

الله الرحمن الرحيم



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده علوم دامی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته علوم دامی - فیزیولوژی دام

بررسی سطوح مختلف زرده تخم مرغ و گلیسرول در رقیق کننده تریس بر برخی از خصوصیات اسپرم قوچ زل در شرایط انجماد

پژوهش و نگارش:

مهناز احمدی همدانی

استاد راهنما:

دکتر یوسف جعفری آهنگری

استاد مشاور:

دکتر سعید زره داران

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت های علمی - پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می شوند:

- 1) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
- 2) در انتشار نتایج پایان نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
- 3) انتشار نتایج پایان نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **مهناز احمدی همدانی** دانشجوی رشته **علوم دامی - فیزیولوژی دام** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می شوم.

تقدیم به:

این برگ سبز با خالصترین توابع تقدیم می‌کنم به:

پدر و مادرم: که سالها در پناه وسعت سایه حضورشان مسرور بودم و ذره ذره، مستقیم را از آنها به عاریت دارم و وجودشان را همچون چراغی، فراروی راه خود قرار داده‌ام، که به برکت آن، رستگاری را قرین خود سازم که هزاران بوسه بردستانشان سزاوارشان است.

برادرانم: که با دلگرمی‌هایشان تمام سختی‌ها و مشقت‌های راه را برایم آسان نمودند.

خانم برادرانم: که همچون خواهرانی مهربان، تکیه‌گاه و روشنگر راهم بودند و قلب پر مهرشان جایگاه آرامش و اطمینانم بوده است.

و تقدیم به شیرینی زندگیم برادرزاده عزیزم

آیدا

تقدیر و تشکر

باجه و سپاس از خدای بی کران که ثابکار خلقتش را به گونه ای آفرید که منشأ پدایش علم، دین، اخلاق و بسز که دید و با التفات ویژه و اعطای نعمت تعقل و تفکر، او را از جلات، نادانی و تاریکی رهایی دهد و نور علم و دانش را بنمون نمود. اکنون که به یاری پروردگاری که تا مراحل پژوهش و تجارشات پایان نامه را به پایان رسانده ام، رسم ادب بر خود لازم می دانم از تمامی عزیزانی که در مراحل مختلف پایان نامه مرا یاری نموده و مورد لطف قرار داده اند، تشکر نمایم.

از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر یوسف جعفری آهنگری که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند و به خاطر رهنمودهای استادانه و نظرات سازنده و سع صدرایشان، صمیمانه تشکر می نمایم.

از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر سعید زره داران که مشاورت این تحقیق را بر عهده داشتند و بارها بنامها و پیشنهادهای ارزنده علمی خویش یاری دهنده این تحقیق بودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می کنم.

از اساتید و کارشناسان محترم گروه علوم دایم آقاییان: دکتر صدیقی، دکتر تربتی نژاد، دکتر دستا، دکتر حسینی، دکتر قورچی، دکتر باشمی، دکتر شمس، دکتر آهینی آزادی و دکتریزدانی و همچنین مهندس حسن پور و مهندس مستانی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از بهکلاسی با دوستان خوبم خانوم باو آقاییان: دهنوی، زنگنه، قحقی، شاه مرادی، ملک، محب الدینی، ولی کمال، جنابی، مهدوی، حسینی و لطفی تشکر و قدردانی می نمایم.

از کاکلکان محترم ایستگاه تحقیقات علوم دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان نیز کمال تشکر و قدردانی را دارم.

