پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۵ تابستان ۱۳۸۶

اثر اسمولالیته محلول سوکروز بر روی ماندگاری اسپرم شتر دوکوهانه

• **امیر نیاسری نسلجی**، عضو هیات علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **علی‌اکبر قره‌داغی**، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **صمد مسافری**، عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تبریز
• **نوید بهمنی**، دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• **اکبر ابرغانی**، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل
• **اباذر قنبری**، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل
• **عباس گرامی**، عضو هیات علمی دانشکده علوم دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت‌ماه ۱۳۸۵

Email: niasari@ut.ac.ir

چکیده

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات شتر دو کوهانه (مشکین شهر، اردبیل) و در طول فصل تولید مثل، به منظور ارزیابی تاثیر اسمولالیته‌های مختلف محلول نگهدارنده سوکروز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی ماندگاری اسپرم شتر دوکوهانه انجام گرفت. منی ۱۰ نفر شتر نر دو کوهانه با استفاده از واژن مصنوعی گاوی به طور هفتگی جمع‌آوری و غلظت‌های مختلف سوکروز: ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲و ۱۳ درصد با اسمولالیته‌های به ترتیب۲۹۲، ۳۳۱، ۳۵۶، ۳۸۶ و ۴۱۰ میلی اسمول در کیلوگرم و pH برابر با ۶/۹ به همراه ۲۰ درصد زرده تخم مرغ و آنتی بیوتیک تهیه گردید. منی استحصالی پس از همگن شدن، به نسبت ۱ به ۱۰ به رقیق‌کننده‌ها اضافه شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از رقیق سازی (زمان صفر)، و در ساعات ۴، ۱۲ و ۲۴ پس از استقرار نمونه‌ها در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد)، از نظر حرکت پیش‌رونده سریع، انسجام غشا، و درصد اسپرم‌های زنده مورد ارزیابی قرار گرفتند. با در نظر گرفتن حرکت پیش رونده سریع و انسجام غشاء اسپرم، غلظت ۱۰ درصد سوکروز در مقایسه با سایر غلظت‌ها جهت نگهداری اسپرم شتر دوکوهانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت مناسب‌تر بود. ولی در همین زمان، شاخص‌های ماندگاری اسپرم نسبت به زمان صفر به شدت کاهش نشان داد ($p<0/05$). به طور کلی، محلول ایزوتونیک سوکروز (۳۳۰ میلی اسمول در کیلوگرم، معادل ۱۰ درصد) با pH ۶/۹ بهتر از غلظتهای ۹، ۱۱، ۱۲و ۱۳ درصد آن، جهت نگهداری کوتاه مدت اسپرم شتر دوکوهانه در محیط یخچال است.

کلمات کلیدی: شتر، منی، سوکروز، رقیق‌کننده

Pajouhesh & Sazandegi: No 75 pp: 112-117

Effect of sucrose extender with different levels of osmolality on the viability of spermatozoa in bactrian camel (*Camelus bactrianus*)

By: A. Niasari-Naslaji, Dept. Clinical Sciences, Fac. Vet. Med., Univ. Tehran, Iran; A. A. Gharahdaghi, Anim. Sci. Res. Institute; S. Mosaferi, Azad Islamic Univ. Tabriz, Iran; N. Bahmani, Dept. Clinical Sciences, Fac. Vet. Med., Univ. Tehran, Iran; A. Abarghani, Res. Center for Agriculture and N. Resources, Min Jihad-e-Agriculture, Ardabil, Iran; A. Ghanbari, Res. Center for Agriculture and Natural Resources, Min Jihad-e-Agriculture, Ardabil, Iran; A. Gerami, Dept. Maths, Fac. Sci., Univ. Tehran, Iran.

This experiment was conducted at the bactrian camel research center, Jahadabad, Meshginshahr, Ardabil, during the rutting season to investigate the effect of sucrose extender with different levels of osmolality on the viability of bactrian camel sperm. Semen was collected from ten camel bulls with a modified bovine artificial vagina. Sucrose diluents with the adjusted pH to 6.9 and osmolalities of 292, 331, 356, 386 and 410 mosm/kg were made using respective 9, 10, 11, 12 and 13 percent sucrose media containing 20% egg yolk and antibiotics. The semen was homogenized, diluted at the rate of 1: 10, maintained at chilled condition (4°C) and evaluated immediately (time 0), 4, 12 and 24 hours after incubation at 4°C, for sperm progressive forward motility, plasma membrane integrity and live percentage of spermatozoa. Considering progressive forward motility and plasma membrane integrity of spermatozoa, 10 percent sucrose diluent was more suitable for preservation of semen at chilled condition for 4 hours compared to other osmolalities. The viability of bactrian camel spermatozoa declined drastically by 4 hours compared to time 0 ($p<0.05$). In conclusion, isotonic sucrose extender (330 mosm/kg i.e., 10 percent) with pH of 6.9 is better than 9, 11, 12 and 13 percent for short-term preservation of bactrian camel semen at chilled storage condition.

