نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 205-197

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 197-205

اثر سه روز ذخیره سازی اسپرم پوشش‌دار شده در سرما و افزودن مایع منی بر باروری قوچ

علیرضا وافری[1]- محمد روستائی‌علی‌مهر[2*]- نوید قوی حسین زاده[2]- فریدون طالبی[3]

تاریخ دریافت: 1393/04/29
تاریخ پذیرش: 1394/10/16

چکیده

هدف این مطالعه بررسی اثر افزودن مایع منی قوچ به اسپرم پوشش‌دار شده بعد از ذخیره سازی بود. اسپرم پوشش‌دار شده از چهار راس قوچ بالغ (3-5 ساله) در فصل تولید مثل جمع آوری شد. نمونه‌ها تجمیع و بعد به سه بخش مساوی تقسیم شدند. بعد از 68 ساعت نگهداری در 5°C نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و بعد در نمونه‌های بخش اول (+E-S) مایع رو حذف شد و 10% مایع منی اضافه شد، در نمونه‌های بخش دوم (-E-S) مایع رو حذف شد و رقیق کننده تریس گلوکز اضافه شد و در نمونه‌های بخش سوم (شاهد، -E+S) رسوب با مایع رو مخلوط شد. بعد از چهار ساعت نگهداری در 5°C، نمونه ها از طریق دهانه گردن رحم در میش‌های تالشی فحل (1-3 ساله)، تلقیح شدند . نتایج نشان داد نرخ برەزایی در میش‌ها شکم زایش دوم (18/91%) بیشتر ازمیش‌های شکم زایش اول (5/12%) بود. اگرچه نرخ برەزایی در تیمار E-S- (24/32%)حدود 10% از تیمار E+S- (10/81%) بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری بین درصد نرخ برەزایی تیمارهای E-S- و E+S- وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین درصد نرخ برەزایی تیمارهای E-S+ (5/4%) و E+S- وجود نداشت. نرخ بره زایی در تیمار E-S- به طور معنی داری بیشتر از تیمار E-S+ بود. بنابراین این تحقیق نشان داد که امکان افزودن مایع منی قوچ به اسپرم پوشش دار شده بعد از ذخیره سازی وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: اسپرم پوشش دار شده، باروری، ذخیره سازی منی، مایع منی.

مقدمه

اهمیت استفاده از روش تلقیح مصنوعی در اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریت تولید مثل دام‌های اهلی بر کسی پوشیده نیست. در حال حاضر نتایج باروری بدست آمده از تلقیح مصنوعی اسپرم یخ‌گشایی شده قوچ در گردن رحم و مهبل میش رضایت بخش نیست (7). در شرایط کنونی کشور احتمالا تنها راه کار عملی برای استفاده از روش تلقیح مصنوعی در گله‌های گوسفند ذخیره سازی منی قوچ به صورت مایع در 5°C است. مطالعات نشان داده‌اند که باروری منی ذخیره شده در5°C بعد از 72 ساعت به‌شدت کاهش می‌یابد (20). بنابر این بهبود روش های ذخیره سازی منی به صورت مایع ضروری به نظر می‌رسد.

مایع منی مخلوطی از ترشحات بیضه و غدد ضمیمه جنسی است که در زمان انزال با اسپرم مخلوط شده و به دستگاه تناسلی ماده منتقل می‌شود. مایع منی و اجزای تشکیل دهنده آن نه تنها تامین کننده نیازهای غذایی اسپرم است بلکه در کنترل فعالیت‌های اسپرم از جمله تحرک، ظرفیت پذیری، واکنش آکروزومی و لقاح نقش دارند (14). قبل از انزال دو بخش اصلی منی یعنی اسپرم و مایع منی هیچ گونه اختلاتی ندارند و تنها در هنگام جفت گیری طبیعی سلول‌های اسپرم و مایع منی با هم مخلوط شده و به مهبل دام ماده منتقل می‌شوند (14). تحرک رو به جلو اسپرم‌ها در دستگاه تناسلی از یک سو و ساختار بلند و پر پیچ خم گردن رحم در گوسفند از سوی دیگر سبب شده است که این بخش از دستگاه تناسلی ماده به عنوان یک سد عمل کند و مانع ورود مایع منی به داخل رحم شود (22). بنابراین در شرایط جفت گیری طبیعی، اسپرم پس از مخلوط شدن با مایع منی و انتقال به مهبل دام ماده با حرکت رو به جلو از گردن رحم عبور می‌کند و از مایع منی جدا خواهد شد (18).

