دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

تاثیر سطوح مختلف گلیسرول بر ویژگیهای منی قوچ دالاق در شرایط قبل و پس از انجماد

م. احمدی همدانی[۱]، ی. جعفری آهنگری[۲] و ی. حسن پور[۳]

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی سطوح مختلف گلیسرول بر ویژگیهای حیاتی اسپرم قوچ دالاق در شرایط قبل و پس از انجماد بود. نمونه‌های منی از ۴ راس قوچ سالم و بالغ با استفاده از شوک الکتریکی جمع‌آوری و با رقیق‌کننده تریس به نسبت ۱ به ۴ مخلوط و پس از رسیدن به دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. پایوتهای نیم میلی‌لیتری با منی رقیق شده پر و روی بخار ازت مایع به مدت ۷ دقیقه منجمد و پس از آن در ازت مایع نگهداری شد. پس از ۱۰ روز یخ گشایی، ویژگی های مورفولوژی، درصد اسپرم زنده و متحرک بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار شامل سطوح ۴، ۶ و ۸ درصد گلیسرول و ۹ تکرار صورت گرفت. نتایج نشان داد که اثر گلیسرول بر درصد زنده مانی و تحرک اسپرم قبل و پس از انجماد معنی دار بود (P<۰/۰۵)، اما تاثیر معنی داری بر ویژگی های مورفولوژیکی اسپرم نداشت (P>۰/۰۵). بالاترین درصد زنده مانی و تحرک و کمترین میزان ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم در سطح ۴ درصد گلیسرول به دست آمد. بنابراین به منظور نگهداری اسپرم قوچ دالاق در شرایط قبل و پس از انجماد، استفاده از ۴ درصد گلیسرول در رقیق کننده تریس پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: ویژگیهای منی، گلیسرول، قوچ دالاق

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

مقدمه

تلقیح مصنوعی نقش بسیار مهمی در اصلاح نژاد گوسفندان به خصوص در آزمون نتاج و ارزیابی قوچ داشته و به افزایش بازده تولید مثل، تسریع در اصلاح نژاد دام و کنترل برخی از بیماریهای جنسی کمک می کند (۱۸). لازمه استفاده بهینه از تلقیح مصنوعی، امکان ذخیره سازی اسپرم به صورت مایع و منجمد است اما محدودیت های زمانی ذخیره سازی به صورت مایع، موجب گرایش به سوی انجماد اسپرم شده است (۸). نگهداری اسپرم در دماهای پایین سبب ناهنجاریهای مورفولوژیکی، کاهش زنده مانی و کاهش باروری می شود (۲). در همین زمینه کرابو و همکاران (۶) نشان دادند که اسپرم های نگهداری شده در دماهای پایین دارای نصف باروری اسپرم های تازه بودند، در حالیکه اسپرم در منی رقیق نشده فقط برای مدت کوتاهی زنده می ماند. بنابراین موفقیت نگهداری بلند مدت اسپرم، تا حد زیادی به ابداع و توسعه رقیق کننده های مناسب بستگی دارد (۱۳). اسپرم در صورت نبود ترکیبات محافظت کننده به شوک سرمایی مبتلا می شود که فاکتورهای غشایی از جمله سیالیت، نفوذ پذیری و ترکیبات لیپیدی را تحت تأثیر قرار می دهد و سبب کاهش باروری می شود (۴). بنابراین از محافظت کننده های انجمادی استفاده می شود که تنش های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد سازی، انجماد و یخ گشایی را کاهش دهد (۲۵). معمولاً محافظت کننده ها به دو گروه نفوذپذیر و نفوذ ناپذیر تقسیم بندی می شوند (۱۵). گلیسرول به عنوان محافظت کننده نفوذپذیر، مهمترین و بیشترین تأثیر حفاظت کنندگی را برای انجماد منی پستانداران داشته، به طوری که اضافه کردن ترکیبات دیگر هیچ برتری نسبت به آن ندارد (۲۲). موریر و همکاران (۲۲) با انجام تحقیقاتی پیشنهاد دادند که استفاده از گلیسرول جهت حفاظت اسپرم قوچ و سایر حیوانات ضروری است. گلیسرول یک پلی هیدروکسیلات است که هیدروژن آن با آب باند می شود و از غشاء سلول عبور کرده و جایگزین آب داخل سلولی می گردد و با ماکرومولکولها و یونها اثر متقابل برقرار می کند و نقطه انجماد آب را کاهش (۱۵ و ۱۹) و از تشکیل بلورهای یخ درون سلولی جلوگیری می کند که عامل کشنده ای برای سلول اسپرم محسوب می شوند (۳۰). دالساندرو و همکاران (۷) طی آزمایشاتی روی انجماد منی قوچ، نرخ تحرک سلولهای اسپرم را در رقیق کننده تریس حاوی ۵ درصد گلیسرول، ۶۰/۱ درصد بیان کردند. کولاس (۵) بالاترین ویژگی های حیاتی اسپرم قوچ را در سطح ۴ درصد گلیسرول بدست آورد که با نتایج بدست آمده توسط مولینیا و همکاران (۲۰) و فروزانفر و همکاران (۱۲) مغایرت داشت که غلظت نهایی ۸ درصد گلیسرول را، برای انجماد اسپرم قوچ پیشنهاد کردند. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر سطوح مختلف گلیسرول بر بقاء اسپرم و یافتن سطح بهینه‌ای از گلیسرول جهت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

افزودن به رقیق کننده تریس برای نگهداری اسپرم قوچ دالاق قبل و پس از انجماد و یخ گشایی بود.