Keywords: Camel, Semen, Sucrose, Extender

مقدمه

ذخیره منی و تلقیح مصنوعی پیش نیاز هر برنامه تولید مثلی، ازدیاد و بهبود نسل می‌باشد (۶، ۱۱). پیشرفت در زمینه تلقیح مصنوعی، ذخیره منی و تکنیک‌های وابسته در خانواده شترسانان نسبت به سایر حیوانات اهلی به کندی صورت گرفته است (۶). به منظور بهبود ذخیره سازی منی آگاهی از خصوصیات و عواملی که طول مدت ذخیره سازی آنرا تحت تأثیر قرار می‌دهد ضروری می‌باشد. میزان ماندگاری اسپرم توسط عوامل متعددی از جمله نوع و غلظت مواد استفاده شده در رقیق‌کننده و pH محلول تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۲۹). به طور معمول رقیق‌کننده مورد استفاده جهت نگهداری اسپرم باید در بردارندهٔ اسمولالیته و pH مناسب، ماده انرژی‌زا و آنتی بیوتیک باشد (۵، ۲۴، ۲۹).

میزان اسمولالیته رقیق‌کننده تاثیر قابل توجهی بر روی حجم (۷) و بقای اسپرم (۷، ۱۳) دارد. اغلب رقیق‌کننده‌های توصیه شده برای نگهداری اسپرم هیپرتونیک هستند (۱۳، ۲۸) اگر چه در پاره‌ای از موارد محلول‌های ایزوتونیک نیز توصیه شده‌اند (۲۹). محلول‌های هیپرتونیک تأثیرات مخرب کمتری نسبت به محلول‌های هیپوتونیک بر روی اسپرم دارند (۱۹). این امر شاید به دلیل از دست دادن آب در محیط‌های هیپرتونیک نسبت به محیط‌های هیپوتونیک باشد که جهت انجماد اسپرم بهتر است (۲۸، ۲۹).