در ذخیره سازی و عمل آوری منی زمان مجاورت اسپرم و مایع منی به صورت ناخواسته به شدت افزایش می‌یابد. گزارش شده است که مایع منی در زمان ذخیره‌سازی منی، اثر مخربی بر ماندگاری اسپرم دارد (23). پروتئین‌های موجود در مایع منی بلافاصله پس از انزال به سطح اسپرم متصل شده و با القا خروج فسفولیپیدها و کلسترول از غشا پلاسمایی موجب ناپایداری آن می‌شوند که در نتیجه

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
2- دانشیار گروه علوم دامی دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
3- کارشناس ارشد فیزیولوژی دام سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان
(*- نویسنده مسئول: roostaei@guilan.ac.irEmail:)

قدرت ماندگاری آن کاهش می‌یابد (18). جدا سازی سریع مایع منی از طریق روش پوشش‌دار کردن اسپرم با رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ روش مناسبی است (5). در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع آوری اسپرم در لوله حاوی رقیق کننده تریس – زرده تخم مرغ به حداقل می‌رسد (23). مطالعات در شرایط آزمایشگاهی به منظور انجماد اسپرم نشان داده است که استفاده از روش پوشش‌دار کردن اسپرم سبب بهبود تحرک اسپرم گاو و گوسفند می‌شود (5 و 24). همچنین مشخص شده است که استفاده از روش پوشش‌دار کردن اسپرم در هنگام جمع آوری منی سبب کاهش آسیب‌های ناشی از شوک سرما بر زنده مانی اسپرم قوچ می‌شود

هدف مطالعه حاضر بررسی اثر حذف مایع منی قبل از ذخیره سازی در سرما و افزودن مایع منی پس از سه روز ذخیره سازی (کمی قبل از تلقیح مصنوعی) بر باروری قوچ تالشی است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش طی تابستان و زمستان سال 1390 انجام شد. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل: تریس، D-گلوکز، فروکتوز، اسید سیتریک مونوهیدرات، گلوتارآلدهید (AppliChem, Germany)، هوخست بیس‌بنزامید (AppliChem, Germany)، اسید کاپروئیک (Merk, Germany)، آلکسافلور 488 (Molecular Probes, USA)، جنتامایسین (شرکت داروسازی کاسپین تامین)، سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، سدیم دی هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، تری سدیم سیترات دهیدرات (Merk, Germany)، زرده تخم مرغ و آب مقطر بودند.

دام ها

این پژوهش با استفاده از 4 راس قوچ تالشی بالغ، بارور و سالم با سنین 3-5 سال و متوسط وزن 5±50 کیلوگرم و 112 راس میش نژاد تالشی با 1-3 شکم زایش در ییلاقات گردنه الماس از توابع شهرستان تالش استان گیلان انجام شد. قوچها علاوه بر دو ساعت چرای آزاد در روز، بر اساس جدول کمیته ملی تحقیقات (NRC، 1985) روزانه 1300 گرم یونجه خشک، 590 گرم جو و 620 گرم کاه برنج به صورت خرد شده در سه وعده صبح، ظهر و شب دریافت می‌کردند. همچنین نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به صورت آزاد در اختیار دام‌ها قرار داده شد. میش‌ها 4 هفته قبل از تلقیح مصنوعی علاوه بر چرای آزاد روی مرتع، روزانه 500 گرم کنسانتره (شامل 67% جو، 20% سبوس، 12% تفاله چغندر قند، 0/5% نمک و 0/5% مکمل مواد معدنی) در دو وعده غذایی صبح و عصر دریافت کردند.

جمع آوری و آماده سازی منی

جمع آوری منی 72 ساعت قبل از تلقیح مصنوعی به وسیله واژن مصنوعی متصل به لوله آزمایش مخصوص اسپرم‌گیری که حاوی 1 میلی‌لیتر تریس- فروکتوز [3/258 گرم تریس-(هیدروکسی متیل)-آمینومتان، 1/870 گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، 0/93 گرم فروکتوز و 0/5 میلی‌لیتر جنتامایسین (50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در 100 میلی لیتر آب مقطر، pH= 7] با 15 درصد زرده تخم مرغ (حجم/حجم) انجام شد (24). به دلیل نیاز به حجم زیاد منی برای تلقیح مصنوعی، جمع آوری منی از هر قوچ در سه نوبت متوالی با فاصله زمانی 10 دقیقه انجام شد (9). بلافاصله نمونه‌ها در فلاکس حاوی آب با دمای 33°C قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌های منی به صورت جداگانه از نظر کیفیت تحرک و غلظت اسپرم موجود در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌هایی که دارای غلظت کمتر از 2×10^9 سلول در هر میلی‌لیتر و تحرک پیشرونده کمتر از 70% بودند حذف شدند (9). اسپرم های بدست آمده از هر قوچ تجمیع شد و با سرعت 700×g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی (مایع منی) حذف شد. رسوب (اسپرم) با استفاده از رقیق‌کننده تریس-گلوکز [تریس-(هیدروکسی‌متیل)- آمینو متان3/634 گرم ، اسید سیتریک مونوهیدرات1/996 گرم، جنتامایسین 50 میلی‌گرم در 100 میلی لیتر آب مقطر، pH= 7] حاوی 20 درصد زرده تخم مرغ و 0/03125 درصد اسید کاپروئیک (Merck, Germany) تا غلظت 800×10^6 اسپرم در هر میلی‌لیتر رقیق شد. هر نمونه به سه قسمت تقسیم شد و برای ایجاد شرایط بی‌هوازی در سرنگ‌های 2 میلی‌لیتری بسته‌بندی شد و سرسوزن محکم به سرنگ متصل شد و با استفاده از پلی ونیل الکل سوراخ سوزن کاملا مسدود شد. نمونه‌ها با سرعت 0/25°C در دقیقه تا 5°C با استفاده از دستگاه سرد کننده (Test Chamber EG53AH, KATO, Japan) سرد و ذخیره شدند.