مواد و روشها

این تحقیق در ایستگاه تحقیقات علوم دام و آزمایشگاه فیزیولوژی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در فصل پاییز سال ۱۳۸۸ صورت گرفت. از ۴ رأس قوچ دالاق ۳ تا ۴ ساله به وزن ۲ ± ۴۵ کیلوگرم استفاده شد. اسپرم گیری با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی صورت گرفت. برای اسپرم گیری ابتدا قوچها مقید شده و سپس میله پلاستیکی حامل الکترود با ژل استریل لوبریکانت آغشته و از طریق مقعد وارد راست روده حیوان گردید. ولتاژ مورد نیاز برای تحریک انزال حداکثر ۱۰ تا ۱۵ ولت بود. ارزیابی براساس رنگ و کیفیت ظاهری نمونه های اسپرم انزال شده صورت گرفت (جدول ۱). در هر روز اسپرم گیری، نمونه های اسپرم به رنگ کرمی ضعیف تا کرمی غلیظ و با حرکت موجی بالاتر از ۳ انتخاب شدند که نحوه امتیاز بندی آن شرح داده شده است، (جدول ۲)

جدول ۱- امتیازدهی تعداد اسپرماتوزوا بر اساس رنگ منی (۱۰)

امتیاز	غلظت	تعداد اسپرماتوزوا ($\times 10^9$) در میلی لیتر
۵	کرمی غلیظ	۶-۴/۵
۴	کرمی	۴/۵-۳/۵
۳	کرمی ضعیف	۳/۵-۲/۵
۲	شیری	۲/۵-۱
۱	ابری	۱-۰/۳
۰	روشن (آبکی)	بی معنی یا کم

جدول ۲- امتیاز بندی حرکت موجی اسپرماتوزوا (۱۰)

امتیاز	نوع حرکت	شرح
۵	خیلی خوب	حرکت موجی خیلی سریع ۹۰٪ یا بیشتر اسپرماتوزوا فعال می باشند
۴	خوب	حرکت قوی، حدود ۸۵-۷۰٪ از سلولهای منی فعال می باشند
۳	نسبتاً خوب	حرکت موجی آرام و کم، ۶۰-۴۵٪ از سلولهای منی فعال می باشند
۲	ضعیف	حرکت موجی وجود ندارد، ۴۰-۲۰٪ از سلولهای منی زنده و تحرک ضعیف
۱	خیلی ضعیف	حدود ۱۰٪ از اسپرماتوزوا علائم حیات را با حرکت ضعیف نشان می دهند
۰	مرده	تمام اسپرماتوزواها بدون حرکت می باشند

نمونه های منی گرفته شده با یکدیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مخلوط شدند. نمونه اسپرم به ۴ قسمت مساوی تقسیم گردید و هر قسمت به نسبت ۱ به ۴، اسپرم به رقیق کننده تریس اضافه گردید. (۱۰). ترکیب رقیق کننده تریس به جز در مورد گلیسرول برای تمام تیمارهای آزمایشی مشابه بود (جدول ۳). اجزاء رقیق کننده تریس بکار

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

گرفته شده در این آزمایش به جز زرده تخم مرغ و آنتی بیوتیک ها، ساخت شرکت مرک آلمان بودند.

جدول ۳- ترکیبات رقیق کننده های انجمادی برای رقیق کردن یک مرحله ای منی قوچ (۱۰)

مواد	میزان رقیق شدن (۱ قسمت منی و ۴ قسمت رقیق کننده)
۱- تریس هیدروکسی متیل آمینومتان (گرم)*	۳/۶۳۴
۲- گلوکز (گرم)**	۰/۵
۳- اسید سیتریک منوهیدراته (گرم) ***	۱/۹۹
۴- زرده تخم مرغ (میلی لیتر)	۱۵
۵- پنی سلین (واحد بین المللی)	۱۰۰۰۰۰
۶- استرپتومایسین (میلی گرم)	۱۰۰
۷- آب مقطر تا	۱۰۰ ml

شماره بسته

*: ۱/۰۸۳۸۷۰۰۵۰۰ **: ۴۰۰۷ ***: ۱۴۱۰۱۸

سه سطح مختلف گلیسرول ۴، ۶ و ۸ درصد در رقیق کننده تریس به کار برده شد. رقیق کننده تریس مورد استفاده همراه با نمونه های منی در طی گامه های رقیق سازی در حمام بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا اختلاف دمایی با منی نداشته باشند. سپس نمونه ها در یخچال قرار داده شدند تا دمای آن ها، در مدت ۲ تا ۳ ساعت به ۵ درجه سانتی گراد کاهش یابد. بخشی از نمونه های رقیق شده پس از رسیدن به دمای ۵ درجه سانتی گراد ارزیابی شدند و بخشی توسط پایوتهای ۰/۵ میلی لیتری پر شدند و انتهای آنها برای جلوگیری از ورود هوا توسط پلی وینیل الکل مسدود شدند. سپس پایوتهای حاوی اسپرم بر روی بخار ازت مایع به مدت ۷ دقیقه منجمد شدند. پس از انجماد، پایوتها به کانتینرهای حاوی ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد منتقل شدند. پایوتهای حاوی اسپرم منجمد پس از ۱۰ روز از ازت مایع خارج و پس از قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بن ماری، یخگشایی شدند. ارزیابی ویژگیهای حیاتی، شامل تعیین درصد اسپرم زنده و متحرک با رنگ آمیزی سلول و شمارش میکروسکوپی انجام شد به منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوا یک قطره اسپرم و یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام از پیش گرم شده ریخته شد. سپس روی آن لامل قرار داده شد تا نمونه ها به طور یکنواخت گسترش یابند. با مشاهده مستقیم و شمارش سلولهای اسپرماتوزوای دارای حرکت مستقیم پیش رونده در میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۴۰، تعداد اسپرم متحرک و تعداد کل اسپرم شمارش و درصد اسپرم متحرک تعیین شد. برای رنگ آمیزی، یک قطره اسپرم رقیق شده با یک قطره رنگ ائوزین- نیگروزین مخلوط و پس از ۲ دقیقه گستره ای روی لام تهیه تا در مجاورت هوا خشک شود. اسپرمهای قرمز، مرده و اسپرمهای رنگ نگرفته، زنده در نظر گرفته شد و در میدان دید میکروسکوپی با