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی سطوح مختلف گلیسرول و زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس بر برخی از خصوصیات اسپرماتوزوای قوچ زل جمع آوری شده در دو فصل بهار و پاییز در شرایط قبل و پس از انجماد انجام گردید. منی از چهار رأس قوچ سالم و بالغ با میانگین وزنی 50 ± 5 کیلوگرم با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی جمع آوری گردید. نمونه های مناسب با هم مخلوط و پس از اعمال تیمارهای مختلف در تریس رقیق شدند. بخشی از نمونه های اسپرم رقیق شده، قبل از انجماد ارزیابی شدند. مابقی نمونه های رقیق شده اسپرم تا دمای 5 درجه سانتی گراد سرد شدند و سپس به درون پایوتهای 0/5 میلی لیتری وارد شدند. ابتدا پایوته ها بر روی بخار ازت مایع منجمد و سپس در دمای -196 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از 10 روز پایوته ها یخگشایی شدند و خصوصیات زندهمانی، تحرک و مورفولوژی اسپرماتوزوا مورد بررسی قرار گرفتند. داده های حاصل از این آزمایش با استفاده از روش فاکتوریل 3×3 در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی تجزیه واریانس شدند. عامل اول، سطوح مختلف گلیسرول (4، 6 و 8 درصد) و عامل دوم، سطوح مختلف زرده تخم مرغ (10، 15 و 20 درصد) بودند. اثر فصل به عنوان بلوک بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اثر گلیسرول بر خصوصیات زندهمانی و تحرک اسپرم در شرایط قبل و پس از انجماد معنی دار بود ($P < 0/05$)، اما تاثیر آن بر خصوصیات مورفولوژی اسپرم معنی دار نبود ($P > 0/05$). بالاترین درصد تحرک و زندهمانی به ترتیب با میانگین $73/33 \pm 0/56$ و $82/33 \pm 0/55$ در شرایط قبل از انجماد و بالاترین درصد تحرک و زندهمانی اسپرم به ترتیب با میانگین $25/46 \pm 1/12$ و $34 \pm 1/08$ در شرایط پس از انجماد، در تیمار حاوی 4 درصد گلیسرول بدست آمد. اثر زرده تخم مرغ و اثر متقابل زرده تخم مرغ و گلیسرول در شرایط قبل و پس از انجماد معنی دار نبود ($P > 0/05$). اثر فصل بر خصوصیات حیاتی اسپرم معنی دار بود ($P < 0/05$). اما با توجه به اختلاف کمی که بین قابلیت انجمادپذیری اسپرم در دو فصل بهار و پاییز وجود داشت، به نظر می رسد که انجماد اسپرم قوچ نژاد زل در منطقه گرگان تحت تاثیر فصل قرار نمی گیرد. در نتیجه به منظور نگهداری بلند مدت اسپرم قوچ زل، استفاده از 4 درصد گلیسرول در رقیق کننده تریس و انجماد منی در فصول بهار و پاییز پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: گلیسرول، اسپرم، زرده تخم مرغ، فصل، قوچ زل

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول- مقدمه

- ۱-۱- مقدمه ۲
- ۲-۱- هدف ۳

فصل دوم- بررسی منابع

- ۱-۲- گوسفند نژاد زل ۶
- ۲-۲- مشخصات اندام ۶
- ۳-۲- مشخصات قوچ و خصوصیات آن ۷
- ۱-۳-۲- پلاسمای منی ۷
- ۲-۳- ۲- اسپرم ۸
- ۳-۳- ۲- عوامل مؤثر بر تولید اسپرم ۹
- ۱-۳-۳- ۲- تغذیه ۹
- ۲-۳-۳- ۲- فصل و دما ۱۰
- ۳-۳-۳- ۲- ملاتونین ۱۱
- ۴-۳- ۲- جمع‌آوری منی ۱۲
- ۱-۴-۳- ۲- استفاده از مهبل مصنوعی ۱۲
- ۲-۴-۳- ۲- استفاده از جریان الکتریکی ۱۲
- ۵-۳- ۲- ارزیابی منی ۱۲
- ۱-۵-۳- ۲- حجم و pH منی ۱۳
- ۲-۵-۳- ۲- حرکت موجی اسپرم ۱۳
- ۳-۵-۳- ۲- تحرک اسپرم ۱۳
- ۴-۵-۳- ۲- مورفولوژی اسپرم ۱۴
- ۵-۳- ۲- ناهنجاریهای ساختمانی اسپرم ۱۴
- ۶-۳- ۲- نقش رقیق‌کننده‌ها در فعالیت اسپرم ۱۵
- ۱-۶-۳- ۲- رقیق‌کننده‌های مصنوعی ۱۶

