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $2/5 \times 10^9$ ، تحرک بیش از 70 درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کمتر از 10 درصد در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شد (۱۰). پس از بررسی اولیه و اطمینان از مناسب بودن نمونه‌ها به منظور جلوگیری از اثرات فردی نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی مایع منی

در مطالعه حاضر برای رقیق‌سازی نمونه‌های منی از رقیق‌کننده پایه تریس (Sigma-Aldrich، 252859)، (USA) استفاده شد (جدول-۱) (۲۷). با استفاده از pH متر سطح pH نمونه رقیق‌کننده پایه $pH=7$ و میزان اسمولاریته آن با استفاده از دستگاه اسمومتر 320 میلی‌اسمز تعیین گردیده (۱) و سپس نسبت به تهیه رقیق‌کننده‌های مختلف اقدام شد که شامل: ۱- محیط پایه تریس حاوی 14 درصد (حجمی/حجمی) زرده تخم‌مرغ و ۲- محیط پایه تریس حاوی 14 درصد زرده تخم‌بوقلمون بود. در مرحله بعد هر کدام از رقیق‌کننده‌ها به چهار لوله آزمایش تقسیم شدند و سطوح مختلف (صفر، 80 ، 100 و 120 میلی‌مولار) قند تره‌هالوز (Sigma-Aldrich، 0167، USA) به لوله‌های حاوی رقیق‌کننده‌ها اضافه شد. نمونه‌های منی بعد از مخلوط شدن به سه قسمت مساوی تقسیم و در هر قسمت با رقیق‌کننده‌های مذکور به نسبت ۱ به $1/20$ حجم نمونه منی و 20 حجم رقیق‌کننده) رقیق گردیدند. رقیق‌سازی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم انجام شد. پس از مرحله رقیق‌سازی، پر کردن پایوت‌ها در محیط یخچال با استفاده از پایوت‌های $0/5$ میلی‌لیتری به روش دستی و با استفاده از سرنگ انسولین انجام و پس از اتمام فرآیند رقیق‌سازی، پایوت‌ها درون یخچال (دمای 5 درجه سانتی‌گراد) منتقل شده و در سه فاصله زمانی (صفر، 24 و 48

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 $\times 40$ میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ سلول اسپرم شمارش و درصد اسپرم طبیعی محاسبه گردید. اسپرم غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم در نظر گرفته شد (۱۲) (شکل ۳).

آنالیز آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل 4×3 در قالب طرح کاملاً تصادفی برای هر رقیق‌کننده به صورت مجزا انجام شد و فاکتور اول شامل سطوح مختلف قند تره‌هالوز (صفر، ۸۰، ۱۰۰ و 120 mM) و فاکتور دوم شامل زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ۲۴ و ۴۸ h) است. داده‌های به دست آمده در محیط اکسل پردازش و با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS (V: 9.1) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه ANOVA و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱٪، آزمایش صورت ۵ تکرار در هر تیمار انجام شد.

نتایج

خصوصیات اسپرم در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

درصد اسپرم متحرک: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ معنی‌دار بود ($P < 0.01$) نیز اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.01$). بیشترین درصد تحرک

قرمز رنگ دیده می‌شود. در صورت زنده بودن اسپرم، غشاء پلاسمایی دست‌نخورده و سالم بوده و مانع نفوذ رنگ به داخل سلول‌ها می‌شود و اسپرم سالم بصورت فاقد رنگ در زمینه تیره حاصل از رنگ نگروزین، قابل مشاهده خواهد بود (شکل ۱) (۲۷، ۹).

