تأثیر رقیق کننده های فسفات، سیترات و تریس بر تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش

دکتر روزعلی باتوانی[1*] دکتر سید مرتضی علوی شوشتری[1] دکتر علی توکلی[2]

دریافت مقاله: ۲۵ آبان ۱۳۷۸
پذیرش نهایی: ۲۹ شهریور ۱۳۸۲

هدف: مقایسه اثر سه رقیق کننده مختلف با غلظت های ۱۳ و ۷ درصد گلیسرول بر تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش (قبل و بعد از انجماد و یخ گشایی).

طرح: مطالعه تجربی مقایسه ای.

نمونه ها: دوازده انزال جمع آوری شده از ۲ راس گاومیش نر ۴/۵ و ۶ ساله.

روش: نمونه های منی گاومیش با کیفیت اولیه عالی= نمره ۵ و خیلی خوب= نمره ۴ استفاده شد. بعد از ارزیابی کلی منی، در تجربه ۱ نمونه منی در بافرهای فسفات و سیترات با غلظتهای ۱۳و ۷ درصد گلیسرول رقیق گردید و تحرک اسپرم ها بعد از رقیق سازی، بعد از سرد سازی، بعد از به تعادل رسیدن محلول منی رقیق شده با گلیسرول و یخ گشایی منی منجمد ارزیابی گردید. در تجربه ۲ مواد افزودنی گلوکز و سیستئین به بافرهای قبلی اضافه گردید و با اثر رقیق کننده تریس بر تحرک اسپرم ها مقایسه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی.

نتایج: تحرک اسپرماتوزوئیدها در رقیق کننده های فسفات و سیترات با غلظت کم گلیسرول برای مدت کوتاه در دمای یخچال حفظ گردید. ولی تحرک آنها بعد از به تعادل رسیدن و یخ گشایی سریعاً کاهش یافت و تمام اسپرماتوزوئیدها تلف شدند. رقیق کننده تریس قدرت تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش را به خوبی حفظ کرد. همچنین، رقیق کننده تریس با غلظت ۱۳ درصد گلیسرول، عملکردی بهتر از همان رقیق کننده با غلظت ۷ درصد گلیسرول داشت (تحرک پس از یخ گشایی ۷۰ درصد و میزان بازگشت به حال طبیعی ۸۷/۵ درصد در مقایسه با ۵۲ و ۶۵ درصد).

نتیجه گیری: رقیق کننده تریس- زرده تخم مرغ با غلظت ۱۳ درصد گلیسرول برای ذخیره سازی طولانی منی گاومیش به روش انجماد توصیه می شود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۵۸-۳۵۵.

واژه های کلیدی: رقیق کننده ها، اسپرماتوزوئید، تحرک، گاومیش.

Effects of phosphate, citrate and tris diluents on motility of buffalo spermatozoa

Batavani, R.A.,[1] Alavi Shoushtari, S.M.,[1] Tavakoli, A.[2]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia -Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia - Iran.*

Objective: To compare the effects of different diluents with levels of 13 and 7% glycerol on motility of buffalo spermatozoa (pre- and post- freezing and thawing).

Samples: Comparative experimental study.

Animals: Twelve ejaculates of 2 buffalo bulls (4.5 and 6 years old).

Procedure: Semen samples with initially very good and excellent quality (motility 4 and 5) were selected and immediately evaluated for motility. Then, aliquots of each semen sample were subjected to dilution, cooling, equilibration, freezing and thawing as follow: Experiment 1. Phosphate and citrate extenders with 13 and 7% glycerol were used. Experiment 2. Glucose and cysteine were added in the same extenders and were compared to the effects of tris extender on motility of buffalo spermatozoa.

Statistical analysis: Descriptive statistics.

Results: The motility of spermatozoa maintained up to a limited time of storage in phosphate and citrate extenders with low level of glycerol and beyond of this storage time (after equilibration and thawing) the motile life of spermatozoa deteriorates quickly. Tris diluent proved to be superior in maintaining the motility of spermatozoa. Also, the sperm motility and recovery rate were higher in the semen extended in tris diluent with 13% glycerol as compared to those extended with 7% glycerol (70 and 87.5% versus 52 and 65%).