پس از 68 ساعت (4 ساعت قبل از انجام تلقیح مصنوعی)، نمونه‌ها با قدرت 700×g به مدت 10 دقیقه در 5°C سانتریفیوژ شدند. به منظور حذف زرده و افزودن مایع منی در قسمت اول (E-S+) مایع رویی حذف و به رسوب رقیق‌کننده تریس-گلوکز اضافه شد تا غلظت اسپرم به $1/6\times10^9$ در هر میلی‌لیتر رسید سپس تریس-گلوکز حاوی 20% مایع منی به صورت 1:1 (حجم به حجم) به نمونه اضافه شد تا غلظت نهایی اسپرم به 800×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر و مایع منی به 10% رسید. به منظور حذف زرده تخم مرغ در قسمت دوم (E-S-) مایع رویی حذف و به رسوب رقیق‌کننده تریس-گلوکز اضافه شد تا غلظت نهایی اسپرم به 800×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر رسید. قسمت سوم (شاهد، E+S-) بعد از سانتریفیوژ، رسوب با مایع رویی مخلوط شد. نمونه‌ها در پایوت‌های 250 میکرولیتری علامت‌گذاری شده

بسته‌بندی و سر پایوت‌ها با استفاده از پلی ونیل الکل مسدود شد. پایوت‌های هر سه تیمار با استفاده از فلاسک حاوی آب با دمای 5°C برای انجام تلقیح مصنوعی طی 4 ساعت (72 ساعت بعد از نمونه‌گیری) به محل نگهداری گله منتقل و تلقیح شدند (21).

تلقیح مصنوعی

میش‌ها بطور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند و هر سه گروه شامل تمام سنین بودند. به منظور همزمان سازی فحلی سیدر گوسفندی [Eazi-breed, New Zealand] که حاوی 330 میلی‌گرم هورمون پروژسترون بود به وسیله اپلیکاتور در مهبل میش‌ها قرار داده شد. پس از 14 روز سیدرها خارج شد و مقدار 2 میلی‌گرم هورمون کوریونیک گنادوتروپین اسب (400IU) به طور عضلانی به هر میش تزریق شد. 52 ساعت پس از تزریق هورمون، میش‌های فحل تلقیح شدند. از 112 راس میش سیدر گذاری شده 111 راس علائم فحلی را نشان دادند و تنها یک راس میش علائم فحلی را نشان نداد.

عمل تلقیح مصنوعی توسط یک تکنسین با تجربه با استفاده از تفنگ تلقیح، اسپیکولوم[1]، چراغ قوه و پایوت‌ها حاوی 200×10^6 اسپرم در ابتدای دهانه گردن رحم انجام شد. منی در عمیق‌ترین نقطه ممکن تخلیه شد و از نفوذ اجباری ابزار تلقیح به درون گردن رحم اجتناب شد. تکنسین تلقیح هیچ اطلاعی از محتوای پایوت‌ها نداشت. اطلاعات هر میش شامل تاریخ تلقیح، شماره گوش میش، خصوصیات ظاهری میش ، سن میش، وضعیت زایش و تاریخ زایش به طور جداگانه ثبت شد.

تجزیه و تحلیل نتایج

مدل رگرسیون لوجستیک چند متغیره برای آنالیز نرخ برەزایی با استفاده از روش حداکثر درست نمایی رویه GENMOD نرم افزار SAS استفاده شد. مدل کلی رگرسیون لوجستیک مورد استفاده به شرح زیر (معادله 1) بود:

$$\text{Logit}(\pi)=\alpha+\beta1x1+\beta2x2+\ldots+\beta nxn \quad (1)$$

که π احتمال برەزایی، α پارامتر عرض از مبدا و $\beta1$ تا βn ضرایب رگرسیون لوجستیک (برآورد پارامترها) برای اثرات مستقل (x1 تا xn) دخیل شده در مدل آماری بودند. مدل مورد استفاده برای آنالیز نرخ برەزایی شامل اثرات ثابت کلاس شکم زایش میش، تیمار و قوچ بود. نرخ برەزایی میش‌ها بر اساس متغیر پاسخ گسسته 1 (برەزایی موفق) و صفر (عدم برەزایی) کدگذاری شدند. شکم زایش شامل سه سطح (شکم اول، دوم و سوم)، تیمارها شامل (E+S-، E-S- و E-S+) و اثر قوچ نیز شامل 4 قوچ مورد استفاده بود. اثرات توسط آزمون مربع کای[2] آزمون شدند. میانگین‌های حداقل مربعات اثرات مذکور برای مقایسه دو به دو آن‌ها در سطح 0/05 مورد استفاده قرار گرفت و سطح معنی‌داری برای بیان تفاوت معنی‌دار 5% بود.