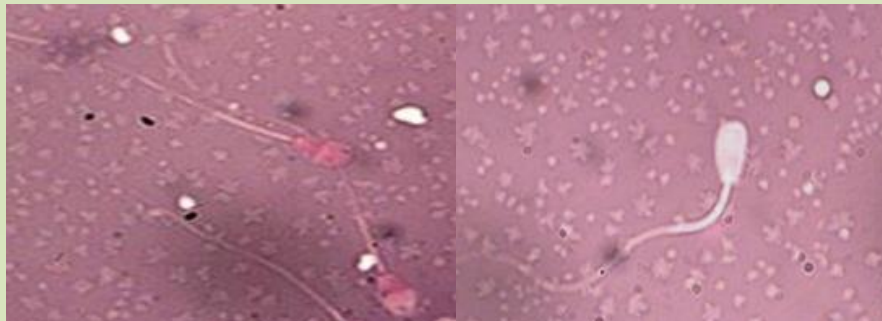
یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم: برای بررسی سلامت غشاء اسپرم از محلول هاست با روش Revell و Mrode استفاده گردید (۲۴). محلول هاست شامل 0.735 گرم سدیم سترات آنیدرات و $1/351$ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. بعد از یخ‌گشایی پایوت‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هاست اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای 37°C 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 $\times 40$ میکروسکوپ نوری دوربین‌دار به صورت تصادفی در ۱۰ میدان دید حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم دارای غشاء یکپارچه محاسبه شد (۲۶) (شکل ۲).

ریخت‌شناسی اسپرم: به منظور ارزیابی اسپرم با مورفولوژی طبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. محیط هانکوک شامل $62/5$ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، 150 میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، 150 میلی‌لیتر محلول بافر و 500 میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل $21/682$ گرم سدیم هیدروژن فسفات آنیدرات ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) در 500 میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از $22/254$ گرم فسفات پتاسیم (KHPO_4) در 500 میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن 200 میلی‌لیتر از محیط نخست با 80 میلی‌لیتر از محیط دوم، 280 میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی چند

اسپرم ($2/82 \pm 83/00$ ٪) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی صفر mM قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت و کمترین درصد تحرک ($2/82 \pm 18/00$ ٪) در رقیق‌کننده حاوی 80 mM قند تره‌هالوز و در زمان ساعت 48 به دست آمد (جدول 3).

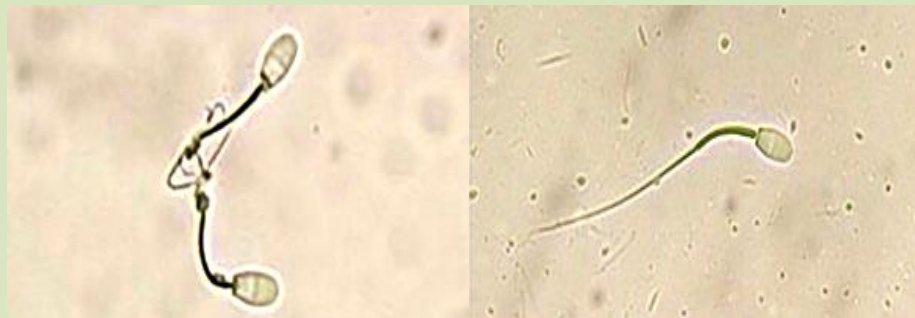
جدول 1- ترکیب رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی قوچ در شرایط مایع

مقدار در 100 میلی لیتر	اجزای رقیق‌کننده
3/634	تریس (g)
0/5	فروکتوز (g)
1/99	اسید سیتریک (g)
14	زرده تخم‌مرغ (ml)
100000	پنی سیلین (IU)
100	استرپتومایسین (mg)
100	آب مقطر تا حجم (ml)



اسپرم زنده (رنگ نگرفته) اسپرم مرده (رنگ گرفته)

شکل 1- اسپرم رنگ آمیزی شده در زیر میکروسکوپ (×100)



اسپرم با غشاء سالم (دم پیچ خورده) اسپرم با غشاء آسیب دیده (دم پیچ نخورده)

شکل 2- اسپرم در محلول هاست در زیر میکروسکوپ (×40)



اسپرم با مورفولوژی غیر طبیعی

اسپرم با مورفولوژی طبیعی

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

بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد سلامت غشاء ($1/63 \pm 0/66$) در رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ حاوی صفر mM قند تره هالوز و در زمان صفر h بدست آمد و کمترین سلامت غشاء ($1/63 \pm 0/22$) در رقیق کننده حاوی ۸۰ mM قند تره هالوز و در زمان ۴۸ h بدست آمد (جدول ۳).

درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره هالوز بر درصد اسپرم طبیعی در رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ معنی دار مشاهده شد ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم طبیعی ($1/15 \pm 0/82$) در سطح صفر میلی مولار قند تره هالوز و کمترین درصد اسپرم طبیعی ($0/77/86$) در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد (جدول ۲). تأثیر زمان های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم طبیعی ($0/83/65$) در زمان صفر ساعت و کمترین درصد اسپرم طبیعی ($0/77/86 \pm 1/15$) در زمان ۴۸ h به دست آمد (جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره هالوز و زمان های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی دار نبود ($P > 0/05$).

درصد اسپرم زنده: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره هالوز بر درصد اسپرم زنده در رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم زنده ($1/71 \pm 0/86$) در سطح صفر میلی مولار قند تره هالوز و کمترین درصد اسپرم زنده ($1/71 \pm 0/75$) در سطح ۸۰ mM قند به دست آمد (جدول ۲). تأثیر زمان های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم زنده ($1/48 \pm 0/80$) در زمان صفر ساعت و کمترین درصد اسپرم زنده ($1/48 \pm 0/76$) در زمان ۴۸ h به دست آمد (جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره هالوز و زمان های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی دار نبود ($P > 0/05$).

درصد اسپرم با غشاء سالم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره هالوز بر درصد سلامت غشاء در رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ معنی دار بود ($P < 0/01$). تأثیر زمان های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی دار بود ($P < 0/01$). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره هالوز و زمان های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی دار نبود ($P > 0/05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

صفات اسپرم (%)	تحرك	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
قند تره‌هالوز (mM)				
۰	۶۶/۶۶ ^a ±۱/۶۳	۸۶/۰۰ ^a ±۱/۷۱	۵۳/۸۶ ^a ±۰/۹۴	۸۰/۴۶ ^a ±۱/۱۵
۸۰	۳۵/۶۶ ^c ±۱/۶۳	۷۵/۰۰ ^c ±۱/۷۱	۳۷/۶۶ ^c ±۰/۹۴	۷۷/۸۶ ^b ±۱/۱۵
۱۰۰	۳۶/۶۶ ^c ±۱/۶۳	۷۸/۸۰ ^{b,c} ±۱/۷۱	۳۹/۴۰ ^c ±۰/۹۴	۷۸/۰۶ ^b ±۱/۱۵
۱۲۰	۵۰/۰۰ ^b ±۱/۶۳	۸۰/۸۶ ^b ±۱/۷۱	۴۲/۸۶ ^b ±۰/۹۴	۸۲/۷۳ ^a ±۱/۱۵
<i>P value</i>	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۳۹
زمان‌های مختلف نگهداری (h)				
۰	۶۳/۲۵ ^a ±۱/۴۱	۸۰/۵۵ ^a ±۱/۴۸	۶۰/۱۵ ^a ±۰/۸۱	۸۳/۶۵ ^a ±۱/۰۰
۲۴	۴۷/۰۰ ^b ±۱/۴۱	۸۳/۷۰ ^a ±۱/۴۸	۴۴/۲۵ ^b ±۰/۸۱	۷۹/۰۵ ^b ±۱/۰۰
۴۸	۳۱/۰۰ ^c ±۱/۴۱	۷۶/۲۵ ^b ±۱/۴۸	۲۵/۹۵ ^c ±۰/۸۱	۷۶/۶۵ ^b ±۱/۰۰
<i>P value</i>	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