افزودن قندها به رقیق کننده‌های منی حداقل سه وظیفه مهم انرژی زائی، تنظیم اسمولالیته و محافظت از سرما را بر عهده دارند (۲۸). برخی از قندها مثل گلوکز، فروکتوز و مانوز از طریق گلیکولیز (۱۹) و آرابینوز از طریق اکسیده‌شدن (۲۲) توسط اسپرم به عنوان منبع خارجی انرژی استفاده می‌شوند. اگرچه در مقدار و نوع قندی که ممکن است مورد استفاده قرار گیرد، تفاوت گونه‌ای وجود دارد (۱۸). برخی دیگر از قندها، با وزن مولکولی بالا، نظیر لاکتوز، سوکروز و رافینوز که دارای نفوذپذیری کمی در غشاء سلولی هستند، نقش مهمی در تنظیم اسمولالیته رقیق‌کننده و در نتیجه پایداری غشای اسپرم ایفاء می‌نمایند (۱۲، ۲۴). این مواد همچنین به طور معمول به عنوان محافظ سرما در نظر گرفته می‌شوند (۱۲). از رقیق‌کننده سوکروز جهت نگهداری اسپرم شتر استفاده شده است (۴، ۶، ۳۱). ولی تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تعیین اسمولالیته مناسب این رقیق‌کننده برای این گونه دامی گزارش نشده است. لازم به ذکر است که شتر دوکوهانه ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح برای اولین بار در قسمت شرق دریای خزر اهلی شده و سپس از آن ناحیه به سایر قسمت‌های جهان پخش شده است (۲۱). متاسفانه جمعیت این حیوان هم اکنون در ایران در حال انقراض می‌باشد (۱) و بر اساس آخرین گزارشات تعداد این دام به کمتر از ۱۰۰ نفر در سطح کشور رسیده است (۲). مطالعه حاضر با هدف افزایش اطلاعات موجود در خصوص تعیین اسمولالیته مناسب رقیق‌کننده سوکروز جهت نگهداری اسپرم شتر دوکوهانه در شرایط ۴ درجه سانتیگراد صورت پذیرفته است.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر در ایستگاه تحقیقات شتر دو کوهانه جهاد آباد (مشکین شهر، اردبیل) در طی سال‌های ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱ و در طول فصل تولید مثل شتر دو کوهانه (اوائل آذر تا اواخر فروردین ماه) صورت پذیرفت. برای این منظور از تعداد ده نفر شتر نر دوکوهانه (۱۲-۴ سال) به طور هفتگی جهت جمع‌آوری اسپرم استفاده شد. از یک ماه قبل از شروع آزمایش هر شتر، روزانه ۷/۵ کیلوگرم یونجه و ۲/۵ کیلوگرم کنسانتره (۶۸٪ جو، ۱۲٪ کنجاله پنبه دانه، ۱۷٪ سبوس گندم، ۱۲٪ ملاس و ۱٪ مکمل ویتامین و مواد معدنی) به صورت نواله دریافت کردند. همچنین یک ماه قبل از آغاز فصل تولید مثل، همه شترها با داروهای ضدانگلی بر علیه انگل‌های داخلی و خارجی تحت درمان قرار گرفتند. جمع‌آوری منی بوسیله مهبل مصنوعی گاو، عمل‌آوری و ارزیابی اسپرم نیز بر اساس روش ارائه شده توسط مسافری و همکاران انجام پذیرفت (۲۰). غلظت‌های ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ درصد سوکروز (Sucrose Analar BDH chemicals, Australia)، به همراه ۲۰ درصد زرده تخم مرغ، با اسمولالیته‌های به ترتیب ۲۹۲، ۳۳۱، ۳۵۶، ۳۸۶ و ۴۱۰ میلی اسمول در کیلوگرم تهیه گردید. تمامی رقیق‌کننده‌ها دارای پنی سیلین G سدیم (۱۰۰۰ IU/ml) و استرپتومایسین سولفات (۱۰۰۰ µg/ml) بوده و pH محلول‌ها با استفاده از محلول سود ۲ مولار بر روی pH خنثی تنظیم می‌گردید. نمونه منی همگن شده به نسبت ۱ به ۱۰ به رقیق‌کننده سوکروز با اسمولالیته‌های مذکور اضافه گردید. رقیق‌کننده در داخل بالون، حاوی یک عدد کلیپ استیل و مستقر در بالن آب ۳۷ درجه سانتیگراد بود که با استفاده از چرخاننده مغناطیسی به آهستگی به چرخش درآمد. در این زمان نمونه منی همگن شده به آرامی به رقیق کننده، اضافه گردیده و باعث رفع کامل چسبندگی منی شد. این آزمایش‌ها سه بار تکرارگردید. در این آزمایشها ارزیابی‌ها همیشه توسط یک نفر صورت می‌پذیرفت. حرکت جنبشی[1] اسپرم‌ها براساس روش شرح داده شده توسط Loskutoff ارزیابی گردید (۱۷). درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده سریع با جمع کردن درصد اسپرم‌های متحرک طبقه بندی شده در درجات ۳، ۴ و ۵ از حرکت جنبشی بدست آمد. تعداد اسپرم‌های زنده و مرده با روش رنگ آمیزی حیاتی با استفاده از رنگ ائوزین- B ارزیابی شد (۱۷). جهت ارزیابی انسجام و سلامت غشاء اسپرم از تکنیک HOS[2] استفاده شد (۱۵). در این روش محلول ۷۰ میلی اسمول فروکتوز (Merek,Germany)، یک گرم فروکتوز در ۸۰ میلی لیتر آب دی یونیزه) به طور روزانه تهیه و مورد استفاده قرار میگرفت. نمونه رقیق شده در داخل بشر حاوی آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و مجموعه به داخل یخچال منتقل می‌شد؛ این امر سبب می‌گردید تا حرارت نمونه بتدریج و با اجتناب از شوک سرمایی در عرض ۴ ساعت از حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گرادبه ۴ درجه سانتی‌گراد کاهش یابد. در این زمان ارزیابی دوم از نظر شاخصهای ماندگاری انجام می‌گرفت. بدنبال آن ارزیابی‌ها درساعات۱۲ و ۲۴ نیز تکرار گردید.