میانگین درصد برەزایی با استفاده از فرمول زیر (معادله 2) محاسبه شد:

$$\text{میانگین درصد برەزایی} = \frac{\text{تعداد بره متولد شده}}{\text{تعداد میش تلقیح شده}} \quad (2)$$

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف متغیرهای مورد مطالعه شامل تیمار (E+S-، E-S- و E-S+)، شکم زایش میش (از اول تا سوم) و قوچها (4 راس) در جدول 1 آورده شده است. نتایج نشان داد بین نمونه‌های موجود در هر تیمار، میش‌های موجود در هر گروه شکم زایش و انزال‌های هر قوچ تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول1، $P<0/05$).

بیشترین نرخ برەزایی مربوط به تیمار E-S- بود و کمترین نرخ برەزایی در تیمار E-S+ مشاهده شد (جدول 2). مقایسات دو به دو تیمارها نشان داد بین تیمار E-S- و E-S+ تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول3، $P<0/05$). تفاوت معنی‌داری بین تیمار E+S- و E-S- و تیمارهای E+S- و E-S+ مشاهده نشد ($P>0/05$). اگر چه باروری در تیمار E-S- حدود 10% از تیمار E+S- بیشتر بود ولی تفاوت معنی‌داری بین باروری این دو تیمار وجود نداشت.

مشخص شده است، انجام سانتریفیوژ بلافاصله پس از سرد کردن و قبل از انجماد بدون حذف زرده تخم مرغ اثر معنی‌داری بر باروری منی ندارد (9). به علاوه در طول ذخیره سازی منی در°C 4، استفاده از رقیق کننده تازه و تعویض رقیق کننده با استفاده از روش سانتریفیوژ سبب بهبود ماندگاری اسپرم سگ و اسب شده است (17 و 26). طی ذخیره سازی منی به صورت مایع در سرما، تجمع مواد زائد حاصل از متابولیسم اسپرم و نیاز به مواد مغذی جدید اجتناب ناپذیر است (17). از طرفی چربی‌های موجود در زرده تخم مورد استفاده در رقیق کننده‌ها می‌توانند به عنوان سوبسترا در فرآیند اکسیداتیو سبب تولید بیشتر مواد سمی شود (1). بنابراین افزایش باروری به دنبال سانتریفیوژ و استفاده از رقیق کنند جدید شاید به دلیل حذف مواد مضر حاصل از متابولیسم اسپرم باشد.

در تحقیق حاضر برای اولین بار در هنگام عمل آوری منی، حذف زرده تخم مرغ قبل از افزودن مایع منی انجام شد تا اثر واقعی ترکیبات مایع منی بر اسپرم ذخیره شده روشن شود.

1- Speculum

2- Chi-square

جدول 1- میانگین حداقل مربعات اثر تیمار، سن میش و قوچ بر نرخ برهزایی

Table 1- Least squares means of effects of ram, treatment and age of ewe

Source of variation منابع تغییر		estimates	SE	Chi-squares	P-value
قوچ Ram	1	2.64	0.81	10.84	0.0012
	2	2.41	0.78	9.33	0.0023
	3	2.45	0.61	16.18	<0.0001
	4	1.62	0.51	10.35	0.0013
تیمار[1] Treatment[1]	E_+S_-	2.41	0.59	16.35	<0.0001
	E_-S_-	1.3	0.43	8.9	0.0028
	E_-S_+	3.12	0.77	16.28	<0.0001
سن میش Age of ewe (year)	<1.5	3.26	0.77	17.64	<0.0001
	1.5-2.5	1.7	0.48	12.44	0.0004
	2.5-3.5	1.88	0.53	12.54	0.0004

[1]E+S-: حاوی زرده تخم مرغ، E-S-: حذف زرده تخم مرغ، E-S+: حذف زرده تخم مرغ و افزودن مایع منی

[1]E+S-: containing egg yolk, E-S-: removing egg yolk, E-S+: removing egg yolk and adding seminal plasma

جدول 2 - اثر سه روز ذخیره سازی اسپرم پوشش‌دار شده در 5 °C ، افزودن 10% مایع منی و خذف زرد تخم مرغ بر نرخ برهزایی متعاقب تلقیح مصنوعی 200×10^6 اسپرم در دهانه گردن رحم

Table 2- Effect of three days storage of coated spermatozoa at 5 °C, adding 10 % seminal plasma and removing egg yolk on lambing rates by cervical insemination of 200×10^6 sperm

تیمار[1] Treatment[1]	تعداد میش‌های تلقیح شده Number of inseminated ewe	برهزایی Lambing	
		Number	Percentage
E+S-	37	4	10.81
E-S-	37	9	24.32
E-S+	37	2	5.4