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

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ

صفات اسپرم (%)	تحرك	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی
تره‌هالوز صفر در ساعت صفر	۸۳/۰۰ ^a ±۲/۸۲	۹۱/۰۰±۲/۹۶	۶۶/۰۰ ^a ±۱/۶۳	۸۳/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز صفر در ساعت ۲۴	۷۶/۰۰ ^a ±۲/۸۲	۸۹/۰۰±۲/۹۶	۵۹/۴۰ ^{a,b} ±۱/۶۳	۷۷/۸۰±۲/۰۰
تره‌هالوز صفر در ساعت ۴۸	۴۱/۰۰ ^c ±۲/۸۲	۷۸/۰۰±۲/۹۶	۳۶/۲۰ ^e ±۱/۶۳	۸۰/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت صفر	۵۵/۰۰ ^b ±۲/۸۲	۷۵/۰۰±۲/۹۶	۵۵/۶۰ ^c ±۱/۶۳	۸۳/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۲۴	۳۴/۰۰ ^c ±۲/۸۲	۷۸/۰۰±۲/۹۶	۳۵/۴۰ ^e ±۱/۶۳	۷۸/۴۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۴۸	۱۸/۰۰ ^d ±۲/۸۲	۷۲/۰۰±۲/۹۶	۲۲/۰۰ ^f ±۱/۶۳	۷۱/۶۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت صفر	۵۵/۰۰ ^b ±۲/۸۲	۷۸/۴۰±۲/۹۶	۵۶/۶۰ ^{b,c} ±۱/۶۳	۸۱/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۲۴	۳۶/۰۰ ^c ±۲/۸۲	۸۳/۲۰±۲/۹۶	۳۸/۶۰ ^e ±۱/۶۳	۷۹/۲۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۴۸	۱۹/۰۰ ^d ±۲/۸۲	۷۴/۸۰±۲/۹۶	۲۳/۰۰ ^f ±۱/۶۳	۷۴/۰۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت صفر	۶۰/۰۰ ^b ±۲/۸۲	۷۷/۸۰±۲/۹۶	۶۲/۴۰ ^a ±۱/۶۳	۸۶/۴۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۲۴	۴۲/۰۰ ^c ±۲/۸۲	۸۴/۶۰±۲/۹۶	۴۳/۶۰ ^d ±۱/۶۳	۸۰/۸۰±۲/۰۰
تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۴۸	۴۸/۰۰ ^{b,c} ±۲/۸	۸۰/۲۰±۲/۹۶	۶۰/۲۲ ^f ±۱/۶۳	۸۱/۰۰±۲/۰۰
<i>P value</i>	۰/۰۰۰۱	۰/۳۲۰۲	۰/۰۰۰۷	۰/۲۱۶۷

a-d تفاوت اعداد در ستون دوم، با حروف غیر مشابه معنی دار است (P<۰/۰۱)

a-f تفاوت اعداد در ستون‌چهارم، با حروف غیر مشابه معنی دار است (P<۰/۰۱)

خصوصیات اسپرم در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون:

درصد اسپرم متحرک: نتایج مشخص نمود که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز و تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم متحرک در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی دار بود (P<۰/۰۱). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف

نگهداری بر درصد اسپرم متحرک معنی دار مشاهده گردید (P<۰/۰۱). بیشترین درصد تحرك اسپرم (۳/۴۵±۸۶/۰۰) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی ۱۲۰ mM قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت به دست آمد و کمترین درصد تحرك (۳/۴۵±۵۲/۰۰٪)

رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم طبیعی ($1/55 \pm 83/33$) در سطح 120 mM قند تره‌هالوز و کمترین درصد اسپرم طبیعی ($1/55 \pm 72/73$) در سطح 80 mM قند بدست آمد (جدول ۴). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم طبیعی معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم طبیعی ($1/34 \pm 83/80$) در زمان صفر ساعت و کمترین درصد اسپرم طبیعی ($1/34 \pm 76/65$) در زمان 48 h به دست آمد (جدول ۴). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی دار نبود ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

Lio و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که استفاده از رقیق کننده‌های 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 کاهش دما می‌گردند، هم‌چنین این قندها به غشاء پلاسمایی اسپرم نیز نفوذ کرده و با گروه سر قطبی فسفولیپیدهای غشاء تشکیل پیوند هیدروژنی داده و در نتیجه از آسیب به لیپید غشاء جلوگیری می‌کنند (۱۹). براساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مشخص شد که استفاده از سطوح مختلف قند تره‌هالوز در رقیق کننده‌های مختلف باعث بهبود خصوصیات اسپرم می‌گردد. در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون خصوصیات کیفی اسپرم در سطح 120 mM تره‌هالوز بهتر بوده و در بین سطوح مختلف با افزایش سطح قند کیفیت اسپرم بهتر حفظ شده است. در رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ خصوصیات کیفی اسپرم در گروه شاهد (بدون قند) نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی بالاتر بود با این حال در بین سطوح مختلف قند، با افزایش سطح قند خصوصیات اسپرم

در رقیق کننده حاوی 120 mM قند تره‌هالوز و در زمان 48 h به دست آمد (جدول ۵).