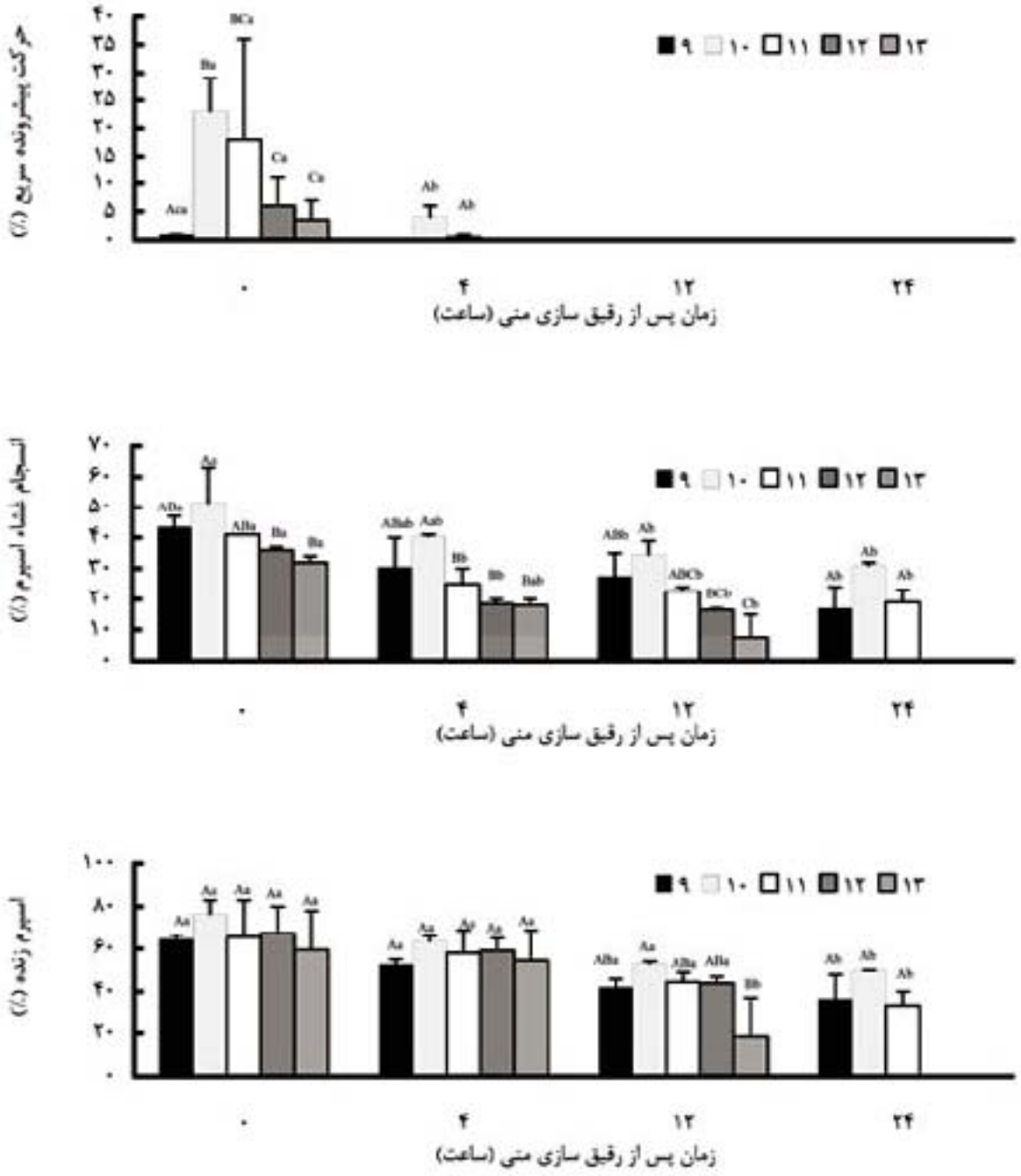
نظر به اینکه متغیرها دارای طبیعت مجزا از هم و با توزیع فراوانی دو تایی بودند، داده‌ها با استفاده از روش آرک سینوس[3] تغییر یافتند. تغییرات در حرکت پیش‌رونده، حرکت جنبشی، انسجام غشاء اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده در طول زمان از نظر تاثیر تیمار، زمان، رابطه متقابل تیمار با زمان با استفاده از روش GIM در برنامه آماری SAS/STAT (۲۰) با آنالیز یک یا چند متغیره[4] و با در نظر گرفتن اندازه‌گیری‌های تکراری[5] مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. آنالیز چند متغیره زمانی مورد استفاده قرار گرفت که ساختار واریانس و کوراریانس در طول زمان پیش نیازهای آزمون تجزیه واریانس را برآورد نمی‌کرد که این امر با استفاده از آزمون اسفرسیتی[6] تعیین می‌گردید. تفاوت بین گروهی در یک زمان مشخص با کمک آزمون تجزیه واریانس و بدنبال آن با استفاده از مربع میانگین‌ها در دستور[7] LSMEans به روش GLM و در برنامه آماری SAS/STAT ارزیابی گردیدند (۲۶). اطلاعات بدست آمده به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند.