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

۱۶.....	۲-۶-۳-۲- رقیق کننده‌های طبیعی.....
۱۷.....	۷-۳-۲- رقیق‌سازی منی.....
۱۷.....	۱-۷-۳-۲- عوامل موثر بر زنده‌مانی اسپرم در طی رقیق‌سازی.....
۱۷.....	۱-۱-۷-۳- ۲- تماس با فلزات.....
۱۸.....	۲-۱-۷-۳- ۲- تماس با آب.....
۱۸.....	۳-۱-۷-۳-۲- گازها.....
۱۸.....	۴-۱-۷-۳-۲- نور.....
۱۸.....	۵-۱-۷-۳-۲- عوامل ضدباکتریایی.....
۱۸.....	۶-۱-۷-۳-۲- درجه حرارت.....
۱۹.....	۸-۳-۲- شوک سرمایی.....
۱۹.....	۴-۲- نقش زرده تخم‌مرغ در حفاظت از اسپرم.....
۲۳.....	۵-۲- انجماد منی قوچ.....
۲۴.....	۱-۵-۲- عوامل محافظت انجمادی در حفاظت اسپرم قوچ.....
۲۶.....	۲-۵-۲- تغییر و تحولات در یک سلول اسپرم هنگام انجماد.....
۳۰.....	۳-۵-۲- محدودیت‌های استفاده از گلیسرول.....
۳۱.....	۴-۵-۲- روشهای مختلف انجماد منی قوچ.....
۳۲.....	۱-۴-۵-۲- انجماد به روش پلت.....
۳۲.....	۲-۴-۵-۲- انجماد به روش پایوت.....
۳۳.....	۵-۵-۲- یخ‌گشایی.....
۳۳.....	۶-۵-۲- روشهای شناخته شده یخ‌گشایی.....
۳۴.....	۶-۲- تاثیر استفاده از گلیسرول در فرآوری و ذخیره اسپرم.....
۳۵.....	۷-۲- تاثیر استفاده از زرده تخم‌مرغ در فرآوری و ذخیره اسپرم.....
۳۶.....	۸-۲- بررسی اثر فصل بر خصوصیات زنده‌مانی، تحرک، مورفولوژی و قابلیت انجماد اسپرماتوزوا.....

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل سوم- مواد و روش‌ها

۳۸	۱-۳- محل و زمان اجرای پژوهش
۳۸	۲-۳- موقعیت جغرافیایی گرگان
۳۸	۳-۳- حیوانات مورد استفاده در تحقیق
۳۸	۴-۳- شرایط نگهداری و تغذیه قوچها
۳۹	۵-۳- مواد، وسایل و تجهیزات
۴۱	۶-۳- مراحل و روش انجماد تحقیق
۴۲	۱-۶-۳- تیمارهای آزمایش
۴۲	۲-۶-۳- جمع‌آوری اسپرم به وسیله شوک الکتریکی
۴۳	۳-۶-۳- ارزیابی اولیه و چشمی منی
۴۳	۴-۶-۳- رنگ منی
۴۴	۵-۶-۳- مراحل رقیق سازی منی
۴۴	۱-۵-۶-۳- تهیه رقیق‌کننده یک مرحله‌ای منی قوچ
۴۴	۲-۵-۶-۳- خنک کردن منی تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد
۴۵	۶-۶-۳- ثبت مشخصات منی بر پایوت‌ها
۴۵	۷-۶-۳- پر کردن پایوت‌ها
۴۶	۸-۶-۳- انجماد پایوت‌ها
۴۶	۹-۶-۳- یخ‌گشایی پایوت‌ها
۴۶	۷-۳- ارزیابی منی
۴۶	۱-۷-۳- اندازه‌گیری درصد تحرک
۴۷	۲-۷-۳- روش تهیه اتوزین - نیگروزین
۴۷	۳-۷-۳- اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده
۴۸	۴-۷-۳- مورفولوژی اسپرم
۴۹	۸-۳- تعیین کیفیت زرده تخم‌مرغ
۴۹	۹-۳- روش تجزیه و تحلیل آماری
۴۹	۱-۹-۳- مدل آماری طرح