درصد اسپرم زنده: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد اسپرم زنده در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم زنده ($1/58 \pm 88/53$) در سطح صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و کمترین درصد اسپرم زنده ($1/58 \pm 82/00$) در سطح 80 mM قند به دست آمد (جدول ۴). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد اسپرم زنده ($1/37 \pm 90/30$) در زمان صفر ساعت و کمترین درصد اسپرم زنده ($1/37 \pm 81/90$) در زمان 48 h به دست آمد (جدول ۴). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم زنده معنی دار نبود ($P > 0/05$).

درصد سلامت غشاء اسپرم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد سلامت غشاء در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون معنی دار بود ($P < 0/01$). تأثیر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی دار مشاهده گردید ($P < 0/01$). اثر متقابل سطوح مختلف قند تره‌هالوز و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد سلامت غشاء معنی دار بود ($P < 0/01$). بیشترین درصد سلامت غشاء ($2/66 \pm 72/40$) در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون حاوی صفر میلی مولار قند تره‌هالوز و در زمان صفر ساعت به دست آمد و کمترین سلامت غشاء ($2/66 \pm 22/00$) در رقیق کننده حاوی 100 mM قند تره‌هالوز و در زمان 48 h بدست آمد (جدول ۵).

درصد اسپرم طبیعی اسپرم: نتایج نشان داد که تأثیر سطوح مختلف قند تره‌هالوز بر درصد اسپرم طبیعی در

بهرتر حفظ گردید. در هر دو رقیق‌کننده کم‌ترین دست‌آمد درصد خصوصیات اسپرم در سطح 80 mM قند به

جدول ۴- مقایسه میانگین سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون

صفات اسپرم (%)	تحرك	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی	قند تره‌هالوز (mM)
					۰
	82/33 ^a ±1/58	88/53 ^a ±1/58	61/20 ^a ±1/53	82/60 ^a ±1/55	۸۰
	66/00 ^b ±1/58	82/00 ^b ±1/58	30/53 ^c ±1/53	72/73 ^b ±1/55	۱۰۰
	67/66 ^b ±1/58	84/73 ^{a,b} ±1/58	46/80 ^b ±1/53	78/93 ^a ±1/55	۱۲۰
	64/53 ^b ±1/58	88/00 ^a ±1/58	48/33 ^b ±1/53	83/33 ^a ±1/55	
	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۷۹	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	P value
زمان‌های مختلف نگهداری (h)					
	81/50 ^a ±1/72	90/30 ^a ±1/37	64/30 ^a ±1/33	83/80 ^a ±1/34	۰
	66/40 ^b ±1/72	85/25 ^b ±1/37	46/05 ^b ±1/33	77/75 ^b ±1/34	۲۴
	62/50 ^b ±1/72	81/90 ^b ±1/37	29/80 ^c ±1/33	76/65 ^b ±1/34	۴۸
	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۹	P value

a-c تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P < 0.01$).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح قند تره‌هالوز و زمان‌ها بر خصوصیات منی قوچ دالاق در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم بوقلمون