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

بزرگنمایی ۴۰X شمارش شدند (۱۰). به جهت بررسی ناهنجاری های ساختمانی اسپرماتوزوا، نقایص آنها شمارش گردید که نقایص فرعی شامل سر باریک، سر بزرگ غیرطبیعی، آکروزوم جدا شده، دم لوپ خمیده و قطره سیتوپلاسمی بود (۳۳). برای بدست آوردن درصد بازیابی تحرک و زنده مانی، نسبت درصد تحرک و زنده مانی بعد از انجماد به قبل ازانجماد در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و ۹ تکرار صورت گرفت داده های آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS آنالیز شدند (۲۹). داده های حاصل از هر مرحله آزمایش مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن (P<۰/۰۵) مقایسه شدند. به دلیل درصدی بودن داده ها در این آزمایش از تست نرمالیته استفاده شد و چون داده ها دارای توزیع نرمال بودند از تبدیل زاویه ای استفاده نشد.

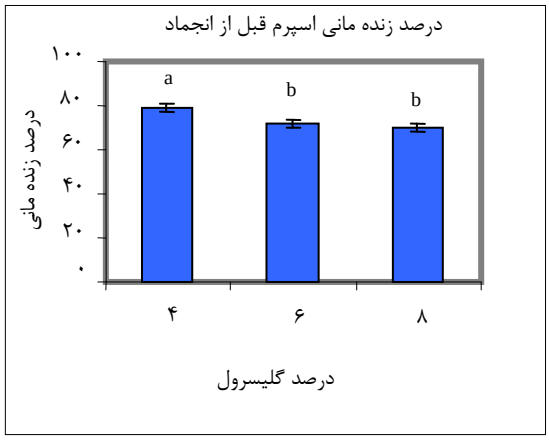
نتایج و بحث

الف- درصد اسپرم زنده و متحرک قبل از انجماد

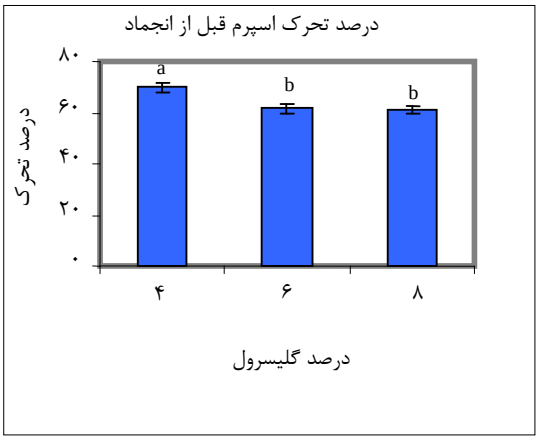
تاثیر گلیسرول بر درصد اسپرم زنده در گامه قبل از انجماد در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد اسپرم زنده قبل از انجماد در رقیق کننده تریس در سطوح ۴، ۶ و ۸ درصد گلیسرول به ترتیب ۱/۹±۷۹، ۱/۹±۷۲ و ۱/۹± ۷۰ بودند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم زنده در سطح ۴ درصد گلیسرول و کمترین درصد اسپرم زنده در سطح ۸ درصد گلیسرول حاصل شد (P<۰/۰۵). تأثیر گلیسرول بر درصد اسپرم های متحرک قبل از انجماد در رقیق کننده تریس نیز معنی دار بود. میانگین درصد اسپرم های متحرک قبل از انجماد در رقیق کننده تریس در سطوح ۴، ۶ و ۸ درصد گلیسرول به ترتیب ۱/۷۱±۷۰، ۱/۷۱±۶۱/۶ و ۱/۷۱±۶۱/۱ بودند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم متحرک در سطح ۴ درصد گلیسرول، و کمترین درصد اسپرم متحرک در سطح ۸ درصد گلیسرول حاصل شد (P<۰/۰۵)، گرچه بین سطوح ۶ و ۸ درصد گلیسرول اختلاف معنی داری وجود نداشت (شکل ۲). شوکهای سرمایی در طی سرد سازی تا دمای ۵ درجه سانتی گراد به کاهش فعالیت و حرکت و افزایش نفوذپذیری غشا به یونها، آنزیمها (۳۲)، ATP و خروج فسفولیپیدها از اسپرم و کاهش در سیالیت غشاء می انجامد (۲۴). بنابراین از گلیسرول به عنوان یک ماده محافظت کننده نفوذ پذیر به داخل سلول استفاده می شود که یا به صورت یک مرحله ای در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و یا دو مرحله ای در دمای ۵ درجه سانتی گراد به رقیق کننده افزوده می شود (۲۲). با توجه به گزارشات سالامون و ماکسول (۲۸) که بیان نمودند افزودن گلیسرول در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد عملی تر و به طور وسیعتری در انجماد منی قوچ به کار برده می شود. افزودن گلیسرول در این آزمایش، به صورت یک مرحله ای بکار برده شد که با توجه به نتایج حاصل، سطوح بالاتر از ۴ درصد نتوانست