Clinical implications: Based of our findings, we suggest the use of tris diluent with 13% glycerol for the cryopreservation of buffalo bull spermatozoa. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4:355-358, 2003.***

Key words: Extenders, Spermatozoa, Motility, Buffalo.

Corresponding author email:ra.batavai@mail.urmia.ac.ir

بر اساس آمار سازمان خوار بار جهانی در سال ۲۰۰۰ جمعیت گاومیشهای اهلی (Bubalus bubalis) جهان بالغ بر ۱۶۶میلیون راس است . پرورش گاومیش به منظور تولید شیر، گوشت و چرم مکمل سیستم کشاورزی اغلب کشورهای آسیایی است. طوری که بیش از ۹۵ درصد گاومیشهای جهان در آسیا قرار دارند (۱۵). مطالعات اخیر نشان داده است که منی گاومیش را می توان شبیه منی گاو برای مدت طولانی ذخیره کرد و با استفاده از تلقیح مصنوعی در تسریع اصلاح نژاد این دام به کار برد (۱۴). موفقیت در ذخیره سازی منی به عوامل زیادی بستگی دارد که ممکن است برای هرگونه اختصاصی باشد. مهمترین مشکل برای توزیع منی در اکثر گونه ها این است که تغییرات دما در طول سرد کردن و یخ گشایی منی، باعث آسیبهای ساختاری، بیوشیمیایی و عملی اسپرم‌اتوزوئیدها می شود و به دنبال آن نسبت سلولهای زنده و متحرک کاهش می یابد (۱۳، ۶). این آسیبها را می توان با بهبود سرد کردن، یخ گشایی و استفاده از رقیق کننده های مناسب کاهش داد. یک رقیق کننده خوب نه تنها باید حجم مایع انزالی را زیاد کند تا بتوان آن را برای بارور ساختن تعداد زیادی گاومیش به کار برد بلکه باید به نگهداری و افزایش طول عمر اسپرم کمک کند. استفاده از رقیق کننده ها برای تأمین انرژی، محافظت اسپرم از مواد متابولیکی و تغییرات درجه حرارت و مهار رشد میکروارگانیسم ها لازم است (۵،۱۲). اگرچه انجماد منی گاومیش انجام شده است و گوساله گاومیشهایی با تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد متولد شده اند (۱۴). نظر به کمبود اطلاعات در زمینه انجماد منی گاومیش در ایران، تلاش گردید تأثیر رقیق کننده های تریس، فسفات و سیترات بر تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش بررسی شود تا با ارایه یک رقیق کننده با ترکیبات مناسب جهت نگهداری طولانی مدت مایع منی در توسعه تلقیح مصنوعی گاومیش پیشنهاد نمود و بر معظل افت باروری ناشی از کاهش تحرک اسپرماتوزوئیدها و تلفات آنها با افزایش طول مدت ذخیره منی مایع و توزیع آن در برنامه تلقیح مصنوعی در سطح گاومیش داریها غلبه یافت.

مواد و روش کار

تعداد ۱۲ انزال ۲ راس گاومیش نر ۴/۵ و ۶ ساله موجود در مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال غرب کشور به وسیله مهبل مصنوعی با استفاده از یک گاو میش ماده به عنوان محرک در بهار سال ۱۳۷۷ جمع آوری گردید و در آزمایشگاه تلقیح مصنوعی تأثیر رقیق کننده های تریس، سیترات و

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
*) نویسنده مسئول ra.batavai@mail.urmia.ac.ir

فسفات بر تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش به ترتیب زیر بررسی گردید:

تجربه ۱: در اولین مرحله از رقیق کننده فسفات و سیترات با دو غلظت گلیسرول ۱۳ درصد و ۷ درصد به منظور رقیق سازی استفاده شد. ابتدا یک قطره از منی تازه را روی لام تمیز و گرم قرار داده و لام زیر میکروسکوپ صفحه گرم ۳۷ درجه سانتیگراد با بزرگنمایی ۱۰ مشاهده گردید و قدرت تحرک اولیه اسپرماتوزوئیدها در گسترش ضخیم براساس مقیاس عددی ۰ تا ۵ (صفر= سلولها اسپرم غیر متحرک و امواج وجود ندارد. پنج= تحرک اسپرم ها بسیار زیاد وامواج سریع مشخص است) ارزیابی گردید. سپس با استفاده از دستگاه فتومتر دیجیتالی (IMV ، فرانسه) ارزیابی کلی منی انجام گرفت. این دستگاه با سیستم نوری، منی را ارزیابی کرده و توسط چاپگر کامپیوتری اطلاعاتی از قبیل تراکم اسپرم ها در نمونه منی، حجم منی جمع آوری شده، تعداد اسپرم ها در هر پایت، حجم رقیق کننده مورد نیاز، تعداد پایت های مورد نیاز برای بسته بندی، تاریخ اسپرم گیری و شماره گاومیش را به ما می داد. محلولها رقیق کننده دارای ترکیبات زیر بود (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب محلولهای رقیق کننده فسفات، سیترات و تریس برای انجماد منی گاومیش.

ترکیب رقیق کننده	فسفات (۱) و (۲)	سیترات (۱) و (۲)	تریس (۱) و (۲)
فسفات سدیم (گرم)	۲	-	-
فسفات پتاسیم (گرم)	۰/۲	-	-
سیترات سدیم (گرم)	-	۲/۹	-
پنی سیلین (هزارواحد)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
استرپتومایسن (گرم)	۰/۱	۰/۱	۰/۱
تریس (گرم)*	-	-	۲/۶۶
اسید سیتریک (گرم)	-	-	۱/۴۸
گلوکز (گرم)	-	-	۰/۶۴
سیستئین (گرم)	-	-	۰/۱۳
آب مقطر (میلی لیتر)	۸۰	۸۰	۸۰
زرده تخم مرغ (میلی لیتر)	۲۰	۲۰	۲۰

۱) با ۱۳ میلی لیتر گلیسرول در ۱۰۰ میلی لیتر رقیق کننده ، ۲) با ۷ میلی لیتر گلیسرول در ۱۰۰ میلی لیتر رقیق کننده. *) تریس (هیدروکسی متیل)آمینومتان.

بعد از ارزیابی کلی منی در گسترش ضخیم و تهیه محلول رقیق کننده، نمونه منی در دو مرحله رقیق گردید. برای این کار هر یک از محلولهای رقیق کننده را به دو حجم مساوی ۵۰ میلی لیتری تقسیم کرده و در دو ارلن ریخته شد. برای تهیه رقیق کننده با غلظت ۱۳درصد گلیسرول به یکی از ارلن های حاوی محلول رقیق کننده، ۴ میلی لیتر گلیسرول و به ارلن دیگر ۹ میلی لیتر گلیسرول اضافه گردید. برای تهیه رقیق کننده با ۷ درصد گلیسرول به هر ارلن حاوی محلول رقیق کننده ،۳ و ۴میلی لیتر گلیسرول اضافه گردید. نمونه منی را به ارلن های حاوی گلیسرول کم افزوده شد، بعد از مدتی از نمونه منی رقیق شده لام نازک تهیه گردید و در زیر میکروسکوپ گرم با بزرگنمایی ۱۰ ارزیابی گردید. سپس هر ۸ ارلن که چهارتای آنها حاوی محلول رقیق کننده با اسپرم و چهارتای دیگر حاوی فقط محلول رقیق کننده بودند در یخچال ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و بعد از آن از چهار ارلن حاوی نمونه منی رقیق شده، لام نازک تهیه گردید و در صد تحرک اسپرماتوزوئیدها مشخص گردید. در مرحله بعدی چهار محلول رقیق کننده واجد اسپرم با گلیسرول کم و فاقد اسپرم با گلیسرول بیشتر با هم مخلوط شد. سر انجام منی رقیق شده با غلظت گلیسرول نهایی ۱۳ درصد و ۷ درصد را جهت به تعادل رسیدن محلول منی رقیق شده با ماده محافظ از سرما به مدت ۶ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس از منی رقیق شده گسترش نازک تهیه گردید و تحرک اسپرم ها زیر میکروسکوپ ارزیابی گردید از آن جایی که اسپرم ها در محلولهای رقیق کننده فسفات و سیترات با غلظت ۷ درصد گلیسرول زنده ماندند سپس این منی رقیق شده دارای تحرک، توسط دستگاه مدل MRS3 ساخت فرانسه به طور اتوماتیک در پایت های ۰/۵ میلی لیتری بسته بندی و در ازت مایع منجمد شدند. برای انجماد ابتدا منی رقیق شده در رقیق کننده های مختلف و بسته بندی شده در پایت های ۰/۵ میلی لیتری با برچسب مشخص شدند. سپس پایت ها روی پایه های موجود روی شبکه توری تانک انجماد در ۴ سانتیمتری سطح بالای ازت مایع قرار گرفتند و با تنظیم جریان هوا در تانک، دما را تا منهای ۵۰ درجه سانتیگراد افزایش داده، سپس بلافاصله پایت ها را روی شبکه توری تانک قرار داده و درب آن را می بستیم. دمای تانک بتدریج کاهش پیدا می کرد و این کاهش دما توسط صفحه نشانگر در بیرون مشخص می گردید. وقتی دمای تانک ازت مایع به منهای ۱۷۰ درجه سانتیگراد می رسید، درب تانک را بر داشته و پایت ها را در کانیسترهایی که برچسب هر محلول رقیق کننده را داشت قرار داده، سپس کانیسترها در ازت مایع شناور گردیدند. در مرحله بعدی پایت حاوی منی رقیق شده در رقیق کننده مشخص را از کانیستر خارج کرده و سریعا در آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه یخ گشایی شد. بعد پایت را از آب خارج کرده و بعد از خشک کردن با دستمال، درب پرچ شده با قیچی بریده شد و یک قطره از نمونه منی را روی لام گرم قرار داده و با میکروسکوپ گرم میزان تحرک اسپرم ها ارزیابی گردید.