صفات اسپرم (%)	تحرك	زنده‌مانی	سلامت غشاء	اسپرم طبیعی	صفات اسپرم (%)
	84/00 ^a ±3/45	90/40±2/74	72/40 ^a ±2/66	84/80±2/69	تره‌هالوز صفر در ساعت صفر
	83/00 ^a ±3/45	89/60±2/74	65/20 ^a ±2/66	83/00±2/69	تره‌هالوز صفر در ساعت ۲۴
	80/00 ^a ±3/45	85/60±2/74	46/00 ^b ±2/66	80/00±2/69	تره‌هالوز صفر در ساعت ۴۸
	79/00 ^a ±3/45	89/80±2/74	41/80 ^b ±2/66	74/60±2/69	تره‌هالوز ۸۰ در ساعت صفر
	61/00 ^b ±3/45	79/20±2/74	27/20 ^c ±2/66	72/00±2/69	تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۲۴
	58/00 ^b ±3/45	77/00±2/74	22/60 ^c ±2/66	71/60±2/69	تره‌هالوز ۸۰ در ساعت ۴۸
	77/00 ^b ±3/45	86/60±2/74	71/40 ^a ±2/66	87/80±2/69	تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت صفر
	66/00 ^b ±3/45	86/60±2/74	47/00 ^b ±2/66	75/00±2/69	تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۲۴
	60/00 ^b ±3/45	81/00±2/74	22/00 ^c ±2/66	74/00±2/69	تره‌هالوز ۱۰۰ در ساعت ۴۸
	86/00 ^b ±3/45	94/40±2/74	71/60 ^a ±2/66	88/00±2/69	تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت صفر
	55/60 ^b ±3/45	85/60±2/74	44/80 ^b ±2/66	81/00±2/69	تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۲۴
	52/00 ^b ±3/45	84/00±2/74	28/60 ^c ±2/66	81/00±2/69	تره‌هالوز ۱۲۰ در ساعت ۴۸
	۰/۰۰۱۵	۰/۴۰۵۸	۰/۰۰۰۱	۰/۳۵۷۰	P value

a-b تفاوت اعداد در ستون دوم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P < 0.01$).

a-c تفاوت اعداد در ستون چهارم، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است ($P < 0.01$).

توسط Bohlool و همکاران (۲۰۱۴) و Najafi و همکاران (۲۰۱۳) نشان‌دهنده بهبود کیفیت اسپرم در رقیق‌کننده پایه لسیتین سویا حاوی قند تره‌هالوز بودند.

در زمینه استفاده از قندهای مختلف در رقیق‌کننده‌های منی گزارش‌های متعددی وجود دارد، هم سو با نتایج مطالعه حاضر آزمایش‌های انجام شده

بودند (۳۰). Humes و Webb (۲۰۰۶) نیز در مطالعه خود گزارش دادند که اثر محافظتی زرده تخم بوقلمون بر اسپرم اسب نر نسبت به زرده تخم مرغ بیش تر می باشد که علت آن را به بالاتر بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون نسبت دادند (۱۳). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر Kulaksız و همکاران (۲۰۱۰) طی بررسی اثر محافظتی زرده تخم گونه های مختلف پرندگان (مرغ خانگی، غاز، بوقلمون، اردک، بلدرچین ژاپنی و کبک) در فرآیند انجماد اسپرم قوچ نشان دادند که زرده تخم کبک بهترین اثر محافظتی از نظر تحرک و زندهمانی اسپرم را در مقایسه با پنج زرده تخم دیگر دارد (۱۶). در آزمایشی Bucak و Tekin در سال ۲۰۰۷ اثر افزودن قند تره هالوز در رقیق کننده پایه را بررسی کردند. بالاترین درصد تحرک و زندهمانی اسپرم در ساعات ۶، ۲۴ و ۳۰ ذخیره سازی به دست آمد (۷). تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش ساعت نگهداری درصد تحرک و زندهمانی در هر دو رقیق کننده کاهش می یابد و در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون بین تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معناداری مشاهده نشد، به عبارتی در این رقیق کننده با گذشت زمان تغییر چندانی در خصوصیات اسپرم ایجاد نشده است. نتایج به دست آمده در این تحقیق در مورد اثر زمان های مختلف نگهداری بر تحرک و زندهمانی اسپرم ها در شرایط مایع در تحقیق حاضر با نتایج Jafari Ahangari در سال ۱۹۹۶ و Leboeuf و همکاران در سال ۲۰۰۰ مطابقت داشت (۱۷، ۱۵). جعفری آهنگری حداکثر زمان نگهداری اسپرم قوچ را تحت شرایط مایع ۱۲ ساعت عنوان نموده است. به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق استفاده از سطح ۱۲۰ قند تره هالوز در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون در ساعات