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل چهارم - نتایج

۱-۴- تاثیر سطوح مختلف گلیسرول، زرده تخم مرغ و فصل بر خصوصیات اسپرم در رقیق کننده تریس قبل از انجماد.....	۵۲
۱-۴-۱- درصد اسپرم های متحرک.....	۵۲
۱-۴-۲- درصد اسپرم های زنده.....	۵۳
۱-۴-۳- درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرم.....	۵۳
۲-۴- تاثیر سطوح مختلف گلیسرول، زرده تخم مرغ و فصل بر خصوصیات اسپرم در رقیق کننده تریس پس از انجماد.....	۵۴
۲-۴-۱- درصد اسپرم های متحرک.....	۵۴
۲-۴-۲- درصد اسپرم های زنده.....	۵۵
۲-۴-۳- درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرم.....	۵۶
۳-۴- کیفیت زرده تخم مرغ.....	۵۷

فصل پنجم - بحث

بحث.....	۶۰
نتیجه گیری.....	۶۸
پیشنهادات.....	۶۹
منابع.....	۷۱

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

شکل ۱-۲- ساختمان اسپرم	۹
شکل ۲-۲- حفاظت اسپرم توسط زرده تخم مرغ و شیر	۲۳
شکل ۳-۲- منحنی قابلیت زنده‌مانی اسپرم در طی انجماد	۲۶
شکل ۴-۲- اثرات محلول و سرعت سردسازی بر انجماد اسپرم	۲۸
شکل ۵-۲- تغییر در غلظت نمکها در سلول اسپرماتوزوای منجمد شده در رقیق‌کننده با گلیسرول و بدون گلیسرول	۲۹
شکل ۱-۳- قوچ زل	۳۸
شکل ۲-۳- جداسازی زرده تخم مرغ	۴۰
شکل ۳-۳- پایوت	۴۱
شکل ۴-۳- شوک الکتریکی	۴۱
شکل ۵-۳- اسپرم‌گیری با شوک الکتریکی	۴۳
شکل ۶-۳- ثبت دستی مشخصات منی بر پایوت	۴۵
شکل ۷-۳- مسدود کردن پایوت با پودر پلی‌وینیل‌الکل	۴۶
شکل ۸-۳- ارزیابی اسپرم	۴۸
شکل ۹-۳- اسپرم‌های مرده	۴۸
شکل ۱۰-۳- ناهنجاریهای اسپرم	۴۸

فهرست جداول

صفحه

عنوان

جدول ۱-۲- مشخصات کلی گوسفند زل	۶
جدول ۲-۲- ترکیبات شیمیایی موجود در پلاسمای منی قوچ	۷
جدول ۳-۲- همولوگهای BSP پروتئین پلاسمای منی در گونه‌های مختلف	۲۲
جدول ۱-۳- ترکیب رقیق‌کننده تریس برای نگهداری قوچ در شرایط انجماد به جز ترکیب زرده تخم‌مرغ و گلیسرول	۴۲
جدول ۱-۴- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک قبل از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۲
جدول ۲-۴- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های زنده قبل از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۳
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین درصد ناهنجاری‌های اسپرم قبل از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۴
جدول ۴-۴- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک پس از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۵
جدول ۵-۴- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۶
جدول ۶-۴- مقایسه میانگین درصد ناهنجاری‌های اسپرم پس از انجماد در رقیق‌کننده تریس	۵۷
جدول ۷-۴- میانگین ترکیبات زرده تخم‌مرغ	۵۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