تجربه۲: در این تجربه به دو محلول رقیق کننده سیترات و فسفات مواد افزودنی شامل ۱/۲ گرم گلوکز و ۰/۱۲ گرم سیستئین در ۱۰۰ میلی لیتر رقیق کننده اضافه شد و با رقیق کننده تریس با غلظت ۱۳ درصد و ۷ درصد گلیسرول مقایسه گردید. در این مرحله بعد از ارزیابی نمونه تازه منی، نمونه منی را رقیق نمودیم. سپس به ترتیب فوراً بعد از رقیق سازی، بعد از ۲۴ ساعت نگهداری محلولها ی رقیق کننده حاوی اسپرم با گلیسرول کم در یخچال ۴ درجه سانتیگراد و بعد از ایجاد محلول های رقیق کننده با غلظتهای نهایی ۱۳ درصد و ۷ درصد گلیسرول و گذشت زمان تعادل در دمای یخچال، گسترش نازک تهیه و در صد تحرک اسپرم ها ارزیابی گردید. از آن جایی که اسپرم ها در محلولهای فسفات و سیترات با غلظت ۷درصد گلیسرول و در محلول رقیق کننده تریس با غلظت نهایی ۱۳درصد و ۷ درصد گلیسرول زنده ماندند آنها در پایت ها بسته بندی و منجمد شدند. بعد از یخ گشایی منی منجمد، درصد تحرک اسپرم ها ارزیابی گردید و میزان بازگشت اسپرماتوزوئیدها به حال طبیعی بر اساس فرمول پیشنهاد Hafez & Hafez سال ۲۰۰۰ محاسبه گردید (۵).

نتایج

تجربه ۱: در این آزمایش کیفیت منی تازه در ارزیابی اولیه، قبل از افزودن رقیق کننده های فسفات و سیترات با غلظتهای ۱۳ درصد و ۷ درصد گلیسرول به ترتیب عالی = نمره ۵ و خیلی خوب = نمره ۴ بود. میانگین تحرک اسپرم ها در ۳ بار تکرار پس از رقیق کردن، بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در یخچال با گلیسرول کم، بعد از ایجاد گلیسرول نهایی و گذشت زمان تعادل و ذوب منی منجمد در جدول۲ ارایه گردیده است. تحرک اسپرماتوزوئیدها در رقیق کننده های فسفات و سیترات با غلظت کم گلیسرول برای مدت کوتاه در دمای یخچال حفظ گردید ولی پس از ایجاد گلیسرول نهایی

جدول ۲- میانگین تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاو میش در دو رقیق کننده فسفات و سیترات.