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

اثر مثبتی بر تحرک و زنده مانی اسپرماتوزوا قبل از انجماد داشته باشد و افزودن گلیسرول قبل از انجماد به منظور تعادل سازی صورت گرفت. سطوح بالاتر گلیسرول در برخی موارد سبب مسمومیت سلول می شود و سلولها قدرت تحمل غلظت بالای گلیسرول را ندارند، اما با توجه به مدت زمان کمی که گلیسرول در تماس با اسپرماتوزوا بود سطوح بالاتر گلیسرول نتوانست سبب آسیب به سلول اسپرماتوزوا و کاهش ویژگی‌های حیاتی اسپرماتوزوا شود، بنابراین کاهش سطح آن در تناسب با دیگر اجزاء رقیق کننده در بهبود زنده مانی و تحرک اسپرم موثر بود. که نتایج این پژوهش با گزارش جعفری آهنگری و مهاجر (۱۷) مطابقت داشت. آنها نشان دادند که غلظت ۴ درصد گلیسرول سبب بهبود تحرک و زنده مانی اسپرم قوچ زل قبل از انجماد می شود. در پژوهشی دیگر، جعفری آهنگری و نوروزی (۱۶) برای رقیق سازی و انجماد اسپرم قوچ بلوچی، استفاده از غلظت ۴ درصد گلیسرول را قبل از انجماد روی تحرک و زنده مانی اسپرم به عنوان غلظت بهینه پیشنهاد کردند.



شکل ۱- میانگین درصد زنده مانی اسپرم قبل از انجماد ± خطای استاندارد



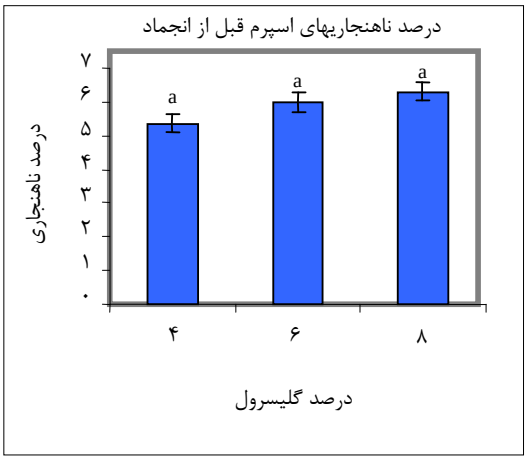
شکل ۲- میانگین درصد تحرک اسپرم قبل از انجماد ± خطای استاندارد

ب- درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی و اسپرم طبیعی قبل از انجماد

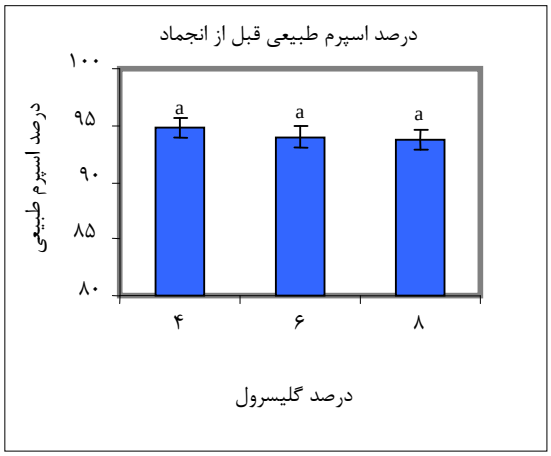
تأثیر گلیسرول بر درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی و اسپرم طبیعی قبل از انجماد در رقیق کننده تریس معنی دار نبود ($P>$ ۰/۰۵). مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم طبیعی با ۹۴/۷±۰/۸۷ و کمترین ناهنجاری مورفولوژیکی با ۵/۳ ±۰/۸۷ در سطح ۴ درصد گلیسرول بدست آمد (اشکال ۳ و ۴). حضور گلیسرول در رقیق کننده تریس می تواند سبب کاهش ناهنجاریهای مورفولوژیکی و آسیب در زمان شوک انجمادی گردد اما سطوح مورد آزمایش تاثیر معنی داری بر ناهنجاریهای اسپرم نداشت که دلیل آن را می توان به قضاوت در نحوه ارزیابی و

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

ناهنجاریهایی نسبت داد که در طی تهیه گستره ایجاد شده و احتمال خطا را افزایش می دهد، زیرا یکی از مشکلات ارزیابی مورفولوژی اسپرماتوزوا موردی بودن و تغییر پذیری آن است که تفسیر دقیق و مقایسه نتایج بین آزمایشات را مشکل می سازد. مورفولوژی اسپرم تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی چون روش های جابجایی اسپرم،کیفیت اسپرم و از همه مهمتر، مهارت شخص ارزیاب است و متعاقباً عوامل متغیر زیادی در بررسی مورفولوژی اسپرم ارزیابی شده توسط افراد مختلف گزارش می شود. (۲۶). همچنین به نظر می رسد گلیسرول بیشتر بر تمامیت آکروزوم نقش داشته باشد و آسیبهای وارد بر آن را کاهش دهد که در این آزمایش مورد بررسی قرار نگرفت.