[1]E+S-: حاوی زرده تخم مرغ، E-S-: حذف زرده تخم مرغ، E-S+: حذف زرده تخم مرغ و افزودن مایع منی

[1]E+S-: containing egg yolk, E-S-: removing egg yolk, E-S+: removing egg yolk and adding seminal plasma

جدول3- مقایسه میانگین حداقل مربعات تیمارهای مختلف بر نرخ برهزایی

Table 3- The comparison of least squares means of treatments on lambing rate

تیمار[1] Treatment[1]	Estimate	S.E	Chi-square	P-value
E-S- - E+S-	-1.12	0.68	3.68	0.10
E-S+ - E+S-	0.7	0.93	0.57	0.45
E-S+ - E-S-	1.82	0.85	4.56	0.03

[1]E+S-: حاوی زرده تخم مرغ، E-S-: حذف زرده تخم مرغ، E-S+: حذف زرده تخم مرغ و افزودن مایع منی

[1]E+S-: containing egg yolk, E-S-: removing egg yolk, E-S+: removing egg yolk and adding seminal plasma

نتایج نشان داد سه روز ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دار شده قوچ در 5°C و افزودن 10% مایع منی بعد از حذف زرده تخم مرغ سبب کاهش باروری می‌شود. تا کنون مطالعات انجام شده در خصوص بررسی افزودن مایع منی بر باروری اسپرم با نتایج متناقضی همراه بوده است.

افزودن 20% مایع منی به اسپرم یخ‌گشایی شده قوچ در حضور 15% زرده تخم مرغ پس از تلقیح در دهانه گردن رحم اثر معنی‌داری بر باروری نداشت (7). همچنین افزودن 30% مایع منی به اسپرم رقیق شده قوچ با شیر پس چرخ حاوی 5% زرده تخم مرغ سبب کاهش معنی‌داری در باروری شده است (21). افزودن 25% مایع منی به اسپرم خوک قبل از انجماد بدون حذف زرده تخم مرغ اثر معنی‌داری بر تحرک و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم نداشته است (10). از طرفی گزارش شده است که افزودن 20 تا 30 درصد مایع منی به اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی و تلقیح از طریق دهانه گردن رحم موجب بهبود باروری شده است (19). دلیل نتایج متناقض به دست آمده احتمالا مرتبط با تداخل اثر زرده تخم مرغ با پروتئین‌های مایع

منی است (18). زیرا بر اساس بررسی‌های لیپوپروتئین‌های زرده تخم مرغ با پروتئین‌های مایع منی کمپلکس‌های پایداری را تشکیل می‌دهند (3). همچنین گزارش شده است با افزایش نرخ رقیق‌سازی اسپرم قوچ با رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم مرغ عملکرد اسپرم پس از یخ‌گشایی بهبود می‌یابد (16). به همین دلیل پیشنهاد شده است در هنگام افزودن مایع منی، به غلظت زرده تخم مرغ توجه شود (24). از طرفی، مجاورت پروتئین‌های مایع منی با اسپرم می‌تواند سبب بروز آسیب در غشا پلاسمایی شود (18). همچنین گزارش شده است مایع منی دارای آثار مضر در روند انجماد و یخ گشایی اسپرم قوچ (24) و بز (23) است. بنابر این به نظر می‌رسد کاهش باروری در اثر حذف زرده و افزودن مایع منی احتمالا در نتیجه عدم حمایت کافی از اسپرم در برابر تنش‌های محیطی و آثار مضر بعضی از اجزای مایع منی بر اسپرم پوشش دار شده قوچ باشد

در این تحقیق، کمترین درصد برهزایی مربوط به شکم زایش اول (کمتر از 1/5 سال) و بیشترین درصد نرخ برهزایی مربوط به شکم زایش دوم (1/5 تا 2/5 سال) بود (جدول 4). مقایسه دو به دو شکم-های زایش نشان داد تفاوت میانگین درصد نرخ برهزایی بین شکم زایش اول و دوم تمایل به معنی‌داری داشته (جدول $P=$ ۰/۵،۰۷) و تفاوت معنی‌داری بین شکم زایش اول (کمتر از 1/5 سال) و سوم (2/5 تا 3/5 سال) و همچنین بین شکم زایش دوم (1/5 تا 2/5 سال) و سوم (2/5 تا 3/5 سال) مشاهده نشد (جدول $P>$0/05،5) ولی نرخ برهزایی در شکم اول کمتر از شکم زایش دوم بود. سایر مطالعات این نتایج را تایید می‌کنند (2 و 4). گزارش شده است سن میش در نرخ برهزایی موثر است (25). نقص در تولید موکوس کانال گردن رحم در طی دوره فحلی و متعاقبا نقص در انتقال اسپرم در دستگاه تناسلی میش‌های جوان که برای اولین بار آبستن می‌شوند دلیل باروری پایین آنها در مقایسه با میش‌های با سنین بالاتر است (13). بعلاوه نیازهای بالای انرژی برای رشد بدن و ناکافی بودن انرژی لازم برای آبستنی در میش‌های جوان دلیل دیگر باروری پایین این دام‌ها است (4).