مراحل عمل آوری	فسفات (۱)	سیترات (۱)	فسفات (۲)	سیترات (۲)
۱- فوراً بعد از رقیق سازی	۸۰	۷۰	۸۰	۷۰
۲- بعد از نگهداری دریخچال	۷۰	۵۰	۷۰	۵۰
۳- پس از ایجاد گلیسرول نهایی	تلف شدند	تلف شدند	۱۰	۵۰
۴- بعد از ذوب منی منجمد	-	-	تلف شدند	۳۰

و به تعادل رسیدن، تحرک اسپرماتوزوئیدها تا حد غیرقابل قبول برای باروری کاهش یافت و یا تمامی آنها تلف شدند.

تجربه ۲: در این آزمایش کیفیت منی تازه در ارزیابی اولیه، قبل از افزودن رقیق کننده های فسفات، سیترات و تریس با غلظتهای ۱۳ درصد و ۷ درصد گلیسرول به ترتیب خیلی خوب = نمره ۴ و عالی = نمره ۵ بود. در این تجربه مشخص گردید که اضافه کردن گلوکز و سیستئین در بافرهای فسفات و سیترات قابلیت زنده ماندن و تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش را افزایش نداد. در حقیقت ذخیره طولانی مدت اسپرماتوزوئیدها با افزودن این مواد به بافرهای فسفات و سیترات فراهم نگردید. علاوه بر این میانگین تحرک اسپرماتوزوئیدها در منی رقیق شده در محلول تریس بیشتر از رقیق کننده های دیگر بود. همچنین مشخص گردید که رقیق کننده تریس با غلظت ۱۳ درصد گلیسرول دارای عملکرد بهتری نسبت به همان رقیق کننده با غلظت ۷ درصد گلیسرول بود (تحرک ۷۰ درصد و میزان بازگشت به حال طبیعی ۸۷/۵ درصد در مقایسه با ۵۲ و ۶۵ درصد) (جدول ۳).

بحث

نتایج آزمایشها نشان داد که رقیق کننده های فسفات و سیترات با غلظتهای ۱۳ و ۷ درصد گلیسرول، حتی با افزودن موادی از قبیل گلوکز و سیستئین در آنها، برای انجماد منی و ذخیره سازی طو لانی اسپرماتوزوئیدهای گاومیش مناسب نمی باشند. رقیق کننده تریس قابلیت زنده ماندن و قدرت تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش را به خوبی حفظ کرد با این تفاوت که تحرک اسپرماتوزوئیدها پس از یخ گشایی منی منجمد در رقیق کننده تریس با غلظت ۱۳ درصد گلیسرول بیشتر از تحرک آنها در همان رقیق کننده با غلظت ۷ درصد گلیسرول بود.

انجماد اسپرماتوزوئیدها در ارزیابی ژنتیکی و برنامه های اصلاح نژادی حیوانات اهلی فایده های زیادی دارد. با این وجود، مهمترین مشکل برای توزیع منی منجمد کاهش اسپرماتوزوئیدهای متحرک پس از یخ گشایی به دلیل آسیب بر ساختار غشایی اسپرم ها در گونه های مختلف حیوانات و بالاخص حساسیت بیشتر اسپرماتوزوئیدهای گاومیش به دلیل کمی فسفولیپید غشایی (در مقایسه با اسپرم های گاو) نسبت به تنشهای حرارتی است (۱۴). ترکیب رقیق کننده ای که منی قبل از انجماد در آن رقیق می شود در حفاظت اسپرماتوزوئیدها نقش اساسی دارد (۳). مطالعات بسیاری در مورد تأثیر رقیق کننده های مختلف با غلظتهای متفاوت زرده تخم مرغ، گلیسرول، قندها و مواد افزودنی بر کیفیت منی منجمد گاومیش به عمل آمده است که برخی از آنها با بررسی حاضر همخوانی دارند.

در مطالعه ای Dhami و همکاران در سال ۱۹۹۳ تحرک پس از یخ گشایی بیشتری در رقیق کننده تریس نسبت به رقیق کننده های سیترات و لاکتوز گزارش کردند (۲). Kumar و همکاران در سال ۱۹۹۳ حداقل آسیب بر آکروزوم اسپرماتوزوئیدها در رقیق کننده تریس در مقایسه با شیر و سیترات و کمترین تحرک پس از یخ گشایی در رقیق کننده سیترات در مقایسه با رقیق کننده های شیر و تریس گزارش کردند (۹،۱۰). Dhami و همکاران در سال ۱۹۹۶ راندمان یکسانی را برای رقیق کننده های تریس و شیر در حفظ قدرت زنده ماندن و باروری پس از یخ گشایی اسپرماتوزوئیدهای گاومیش گزارش کردند (۳). تس رقیق کننده دیگری است که برای انجماد منی گاومیش به خوبی رقیق کننده تریس استفاده شده است(۱۴).