شکل ۳- میانگین درصد ناهنجاریهای اسپرم قبل از انجماد ± خطای استاندارد



شکل ۴- میانگین درصد اسپرم طبیعی قبل از انجماد ± خطای استاندارد

ج- درصد اسپرم زنده و متحرک بعد از انجماد

تأثیر گلیسرول بر درصد اسپرم زنده بعد از انجماد در شکل ۵ نشان داده شده است. میانگین درصد اسپرم زنده بعد از انجماد در رقیق کننده تریس در سطوح ۴، ۶ و ۸ درصد گلیسرول به ترتیب ۱/۵۶±۲۶/۶۶، ۱/۵۶±۱۹ و ۱/۵۶±۱۴/۳۳ بود. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم زنده در سطح ۴ درصد گلیسرول، و کمترین درصد اسپرم زنده در سطح ۸ درصد گلیسرول حاصل شد (P<۰/۰۵). همچنین تاثیر گلیسرول بر درصد اسپرم متحرک پس از انجماد در نمودار ۶ نشان داده شده است. میانگین درصد اسپرم متحرک پس از انجماد در رقیق کننده تریس در سطوح ۴، ۶ و ۸ درصد گلیسرول به ترتیب ۱/۴۶± ۲۱/۵۶، ۱/۴۶± ۱۳/۸۸ و ۱/۴۶± ۹/۴۴ بود. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم زنده در سطح ۴

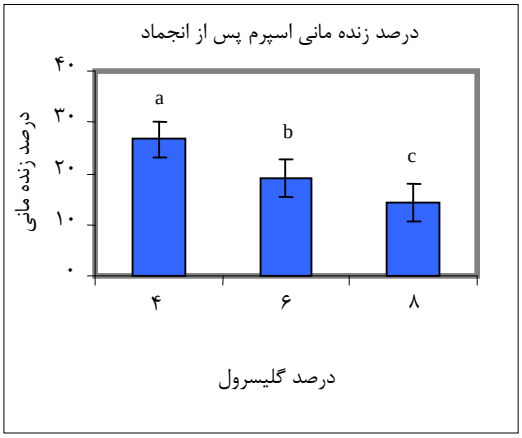
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

درصد گلیسرول و کمترین درصد اسپرم زنده در سطح ۸ درصد گلیسرول بدست آمد (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه در طی انجماد ذوب پارامترهای اصلی اسپرم همچون تحرک و مورفولوژی آن تحت تاثیر قرار می گیرد بنابراین استفاده از یک محیط انجمادی مناسب که بقا و تحرک اسپرم را تأمین کند و میزان آسیب های ناشی از انجماد را کاهش دهد، می تواند گام مهمی در جهت استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی در گوسفند باشد (۱۲). گلیسرول مهمترین محافظت کننده برای انجماد منی پستانداران است (۲۲). نور و همکاران (۲۳) محافظت کننده های مختلفی چون گلیسرول، پروپاندیول، سوکروز و ترهالوز را بر روی انجماد منی قوچ مورد بررسی قرار دادند و بهترین درصد تحرک اسپرم را پس از انجماد، در رقیق کننده حاوی گلیسرول بدست آوردند. گلیسرول قابلیت نفوذ پذیری بالایی داشته و با اثر درون سلولی و آبکشی شدید، سبب کاهش تشکیل بلورهای های یخ درون سلولی می شود که مکانیسم حفاظتی گلیسرول به پتانسیل بالای پیوند آبی آن مربوط می شود که در نتیجه، غلظت الکترولیت های آزاد شده افزایش یافته و ایجاد کریستال های یخ به تأخیر افتاده و یا مقدار آن کاهش می یابد (۲۲ و ۲۵). بلورهای یخ کوچک برای سلول بی ضرر بوده اما تشکیل دوباره یخ بزرگ در هنگام انجماد و یخگشایی، بر اثر انرژی آزاد سطحی برای سلول می تواند بسیار زیان بخش باشد (۳۰). گلیسرول، سلول اسپرم را در مقابل اثرات محلول ناشی از غلظت نمکها و اجزاء حل شدنی رقیق کننده محافظت می کند و با یون های فلزی تشکیل کمپلکس داده، سپس به سرعت وارد سلولهای اسپرم‌های زنده شده و مورد اکسیداسیون قرار می گیرد (۲۲ و ۲۵). از سوئی گلیسرول با ورود سریع به درون سلول، اثر برون سلولی نیز می تواند داشته باشد (۳، ۲۲ و ۲۵) که غلظت نهایی گلیسرول در رقیق کننده ها متغیر است و از طریق سمیت و یا اثرات سودمندش روی اسپرم تعیین می شود (۲۲ و ۲۵). غلظت مولاریته گلیسرول بر ویژگی های فیزیکی سیتوپلاسم، نفوذپذیری غشاء و پیوند کوالان پروتئین های سطح اسپرم تاثیرگذار است و علاوه بر اثرات مفید می تواند بر اسکلت سلول و ساختار گلیکوکالیکس[1] سطح غشاء اثرات منفی داشته و با افزایش نفوذپذیری یونها و افزایش مصرف ATP سبب عدم تعادل بیوانرژیک و افزایش مصرف انرژی شود (۱۴) و این امر بکارگیری سطوح بالای گلیسرول را محدود می سازد. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، تیمار حاوی ۴ درصد گلیسرول بالاترین درصد تحرک و زنده مانی را پس از انجماد از خود نشان داد و در این تیمار عمل جایگزینی آب با گلیسرول بهتر صورت گرفته و احتمالاً فشار اسمزی مناسب تری برقرار شده است و کارآیی بهتری در محافظت از سلول در مقایسه با تیمارهای دیگر داشته است، اما افزایش غلظت گلیسرول با توجه به اثرات منفی آن بر ساختار غشاء و احتمالاً سمی بودن گلیسرول، سبب مسمومیت سلول و افزایش فشار اسمزی گشته و با کاهش تحرک و زنده مانی اسپرماتوزوا پس از انجماد همراه بوده است. نتایج این آزمایش با نتایج کولاس