در پنجاه سال گذشته، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه‌ی فنون یاری‌رسانی تولیدمثل (ARTs)^۱ انجام شده است. ادامه این روند، می‌تواند منجر به ایجاد فرصت‌های جدید برای پیشرفت در زمینه‌ی تولیدمثل انسان و حیوانات شود. این روش به دنبال دستیابی به ابزارها و روش‌های دقیق و مؤثر، به منظور دست‌کاری و بررسی گامت‌ها است. زمینه محافظت سرمایه‌ی سلول‌های تولیدمثل مانند اسپرم و اووسیت و بافت‌هایی مانند تخمدان و بیضه، راهکارها و روش‌های محافظت سرمایه‌ی اسپرم، پیشینه‌ای طولانی دارد و به طور گسترده در تلقیح مصنوعی، انتقال جنین دام و تولیدمثل انسان، کاربرد دارد (آگکا و کریستر، ۲۰۰۲). تلقیح مصنوعی یکی از روش‌های سودمند و مؤثر برای بهبود کارایی تولید دام‌ها است (ممویی، ۱۳۷۹)، که لازمه استفاده بهینه از آن، امکان ذخیره‌سازی اسپرم به صورت مایع و منجمد می‌باشد اما محدودیت‌های زمانی ذخیره‌سازی به صورت مایع، موجب گرایش به سوی انجماد اسپرم شده است (دوآرد و همکاران، ۲۰۰۴). امروزه تلاش‌های قابل ملاحظه‌ای در جهت تکوین تکنیک‌های تلقیح مصنوعی در گوسفند با استفاده از اسپرم منجمد شده قوچ در حال انجام است. انجماد و ذخیره مایع منی قوچ، شامل قرار دادن مایع منی در ازت مایع و در نتیجه توقف واکنش‌های متابولیکی اسپرم است. بدین وسیله می‌توان طول زمان باروری اسپرم را افزایش داد. از مزایای منجمد کردن اسپرم قوچ می‌توان به بارور نمودن همزمان تعداد زیادی میش با استفاده از اسپرم قوچ‌های با خصوصیات ژنتیکی برتر و انتقال آسان مایع منی از مرکز تولید و جمع‌آوری به دورترین مکان‌ها، ذخیره ژنها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر بفرد اشاره نمود (فروزانفر و همکاران، ۱۳۸۶). مهمترین مشکل برای انجماد اسپرم‌ها در اکثر گونه‌ها، تغییرات دمایی است که در طول فرآیند عمل‌آوری، انجماد و نیز یخ‌گشایی ایجاد می‌شوند که باعث کاهش عملکرد، تحرک و زنده‌مانی اسپرم می‌گردد (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰). بنابراین این آسیب‌ها را می‌توان با سرد کردن، یخ‌گشایی بهتر و از همه مهمتر با استفاده از رقیق‌کننده مناسب کاهش داد. یک رقیق‌کننده مناسب نه تنها باید حجم نمونه منی را افزایش دهد بلکه باید به نگهداری و افزایش طول عمر اسپرم کمک کند. استفاده از رقیق‌کننده‌ها برای تامین انرژی، محافظت از غشای اسپرم در برابر مواد متابولیکی، تغییرات درجه حرارت و نیز مهار رشد میکروارگانیسم‌ها در انجماد اسپرم ضروری

می‌باشند (رستگاریا و شفیع‌پور، ۱۳۸۶). حضور محافظت کننده‌های انجمادی در رقیق کننده، تنشهای فیزیکی و شیمیایی مشتق شده از سرد سازی، انجماد و یخ‌گشایی را کاهش می‌دهند (پیوردی، ۲۰۰۶). گلیسرول، دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول عوامل محافظ انجمادی درون سلولی هستند که وزن مولکولی آنها نسبتاً کم است. اسپرم گونه‌های پستانداران عموماً به کمک گلیسرول به عنوان ماده محافظ انجماد، منجمد می‌شوند (فروزانفر و همکاران، ۱۳۸۶). گلیسرول یک ماده قابل نفوذ به درون سلول است که افزودن آن سبب می‌شود که آب درونی سلول اسپرم به واسطه شیب اسمزی خارج و گلیسرول جایگزین آن شود و بدین ترتیب مانع تشکیل کریستالهای یخ درون سلولی گشته و از سلول محافظت می‌کند (موریر و همکاران، ۲۰۰۲). زرده تخم‌مرغ نیز یک جزء معمول تشکیل دهنده محیط انجمادی است (اندرابی، ۲۰۰۸) که با عمل بر غشای سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرمایی محافظت می‌کند (برگرون و منجوناث، ۲۰۰۶). بنابراین با استفاده از یک رقیق‌کننده مناسب با ترکیبات محافظت‌کننده می‌توان بر مشکل افت باروری ناشی از کاهش درصد اسپرماتوزوای زنده، متحرک و طبیعی در پی انجماد، غلبه نمود.

۱-۲- هدف

هدف از این تحقیق، یافتن سطح بهینه گلیسرول و زرده تخم‌مرغ برای افزودن به رقیق‌کننده تریس جهت بهبود توان تحرک، زنده‌مانی، کاهش ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرماتوزوای قوچ در شرایط قبل و بعد از انجماد و همچنین بررسی اثر فصل بر خصوصیات مذکور می‌باشد.