زرده تخم مرغ و گلیسرول همراه با هم به عنوان مواد محافظ در برابر سرما در رقیق کننده ها استفاده می شوند. آسیبی که سلولهای اسپرم در طول سرد شدن و یخ گشایی از آن رنج می برند ناشی از غلظت زیاد مواد حل شده در باقی مانده آب داخل سلولی است . برای این که اسپرماتوزوئیدها در انجماد زنده بمانند لازم است آنها را در رقیق کننده ای رقیق کرد که نه تنها موادی مثل زرده تخم مرغ برای محافظت آنها در برابر شوک سرما دارد بلکه مواد محافظ در برابر سرما، مثل گلیسرول هم داشته باشد تا آن را در برابر عوارض شوک کشنده انجماد حفظ کند. اکثر محققین غلظتهای ۲۰ درصد زرده تخم مرغ را به کار برده اند. باید توجه داشت هر چه غلظت زرده تخم مرغ افزایش یابد pH رقیق کننده کاهش و به سمت اسیدی پیش می رود (۱۰). گزارشی از کاربرد زرده تخم مرغ در رقیق کننده تریس تا حد ۵ درصد نیز وجود دارد بدون این که کیفیت منی منجمد گاومیش آسیب ببیند. Kumar و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان دادند که هیچ کدام از رقیق کننده های تریس، شیر و سیترات فاقد زرده تخم مرغ قادر به حفظ تحرک اسپر ماتوزوئیدها نبودند (۸). گلیسرول با غلظتهای ۶ و ۹ درصد توسط Kumar و همکاران در سال ۱۹۹۳ (۷،۱۰) و Andrabi و Abbas در سال ۲۰۰۲ (۱) و ۱۱ درصد توسط Fabbrocini و همکاران در سال ۲۰۰۰ به عنوان ماده محافظ در برابر سرما در تکنولوژی انجماد اسپرماتوزوئیدهای گاومیش به کار رفته است. مواد محافظ در برابر سرما مثل گلیسرول ظاهراً نه تنها از دست رفتن آب سلول را کاهش می دهد به این ترتیب آسیب ناشی از مواد محلول را کم می کند، بلکه به آن متصل شده باعث فراهم نبودن آب برای

جدول ۳- میانگین تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش در رقیق کننده های فسفات، سیترات و تریس.

مراحل عمل آوری	فسفات (۱) *	سیترات (۱) *	تریس (۱)	فسفات (۲) *	سیترات (۲) *	تریس (۲)
۱- فوراً بعد از رقیق سازی	۸۰	۷۰	۸۰	۷۰	۷۳	۸۰
۲- بعد از نگهداری دریخچال	۷۰	۵۵	۷۲	۵۵	۶۲	۷۰
۳- پس از ایجاد گلیسرول نهایی	تلف شدند	تلف شدند	۷۰	۴۳	۵۷	۷۰
۴- بعد از ذوب منی منجمد	-	-	۷۰	تلف شدند	۳۷	۵۲
۵- بازگشت به حالت طبیعی	-	-	۸۷/۵	-	۵۰/۷	۶۵

*) بعلاوه ۱/۲ گرم گلوکز و ۰/۱۲ گرم سیستئین در ۱۰۰ میلی لیتر.

تشکیل بلور می شود و به این ترتیب اثر یخ داخل سلولی را کم می کند (۱۱،۱۲). علاوه بر نقش حفاظتی گلیسرول در برابر سرما، همچنین گزارش شده است که گلیسرول می تواند بر آکروزوم آسیب رسانده و باروری اسپرماتوزوئیدها را کاهش دهد (۹). از این رو تلاشهایی صورت گرفته است تا ماده محافظ دیگری جایگزین آن شود ولی چندان موفق نبوده اند. علاوه بر نیاز به افزودن مقدار مناسب گلیسرول و زرده تخم مرغ برای انجماد منی گاومیش در رقیق کننده ها، زمان افزودن آنها نیز بسیار مهم می باشند.