نتایج حاصل از مقایسه دو به دو اثر قوچ‌های مورد استفاده در این تحقیق بر نرخ برهزایی، تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد ($P>$0/05) که با نتایج دانوان و همکاران (6) همخوانی دارد. احتمالا دلیل مشاهده نشدن تفاوت معنی‌دار اثر قوچ بر نرخ برهزایی در این پژوهش مربوط به تعداد کم قوچ‌ها و میش‌ها است (9).

در این آزمایش تفاوت فردی بین قوچ‌ها و میش‌های موجود در هر گروه شکم زایش از نظر نرخ برهزایی معنی‌دار بود. ایوانس (8) اعلام کرد تفاوت معنی‌داری بین میش‌ها از نظر باروری در پی تلقیح مصنوعی وجود دارد که مربوط به تفاوت‌های فردی میش‌ها است (8). به علاوه قسمتی از تفاوت نرخ برهزایی بین منی تهیه شده از هر قوچ مربوط به ترکیب منی تهیه شده در هر انزال است (6). مشخص شده است که ترکیب مایع منی بین نرهای یک گونه و حتی بین انزال‌های یک نر متفاوت بوده که می‌تواند تفاوت در نرخ برهزایی را در پی داشته باشد (12).

در مطالعه حاضر برای ایجاد وضعیتی تقریبا مشابه با جفت گیری طبیعی، در زمان نمونه‌گیری مایع منی با کمک روش پوشش‌دار کردن حذف شد و کمی قبل از تلقیح مصنوعی مجددا مایع منی به اسپرم پوشش‌دار شده اضافه شد ولی نتایج نشان داد که باروری اسپرم پوشش‌دار شده پس از 72 ساعت ذخیره سازی در سرما در حضور و یا عدم حضور مایع منی رضایت بخش نبود. باروری اسپرم انزالی قوچ پس از ذخیره‌سازی به مدت 24، 48 و 72 ساعت در سرما به ترتیب 50 – 45%، 30 – 25% و 20 – 15% گزارش شده است (20).

جدول4- اثر سن میش بر نرخ برهزایی حاصل از تلقیح مصنوعی 200×10^6 اسپرم پوشش‌دارشده در دهانه گردن رحم پس از 72 ساعت ذخیره‌سازی در 5 °C

Table 4- Effect of age of ewe on the lambig rate of inseminated ewe with 200×10^6 coated spermatozoa after 72 h storage at 5 °C

سن میش Age of ewe (year)	تعداد میش‌های تلقیح شده Number of inseminated ewe	برهزایی Lambing	
		Number	Percentage
<1.5	39	2	5.12
1.5-2.5	37	7	18.91
2.5-3.5	34	6	17.64

جدول5- تفاوت میانگین حداقل مربعات سن‌های مختلف میش‌ها بر نرخ برهزایی

Table 5- The comparison of least squares means of different ages of ewes on lambing rate

سن میش Age of ewe (year)	Estimate	S.E	Chi-square	P-value
1.5 and 2.5	1.56	0.87	3.22	0.07
1.5 and 3.5	1.38	0.88	2.44	0.11
2.5 and 3.5	-0.17	0.66	0.07	0.79

سایر مطالعات نیز کاهش باروری اسپرم قوچ را بعد از ذخیره سازی در سرما را تایید کرده‌اند و مشخص شده است که به ازای هر روز ذخیره سازی اسپرم قوچ در سرما باروری به میزان 10 تا 35% کاهش می‌یابد (22). طی ذخیره سازی انجام فرآیند گلیکولیز سبب تولید اسید لاکتیک و اسیدی شدن محیط اطراف اسپرم می‌شود (15). افزایش اسید لاکتیک سبب افزایش میزان کلسیم داخل سلولی می‌شود (56). افزایش کلسیم داخل سلولی سبب تسریع در فرآیند پیری سلول می‌شود (11) بنابراین کاهش باروری اسپرم پوشش دار شده بعد از سه روز ذخیره سازی در سرما احتمالا به دلیل بروز تغییرات مخرب ناشی از شرایط ذخیره سازی است.

نتیجه‌گیری کلی

ذخیره سازی اسپرم پوشش دار شده به مدت 3 روز در 5 °C سبب کاهش چشمگیر باروری می‌شود و افزودن 10% مایع منی به اسپرم پوشش دار شده نیز سبب بهبود باروری نخواهد شد.