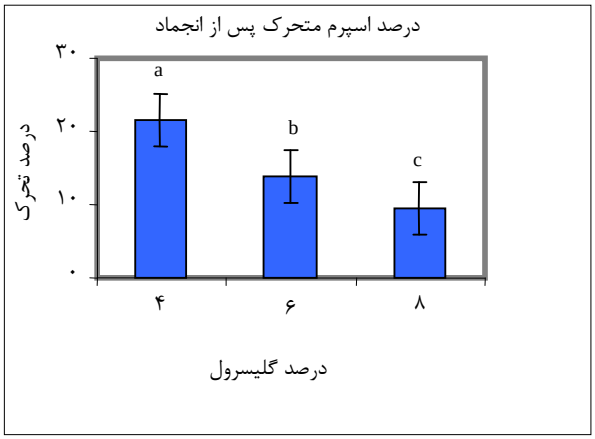
1- Glycocalyx

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

(۵)، جعفری آهنگری و نوروزی (۱۶)، سلیمانی (۳۰)، ریتار و بال (۲۷) و آنل و همکاران (۱) هماهنگی داشت. آنان غلظت نهایی ۴ درصد گلیسرول برای انجماد اسپرم قوچ را به عنوان غلظت بهینه معرفی نمودند که با نتایج فروزانفر و همکاران (۱۲) که غلظت ۸ درصد گلیسرول را بر روی تحرک اسپرم قوچ بختیاری مناسب دانستند و ال آلامی و فوت (۹) که بهترین نرخ تحرک را در رقیق کننده حاوی ۷ درصد گلیسرول بدست آوردند و همچنین سونمز و دمیرسی (۳۱) و دالساندرو و همکاران (۷) که غلظت ۵ درصد گلیسرول را برای انجماد اسپرم قوچ مناسب دانستند، مخالف بود که دلایل این مغایرتها ممکن است به غلظتهای مختلف زرده تخم مرغ یا نسبت های مختلف رقیق سازی و یا نوع ترکیبات رقیق کننده، غلظت اسپرماتوزوا و یا نوع نژاد مربوط باشد (۱۲ و ۳۰).



شکل ۵- میانگین درصدزنده مانی اسپرم پس از انجماد ± خطای استاندارد



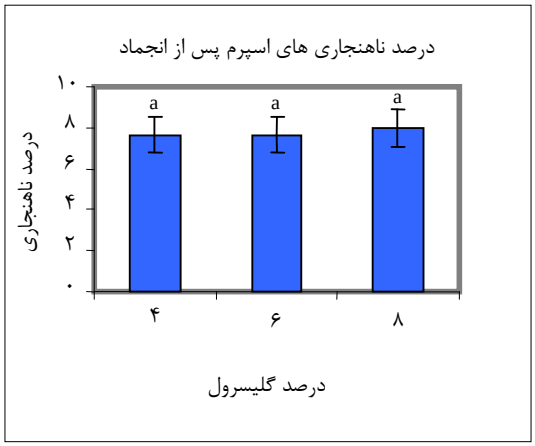
شکل ۶- میانگین درصد تحرک اسپرم پس از انجماد ± خطای استاندارد

د- درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی و اسپرم طبیعی بعد از انجماد

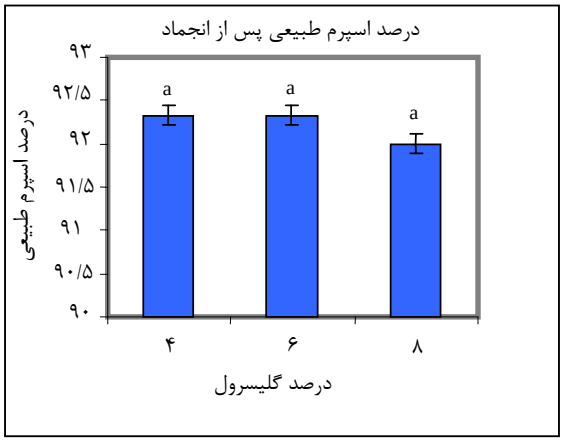
تاثیر گلیسرول بر درصد ناهنجاریهای مورفولوژیکی و اسپرم طبیعی پس از انجماد در رقیق کننده تریس در اشکال ۷ و ۸ نشان داده شد. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم طبیعی و کمترین ناهنجاری مورفولوژیکی در سطح ۴ درصد گلیسرول بدست آمد ($P<0/05$). عدم حضور گلیسرول در رقیق کننده در زمان فرایند انجماد سبب افزایش ناهنجاریهای مورفولوژیکی اسپرم می شوند که به دلیل تشکیل بلورهای یخی است که عاملی آسیب رسان به غشاء سلول هستند. احتمالاً حضور گلیسرول بیشتر تأثیر بر تمامیت آکروزوم و غشا اسپرم دارد که در آزمایش مورد اشاره