قندهایی از قبیل گلوکز، فروکتوز، رافینوز، زایلوز و ساکاروز به عنوان مواد محافظ در برابر سرما آزمایش شده اند و چنین بیان می شود که اثر حفاظتی قندها بستگی به نوع رقیق کننده ای دارد که برای انجماد منی استفاده می شود (۸). تأثیر مفید ماده افزودنی سیستئین در محلولهای رقیق کننده تریس و سیترات بر قدرت تحرک اسپرم های گاومیش نیز گزارش شده است و بیان می شود که سیستئین اثر مهاری بر متابولیسم هوازی و تحریکی بر متابولیسم غیر هوازی دارد (۲).

نتیجه گیری

رقیق کننده تریس - زرده تخم مرغ با غلظت ۱۳ درصد گلیسرول در یک برنامه رقیق سازی دو مرحله ای، با دوز اول ۴میلی لیتر و دوز دوم ۹ میلی لیتر و گذشت زمان تعادل ۶ ساعت در یخچال ۴درجه سانتیگراد برای حفاظت اسپرماتوزوئیدها در منی منجمد گاومیش توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت مرکز پرورش و اصلاح نژاد گاومیش شمال غرب کشور به خاطر در اختیار قرار دادن کلیه امکانات و کارکنان آزمایشگاه تلقیح مصنوعی آن مرکز بخاطر کمکهای فنی تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. Abbas, A. and Andrabi, S.M.H. (2002): Effect of different glycerol concentration on motility before and after freezing, longevity and plasma membrane integrity of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. Pakistan Vet. J. 22: 1-4.
2. Dhami, A. J., Mohan, G. and Sahni, K.L. (1993): Effect of extenders and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5°C and –196°C. Indian J. Anim. Sci. 63: 492-498.
3. Dhami, A. J., Sahni, K. L., Mohan, G. and Jain, V. R. (1996): Effects of different variables on the freezability, post- thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. Theriogenol. 46:109-120.
4. Fabbrocini, A., Del Sorbo, C., Fasano, G. and Sansone, G. (2000): Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. Theriogenol. 54: 193-207.
5. Hafez, E.S.E. (2000): Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In edited by E. S. E. Hafez and B. Hafez. 7 th edn. Lippincott Wilkins, Philadelphia, USA, PP: 431-442.
6. Holt, W.V. (2000): Basic aspect of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 3-22.
7. Kumar, S., Sahni, K. L. and Mohan, G. (1993a): Effect of certain cryoprotectants on post- thaw motility and liveability of buffalo spermatozoa in egg-yolk-citrate diluent. Indian J. Anim. Sci. 63: 839-840.
8. Kumar, S., Sahni, K. L. and Mohan, G. (1993b): Effect of different concentrations of sugars on storage ability of buffalo semen in citrate diluent. Indian. J. Anim. Sci. 63: 841-842.
9. Kumar, S., Sahni, K. and Mohan, G. (1993c): Effect of different extender formulations on acrosomal maintenance of buffalo spermatozoa frozen in milk, tris and sodium citrate dilutors. Indian J. Anim. Sci. 63: 1233-1239.
10. Kumar, S., Sahni, K.L. and Mohan, G. (1993d): Freezing of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate dilutors with different levels of yolk and glycerol in relation to pH of dilutors. Indian J. Anim. Sci. 63: 499-504.
11. Kumar, S., Sahni, K.L., Mohan, G. and Benjamin, B. R. (1993d): Effect of different levels of glycerol on survival rate of freeze thawed spermatozoa of buffalo semen in diluents without yolk. Indian J. Anim. Sci. 63: 836-838.
12. Noakes, D.E., Parkinson, T.J. and England, G.C.W. (2001): Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed. W. B. Saunders company, London, PP: 753-758, 795-796.
13. Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992): Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes Theriogenol. 38: 209-222.
14. Sansone, G., Nastri, M.J.F. and Fabbrocini, A. (2000): Storage of buffalo (Bubalus bubalis) semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 55-76.
15. Singh, J., Nanda, A.S. and Adams, G.P. (2000): The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 593-604.