منابع

1- Aboagla, E. M., and T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology, 62 (6): 1160-1172.
2- Anel, L., M. Kaabi., B. Abroug., M. Alvarez., E. Anel., J. C. Boixo., L. F. de la Fuente., and P. de Paz. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. Theriogenology, 63 (4):1235-1247.
3- Bergeron, A., M. Crete., Y. Brindle., and P. Manjunath. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's EY decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. Biology of Reproduction, 70 (3): 708–717.
4- Bocquier, F., M. Theriez., S. Prache., and A. Brelurut. 1988. Alimentation des ovins. In: Jarrige J, editor. limentation des bovins, ovins et caprins. Ed. 1, INRA, France, 1: 249–80.
5- De Pauw, I. M. C., D. M. Van Soom., S. Verberckmoes., and A. de Kruif. 2003. Effect of sperm coating on survical and penetrating ability of in vitro stored bovine spermatozoa. Theriogenology, 59 (5-6): 1109–1122.
6- Donovan, A., J.P. Hanrahan., E. Kummen., P. Duffy., and M. P. Boland. 2004. Fertility in the editor. limentation des bovins, ovins et caprins. Ed. 1, INRA, France, 1: 249–80.
7- El-Hajj Ghaoui, R., P. C. Thomson., T. Leahy., G. Evans., and W. M. C. Maxwell. 2007. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen–thawed ram spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 42 (5): 541–549.
8- Evans, G. 1991. Application of reproductive technology to the Australian livestock industries. Reproduction, fertility and development, 3 (6): 627–650.
9- Gil, J., M. Rodriguez-Irazoqui., L. Söderquist., and H. Rodriguez-Martinez. 2002. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. Theriogenology, 57 (7): 1781–1792.
10- Gomez-Fernandez, J., E. Gomez-Izquierdo., C. Tomas., A. Gonzalez-Bulnes., R. Sanchez-Sanchez., and E. de Mercado. 2012. Inclusion of seminal plasma in sperm cryopreservation of Iberian pig. Animal Reproduction Science, 130 (1-2): 82– 90.
11- Gordo, A. C., P. Rodrigues., M. Kurokawa., T. Jellerette., G. E. Exley., C. Warner., and R. Fissore. 2002. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in vitro aged mouse eggs. Biology of Reproduction, 66 (6): 1828-37.
12- Graham, J. K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. Theriogenology, 41 (5): 1151–1162.
13- Kaabi, M., M. Alvarez., E. Anel., C. A. Chamorro., J. C. Boixo., P. de Paz., and L. Anel. 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. Theriogenology, 66 (8): 1876-1883.
14- Kirkwood, R. N., M. L. Vadnais., and M. Abad. 2008. Practical application of seminal plasma. Theriogenology, 70 (8): 1364–1367.
15- Krzyzosiak, J., P. Molan., and R. Vishwanath. 1999. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. Animal Reproduction Science, 55 (3-4): 163-73.
16- Leahy, T., J. I. Marti., N. Mendoza., R. Pérez-Pé., T. Muiño-Blanco., J. A. Cebrián-Pérez., G. Evans., and W. M. Maxwell. 2010. High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa. Animal Reproduction Science, 119 (1-2): 137-146.
17- Love C. C., T. L. Blanchard., D. D. Varner., S. P. Brinsko., J. Voge., S. Bliss., K. Sudderth., S. Teague., and K. LaCaze 2012. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality

following cooled storage. Theriogenology, 77 (9): 1911–1917.
18- Manjunath, P., V. Nauc., A. Bergeron., and M. Menard. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biology of Reproduction, 67 (4): 1250-1258.
19- Maxwell, W. M. C., and L. A. Johnson. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. Theriogenology, 52 (8):1353-62.
20- Maxwell, W. M. C., and S. Salamon. 1993. Liquid storage of ram semen—a review. Reproduction, Fertility and Development, 5 (6): 613–38.
21- O'Meara, C. M., A. Donovan., J. P. Hanrahan., P. Duffy., S. Fair., A. C. O. Evans., and P. Lonergan. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. Theriogenology, 67 (7): 1262–1268.
22- Paulenz, H., T. Adnøy., T. Fossen., and L. Söderquist. 2008. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. Reproduction in Domestic Animals, 45 (4): 706-710.
23- Ritar, A. J., and S. Salamon, 1982. Effect of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen thawed spermatozoa of Angor goat. Australian Journal of Biological Sciences, 35 (3): 305–312.
24- Roostaei-Ali Mehr M., and F. Sharafi. 2013. The effect of seminal plasma on the quality of coated ram frozen-thawed spermatozoa. Iranian Journal of Veterinary Research, 14 (4): 305-312.
25- Shackell, G. H., B. Kyle., and R. P. Littlejohn. 1990. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination synchronized oestrus. Animal Reproduction Science, 84 (4): 359-368.
26- Verstegen, J. P., K. Onclin., and M. Iguer-Ouada. 2005. Long-term motilityand fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. Theriogenology, 64 (3): 720 –33.
27- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil, E., Neil, J. (Eds.). Physiology of Reproduction. USA, New York, pp. 135-85.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 197-205

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 205-197

Effect of Three Days Storage of Coated Spermatozoa at Cooling and Adding Seminal Plasma on Ram Fertility

R. Vaferi[1]- M. Roostaei Ali Mehr[2*]- N. Ghavi Hossein Zadeh[2]- F. Talebi[3]

Received: 20-07-2014
Accepted: 60-01-2016

Introduction Artificial insemination (AI) has only been used as a supplement to natural mating. AI, when used in conjunction with accurate progeny testing schemes, can substantially increase the rate of genetic progress compared with that of natural service. Moreover, the use of AI causes the limitation of the transmitted diseases. Cervical insemination with frozen-thawed ram semen has not been widely adopted, probably because of the relative poor fertility obtained. Thus using fresh and diluted semen is only approach for performing AI.