در این مطالعات از سطوح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار قند تره هالوز استفاده شده که بالاترین درصد تحرک و زندهمانی اسپرم و یک پارچگی غشاء در رقیق کننده پایه حاوی ۱۰۰ میلی مولار قند تره هالوز به دست آمد (۲۵، ۶). در مطالعه دیگری Jafaroghli و همکاران (۲۰۱۱) اثر افزودن غلظت های مختلف (۵۰، ۷۰ و ۱۰۰) قندهای ساکارز، رافینوز و تره هالوز در رقیق کننده پایه تریس زرده تخم مرغ بر قدرت باروری اسپرم قوچ را بررسی کردند که همه رقیق کننده های حاوی قندها از نظر کیفیت اسپرم نسبت به گروه شاهد بالاتر بودند. نتایج مطلوب با ۷۰ و ۱۰۰ میلی مولار تره هالوز یا رافینوز به دست آمد (۱۴). در آزمایشی Aisen و همکاران (۲۰۰۲) اثر افزودن سطوح مختلف قند تره هالوز در رقیق کننده پایه تریس زرده تخم مرغ را بر قدرت باروری اسپرم قوچ مورد بررسی قرار گرفت که بهترین نتایج در تیمار ۵۰ و ۱۰۰ mM قند تره هالوز گزارش گردید (۲). در تحقیق حاضر بالاترین درصد تحرک و زندهمانی در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون به دست آمد که با نتایج آزمایشات بالا مطابقت داشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و بررسی مطالعات انجام شده می توان نتیجه گرفت که خصوصیات اسپرم قوچ در رقیق کننده تریس-زرده تخم بوقلمون نسبت به تریس-زرده تخم مرغ بهتر حفظ می شود که دلیل آن می تواند بالا بودن سطح پروتئین، چربی و کلسترول در زرده تخم بوقلمون باشد. در توافق با نتایج پژوهش حاضر TalibAli و همکاران (۲۰۱۲) نیز با بررسی اثر جایگزینی زرده تخم مرغ با زرده هایی از منابع دیگر (کبک، شتر مرغ، بوقلمون و اردک) در رقیق کننده های منی قوچ و تأثیر آن بر میزان باروری در شرایط آزمایشگاهی شاهد افزایش قابل توجه تشکیل بلاستوسیت در رقیق کننده ها مقایسه با رقیق کننده پایه

بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارشناسان آزمایشگاه علوم دامی و مرکزی دانشگاه گنبد کاووس و از دوستان گرامی مهندسین آقایان انوشا و علی‌پناه، خانم‌ها تقوی و بهم‌لی سپاسگزاری می‌شود.

اولیه نگهداری اسپرم به صورت مایع اثر بهتری در محافظت از خصوصیات اسپرم قوچ دالاق داشت.

تشکر و قدردانی

منابع

1. Aboagla, E. M., Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goatsperm membrane and its protection during Freezing. *Biol. Reprod*, 69; 1245-1250.
2. Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57; 1801-1808.
3. Alvarez, J.G., Storey, B.T. (2005). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev*, 42; 334-346.
4. Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L. (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.
5. Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10; 49-62.
6. Bohlool, Z. h., Mohammadi, M., Roostaie-Ali Mehr, M., Ghavi Hossein-Zadeh, N. (2014). Effect of different concentrations of trehalose and glycerol on the freezability of ram semen using soybean lecithin-based diluents. *Anim. Prod. Sci*, 55; 666-671.
7. Bucak, M., Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rumin. Res*, 73; 103-108.
8. Choi, S. H., Song, K. T., Oh, H. R. (2001). Cholesterol contents and fatty acid composition of chukar, pheasant, guinea fowl and quail egg yolk. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*, 14; 831-836.
9. Evans, G., Maxwell W.C. (1987). Salmons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Sydney, 194p.
10. Foote, R. H. (1974). Artificial insemination in farm animals. Lea. Febiger. Philadelphia, 212-246.
11. Griveau, J.F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*, 103; 17-26.
12. Hancock, J. (1956). The morphology of boar spermatozoa. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 76; 84-97.
13. Humes, R., Webb, G. (2006). Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci*, 94; 62-63.
14. Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin. Res*, 96; 58-63.
15. Jafari Ahangari, Y. (1996). An investigation on the effect of various buffers (Tris, Citrate and Skimmed milk) on ram semen motility and survival characteristics in liquid storage. Final report of Research Plan. Animal Science Research Institute, p.37.
16. Kulaksız, R., Cebi, C., Akcay, E., Daskın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Rumin. Res*, 88; 12-15.
17. Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, 62; 113-141.
18. Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., Stewart, D.L. (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. *Reproduction and Fertility*, 47; 283-291.
19. Lio, Z., Foote, R. H., Brockett, C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37; 219-230.
20. López-sáez, A., Ortiz, N., Gallego, I., Garde, J. J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram

semen in different diluents. *Androl*, 44; 155–164.