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

بررسی نشد. وجود گلیسرول با جلوگیری از اسپرم می شود. در این آزمایش گرچه سطوح مختلف گلیسرول بر ناهنجاریهای اسپرم تاثیر معنی داری نداشت، اما میزان تورم سر به میزان بسیار ناچیز مشاهده گردید. سطوح مختلف گلیسرول بر ناهنجاریهای مورفولوژیکی دیگر، مانند قطره سیتوپلاسمی، دم پیچ خورده، سرجدا و سر باریک تأثیری نداشت ولی در سطوح پایین تر گلیسرول، ناهنجاریهای حاصل از شوک انجمادی به مقدار کمتری مشاهده شد. مولینیا و همکاران (۲۱) محافظت کننده های انجمادی (گلیسرول، اتیلن گلیکول و پروپاندیول) را در غلظت های (۰ تا ۱۲ درصد) را روی انجماد منی قوچ ورود آب به داخل سلول مانع از تورم سر بکار بردند و گزارش نمودند که میزان تمامیت اکروزوم اسپرماتوزوا در تمام سطوح گلیسرول نسبت به محافظت کننده های دیگر بالاتر بود. بر پایه پژوهش سونمز و دمیرسی (۳۱) استفاده از ۵ درصد گلیسرول می تواند آسیب های آکروزومی و اسپرم های غیر طبیعی را کاهش دهد. فرشاد و همکاران (۱۱) بالاترین درصد اسپرم طبیعی بز با آکروزوم نرمال را در سطح ۱ درصد گلیسرول بدست آوردند که دلیل این تفاوت با نتایج آزمایش حاضر می تواند به نوع نژاد، بکارگیری گلیسرول با سطوحی متفاوت از این پژوهش و نحوه ارزیابی مربوط باشد.



شکل ۷- میانگین درصد ناهنجاریهای اسپرم پس از انجماد ± خطای استاندارد



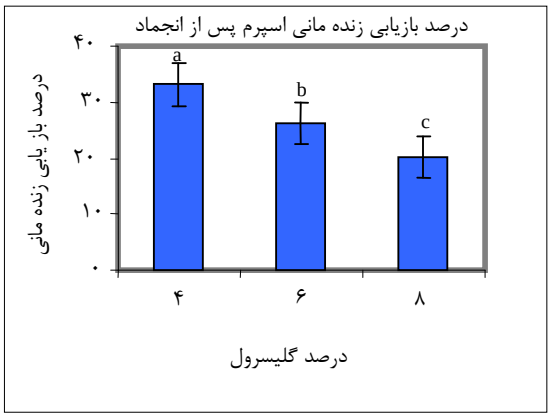
شکل ۸- میانگین درصد اسپرم های طبیعی پس از انجماد ± خطای استاندارد

ح- درصد بازیابی زنده مانی و تحرک

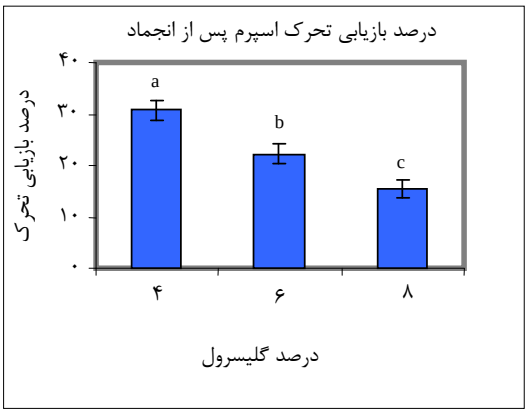
تاثیر سطوح مختلف گلیسرول بر درصد بازیابی زنده مانی و تحرک در اشکال ۹ و ۱۰ نشان داده شد و بیشترین بازیابی زنده مانی با ۱/۹۵± ۳۳/۱۱ درصد و بیشینه درصد بازیابی تحرک با ۱/۹± ۳۰/۸ درصد درسطح ۴ درصد گلیسرول بدست آمد. بر پایه این پژوهش، گلیسرول بر بازیابی زنده مانی و تحرک تاثیر مثبتی داشته به طوری که با کاهش سطح گلیسرول بر مقدار این نسبت

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

افزوده می گردد. وجود ۴ درصد گلیسرول در رقیق کننده تریس در مقایسه با سطوح ۶ و ۸ درصد گلیسرول، شرایط مناسب تری برای ماندگاری اسپرم ایجاد نموده و در جهت حفظ آب درون سلولی نقش مهمی را ایفا نموده است.



شکل ۹- میانگین درصد بازیابی زنده مانی اسپرم ± خطای استاندارد



شکل ۱۰- میانگین درصد بازیابی تحرک اسپرم ± خطای استاندارد

با توجه به دلائل زیر:

- هزینه بسیار زیاد گلیسرول با درجه خلوص بالا
- کاهش سطح گلیسرول و کاهش قیمت رقیق کننده ناشی از آن
- حفظ و بهبود درصد تحرک و زنده مانی پس از انجماد
- بالاتر بودن نسبت بازیابی زنده مانی و تحرک اسپرم در سطح کم گلیسرول و به منظور نگهداری دراز مدت اسپرم قوچ دالاق می توان استفاده از میزان ۴ درصد گلیسرول را جهت رقیق سازی اسپرم پیشنهاد نمود.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

منابع:

1. Anel, L., P. De Paz, M. Alvares, C.A. Chamorro, J.C. Boixo and A. Manso. 2003. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen .Theriogenology. 60: 1293-308.
2. Baily, J.F., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology. 21: 1-7.
3. Biswas, D.F., Y. Bari, M. Shamsuddin and M.M. Rahman. 2002. Determination of Glycerol percentages for preserving the black Bengal buck (capra hircus) spermatozoa for long time. Pakistan Journal of Biology Science. 5: 715-718.
4. Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction: 129: 371-378.
5. Colas, G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. Journal Reproduction Fertility. 48: 277-285.
6. 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. 3-9.
7. D'Alessandro, A.G., G. Martemucci, M.A. Colonna and A. Belliti. 2001. Post- thaw of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender concentration. Theriogenology. 55: 1159-70.
8. Douard, V., D. Hermier, M. Magistrini, C. Labbe and E. Blesbois. 2004. Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology. 61: 1-13.
9. El-Alamy, M.A. and R.H. Foote. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. Animal Reproduction Science. 65: 245-54.
10. Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, Sydney. 194 p.
11. Farshad, A., B. Khalili and P. Fazeli. 2009. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. Pakistan Journal Biology Science. 12: 239-245.
12. Forouzanfar M., M. Fazilati, F. Moulavi, M. Hajian, A. Salehi, S. Rabiei and M.H. Nasr-Esfahani. 2007. Investigation of different glycerol and Egg Yolk concentration on freezing Bakhtiari Ram Semen. Journal of Iranian Anatomical Sciences. 5: 17-25.
13. Ghazvinian, kh., M. Irani, A. Javaheri. 2000. Reproductive physiology and Artificial Insemination in sheep and goat. Published by Semnan University. 273 p.
14. Hammerstedt, R.H. and J.K. Graham. 1992. Cryopreservation of Poultry Sperm: The Enigma of Glycerol's. Cryobiology. 29: 26-38.
15. Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science. 62: 3-22.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

17. Jafari Ahangari, Y. and M. Mohajer. 2007. Effect of different levels of glycerol in tris and milk extender on vital characteristics of Zel ram spermatozoa in frozen condition Scientific Journal. 1: 11-16.
18. Maxwell, W.M.C. and P.F. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. Animal Reproduction Science. 42: 55-65.
19. Medeiros, C.M.O., F. Forell, A.T.D. Oliveira and J.L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isnt it better. Theriogenology. 57: 327-344.
20. Molinia, F.C., G. Evans and W.M.C. Maxwell. 1994. Efect of polyols on the post thawing motility of pellet frozen ram spermatozoa. Theriogenology. 42: 849-858.
21. Molinia, F.C., G. Evans, W.M.C. Maxwell. 2006. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozo. Theriogenology.
22. Morrier, A., F. Castonguay and J.L. Bailey. 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. Canada Journal Animal Science. 82: 347-356.
23. Nur, Z., B. Zik, B. Ustuner, H. Sagirkaya and C.G. Ozguden. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. Theriogenology.73(9): 1267-1275.
24. Parizadian Kavian, B. 2007. Investigation of various concentrations of vitamins E and C in milk and tris diluents on some characteristics of Atabay ram semen in liquid and frozen conditions. M.Sc. Thesis.Gorgan University of Agriculture sciences and Natural Recourses Faculty of Animal sciences. 86 p.
25. Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research. 6: 215-225.
26. Rijsselaere, T., A.V. Soom, G. Hoflack, D. Maes and A. DeKruif. 2004. Theriogenology . 62: 1292-1306.
27. Ritar, A.G. and P.D. Ball. 1993. The effect of freeze- thawing of goat and sheep semen at high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. Animal Reproduction Science. 31: 249-262.
28. Salamon, S. and W.M. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction. Science 62: 77-111.
29. SAS Users Guide Statistics, SAS Institute Inc. 2001. Cary, NC, USA.
30. Soleymani, A. 1999. Study the possibility of freezing semen of Baluchi ram using different extender. M.Sc. Thesis. Islamic Azad University, Isfahan Branch. 110 p.
31. Sonmez, M. and E. Demirci. 2003. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportion of glycerol. Turkish Journal Veterinary Animal Science. 28: 893-899.
32. Tavallaee, M.A., Y. Jafari Ahangari, S. Hasani and M. Nowrozi. 2006. Effect of different concentrations of egg yolk in tris diluent on spermatozoa motility of cashmere goats. Scientific journal of Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Recourses 13: 1-6.
33. Zamiri, M. 2006. Reproductive physiology. Published by Haghshenas. 448 p.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]

Effect of Various Levels of Glycerol on Dallagh Rams Semen Characteristics in Pre and Post Freezing Conditions

M. Ahmadi Hamedani[1], Y. Jafari Ahangari[2] and Y. Hassanpour[3]

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of different levels of glycerol on Dallagh rams semen characteristics in pre and post freezing conditions. Semen samples were collected from 4 healthy and mature rams using an electro ejaculator, were mixed with Tris extender in a ratio of 1:4 semen and assessed at 5°c. 0.5 ml of straws were filled with diluted semen and kept above liquid nitrogen vapor within 7 minutes and after 10 days were thawed to investigate live and motility percentage of spermatozoa and morphological characteristics. The experiment was carried out on the basis of completely randomized design with 3 treatments including 3 levels of glycerol (4, 6, 8%) and 9 replicates. Results showed that the effect of glycerol on live and motility percentage of pre and post freezing spermatozoa was significant ($P<0.05$), but had not significant effect on morphological characteristics of spermatozoa ($P>0.05$). The highest survival and motility percentage and the lowest morphological defects of spermatozoa were obtained in 4% glycerol. Therefore using 4% glycerol in Tris extender is recommend for semen storage of Dallagh rams in pre and post freezing conditions.

Keywords: Semen characteristics, Glycerol, Dallagh ram

1- Former M.S.c. Student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2- Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3- Former M.S.c. Student, Eslamic Azad University, Ghaemshahr Branch

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-10-19]