AI is currently limited by the poor fertility achieved after cervical insemination with the storage of liquid semen at sub-ambient temperature. The success of this procedure in sheep is restricted by the short length of time that ram sperm can be stored in a liquid state. Moreover, the effect of cooling on sperm differs depending on species. It is also well known that ram spermatozoa are more sensitive to cold-shock stress than those of other species.

Seminal plasma, as physiological secretion, is a complex mixture of secretions originating from testis, epididymis and accessory sex glands which is mixed with epididymal sperm at ejaculation; it serves as the carrier of sperm to the female genital tract. This mixture contains numerous factors such as organic and nonorganic material which play an important role in the final maturation of the spermatozoa through hormonal, enzymatic and surface-modifying events. During natural mating, a mechanism may be activated to separate spermatozoa from seminal plasma. After being ejaculated into the vagina, sperm swim through cervical mucus and enter the uterus within minutes (>30 min); cervical mucus acts as a barrier for seminal plasma. In the artificial insemination industry, seminal plasma with all the useful and harmful components is not removed from semen and is in contact with sperm throughout cooling, freezing and storage.

On the other hand, it was demonstrated that the auto-destructive activity of seminal plasma was decreased which may be reduced by coating spermatozoa for less than 5 min during collection with the commercial diluent supplemented with egg yolk. The detrimental effect of lipid efflux induced by seminal plasma may be abolished by decreasing the time of the contact between seminal plasma and sperm.

The objective of this study was to determine whether coating method, as a collection method, can improve fertility of ram spermatozoa after 72 h storage.

Materials and Methods Experiment was conducted to evaluate the effect of seminal plasma on coated spermatozoa fertility by using 111 ewes, aged between 1 and 3 years. Semen from four mature, healthy and fertile Thaleshi rams, aged between 2 and 5 years, were used for AI. The animals were housed at the Faculty of Agricultural Sciences, Education Research and Practice Farm, University of Guilan, South of Rasht (it is located at 37° 12´ North latitude and 49° 39´ East longitude) and fed daily with alfalfa hay and 0.5 kg of concentrate, and provided salt lick and water *ad libitum*. Semen was collected throughout the breeding season (August, 2011) by using an artificial vagina. Ejaculates from each ram were collected in a tube containing 5 ml of coating medium (269 mM Tris (Hydroxymethy1) aminomethane, 52 mM D-Fructose, 89 mM Citric Acid, 2000 IU/ml penicillin G and 0.4 mg/ml streptomycin pH=7.0) at72 h before insemination. Two or three consecutive ejaculates fromeach ram were collected. The ejaculates were placed in a water bath (35◦C) immediately after collection. Semen quality was assessed, and to be accepted as a donor, and the ejaculation of each ram ejaculation had to fulfill the following demands concerning semen quality: volume ≥ 0.5 ml, macroscopic good visual mass activity (sperm motility ≥ 75%), sperm concentration ≥ 3×10^9/ml and normal sperm morphology ≥ 90%. Coated ejaculates were centrifuged for 10 min at 700 × g at room temperature and the supernatant was removed. The pellets were diluted by Tris-glucose up to 800×10^6 sperm/mL then they were split into three parts

1- Graduated MSc physiology, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht,
2- Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht,
3- Master of Science of Animal Science, Assistant of Animal physiology, Organization of Jihad-e-Keshavarzi, Guilan, Rasht,
(*-Corresponding author email: roostaei@guilan.ac.ir)

(E-S+, E-S-and E+S-) and incubated at 5 °C. After 68 h, samples were centrifuged by 700 × g 10 min at 5 °C. In E-S+, supernatant was removed and added 10% crude seminal plasma. In E-S-, supernatant was removed and added Tris-glucose. In E+S-, pellet was mixed with supernatant. Samples were packaged into straws, incubated at 5 °C for 4 h and inseminated 72 h after collection. Ewes were allocated to three groups and inseminated after synchronizing estrus by using CIDER (14 d) and injection hCG (400 IU).

Results and Discussion The results showed that the lambing rate was higher in ewes of second parity (18.91%) than ewes of first parity (5.12%). There was no significant difference between E-S- (24.32%) and E+S- (10.81%) although the percentage of lambing rate was higher about 10 % in E-S- than E+S-. There was no significant difference between E-S+(5.12%) and E+S- on lambing rate. The pair-wise comparison of the lambing rates between the three groups showed significant higher results for E-S- compared with E-S+. Therefore, fertility of coated spermatozoa was not improved by adding 10% crude seminal plasma after three days storage at 5 °C.

Key word: Coated spermatozoa Fertility, Seminal plasma, Semen storage.