21. Martin, I.C.A. (1963). The freezing of dog spermatozoa to -79°C . *Research in Veterinary Science*, 4; 304.

22. Maxwell, W.M.C., Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: areview. *Reprod. Fertil.Dev*, 5; 613–638.

23. Maxwell, W.M.C., Watson, P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 42; 55–65.

24. Moreno, J. S., Coloma, M. A., Diaz, A. T., Brunet, A. G., Pastor, A. P., Soria, A.Z. (2008). A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 57; 25-29.

25. Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Akbari Sharif, A., Khodaei Motlagh, M. (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; 275-282.

26. Revell, S., Mrode, R. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci*, 36(1-2); 77-86.

27. Safdarian, M. (1386). Artificial insemination of sheep and goats. First edition, scientific-practical training institute of agricultural jihad. Tehran, Iran. p. 232.

28. Salamon, S., Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci*, 62; 77-111.

29. Su, L., Li, X., Quan, X., Yang, S., Li, Y., He, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci*, 104; 212–219.

30. Talib Ali, A., Bomboi, G., Floris, B. (2013). Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. *Small Rumin. Res*, 113; 405- 410.



Effects of Different Levels of Trehalose and Different Storage Times in on Dalagh Ram Semen Characteristics in Liquid Condition

A. Akhondi¹, Y. Mostafalo², A. Mohammadgharehbash³, R. Rahchamani⁴

1. M.Sc. Animal Physiology, University of Gonbadkavos, Gorgan. Iran.

2. Assistant Prof., Animal Physiology, University of Gonbadkavos, Gorgan. Iran. . aidin6925@yahoo.com

Received: 2018.30. 5

Accepted: 2018. 11.8

Abstract

Introduction & Objective: Artificial insemination in sheep is an effective way to improve genetic and reproductive management. One of the vital stages of artificial insemination is the protection of ram sperm during storage. The aim of this study was to evaluate effects of different levels of trehalose sugar and different storage times in Tris-chicken egg yolk and Tris-turkey egg yolk extenders on Dalagh ram semen characteristics in liquid condition.

Materials and Methods: In this study, for semen sample collection four Dalagh rams in the age of 2-3 years were used. The samples were diluted in different extenders, then received different trehalose sugar treatments. Semen samples were aspirated into 0.5 ml straws, and were transferred into the refrigerator (5°C). Then at different times, spermatozoa characteristics including percentage of motile and viable sperm and membrane and sperm normality were evaluated. This experiment was carried out in 4×3 factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included different levels of trehalose sugar (0, 80, 100, 120 mM) and different storage times (0, 24 and 48 hours). The data were processed in Excel spread sheet environment and was analyzed by ANOVA procedure of Statistical Analysis System SAS (version 9.1). Comparison of data means were performed by Turkey test at the level of %1 error.

Results: The results showed effects different levels of trehalose sugar and different storage times in Tris-chicken egg yolk and turkey egg yolk extenders on the sperm characteristics were significant ($P < 0.01$). Interaction of sugar levels and times on the percentage of sperm motility and membrane integrity was significant ($P < 0.01$). The highest sperm motility ($86.00 \pm 3.45\%$) and viability ($94.40 \pm 2.74\%$) and sperm normality ($88.00 \pm 2.69\%$) were obtained in Tris-turkey egg yolk extender containing 120 mM trehalose sugar and at 0 hours. The highest sperm membrane integrity ($72.40 \pm 2.66\%$) was obtained in Tris-turkey egg yolk extender containing 0 mM trehalose sugar and at 0 hours.

Conclusion: For Dalagh ram semen dilution, the use 120 Mm of sugar trehalose in Tris-turkey egg yolk extender at the early hours of storage in liquid condition is effective.

Key word: Trehalose, Extender, Semen, Ram Dalagh