نتایج

در زمان رقیق‌سازی منی در محلول‌های مختلف سوکروز حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها در محلول ۱۰ درصد (۲۳٪) به طور معنی‌داری بیشتر از محلول‌های ۹ (۱٪)، ۱۲ (۶٪) و ۱۳ درصد (۳/۵٪) بود ($p<0/05$)، ولی با محلول ۱۱ درصد (۱۸٪) تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$، نمودار ۱، الف). چهار ساعت بعد از انکوباسیون اسپرم‌ها در ۴ درجه سانتی‌گرادهیچ حرکت پیش‌رونده‌ای در محلول‌های ۹، ۱۲ و۱۳درصد مشاهده نشد و حرکت پیش‌رونده اسپرم‌ها به طورمعنی داری در محلول‌های ۱۰ (۴٪) و ۱۱ درصد (۰/۵٪) کاهش یافت ($p<0/01$). پس از دوازده ساعت انکوباسیون منی رقیق شده در ۴ درجه سانتی‌گراد، هیچ حرکت پیش‌رونده‌ای در هیچ یک از محیط‌ها مشاهده نگردید (نمودار ۱، الف).

بعد از استقرار اسپرم‌ها در اسمولالیته‌های مختلف محلول سوکروز، انسجام غشاء اسپرم‌ها در محلول سوکروز ۱۰ درصد (۵۱/۵٪) به طور معنی داری بیشتر از محلول‌های ۱۲ (۳۶٪) و ۱۳ درصد (۳۲٪) بود ($p<0/05$)، ولی با محلول ۱۱ درصد (۴۱ ٪) تفاوت معنی داری نداشت ($p>0/05$، نمودار ۱، ب). چهار ساعت پس از انکوباسیون منی رقیق شده در ۴ درجه سانتی‌گراد انسجام غشاء اسپرم در محلول سوکروز ۱۱ (۲۵٪) و ۱۲ درصد (۱۸/۵٪) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). در همین زمان انسجام غشاء اسپرم‌ها در محلول سوکروز ۱۰ درصد (۴۰/۵٪) به طور معنی‌داری بیشتر از محلول‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ درصد بود ($p/05<$، نمودار ۱، ب). دوازده ساعت بعد از انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد انسجام غشاء اسپرم‌ها در تمام محلول‌ها نسبت به زمان شروع آزمایش کاهش معنی داری داشت ($p<0/05$). در همین زمان انسجام غشاء اسپرم‌ها در محلول سوکروز ۱۰ درصد (۳۴/۵٪) به طور معنی داری بیشتر از محلول‌های ۱۲ (۱۶/۵) و ۱۳ درصد (۷/۵) بود ($p<0/05$، نمودار ۱، ب). بیست و چهار ساعت بعد از انکوباسیون منی رقیق شده در ۴ درجه سانتی‌گراد انسجام غشاء اسپرم‌ها درمحلول سوکروز ۱۰ درصد (۳۱٪) یا محلول ۹ (۱۷٪، $p/07=$) و ۱۱ درصد (۱۹، $p=0/1$) تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودار ۱، ب).

در آغاز رقیق سازی درصد اسپرم‌های زنده در اسمولالیته‌های مختلف محلول سوکروز تفاوت معنی داری با هم نداشت (۹ درصد: ۶۴/۵٪، ۱۰ درصد: ۷۶/۵٪، ۱۱ درصد: ۶۵/۵٪ ۱۲ درصد: ۶۷/۵٪ و ۱۳ درصد: ۵۹/۵٪، $p<0/05$، نمودار ۱، ج). چهار ساعت پس از انکوباسیون منی رقیق شده در ۴ درجه سانتی‌گراد تعداد اسپرم‌های زنده در اسمولالیته‌های مختلف محلول سوکروز نسبت به زمان شروع آزمایش کاهش



نمودار ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف محلول سوکروز ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ درصد (به ترتیب ■ ۹ □ ۱۰ ■ ۱۱ ■ ۱۲ ■ ۱۳) بر روی (الف) حرکت پیش‌رونده سریع، (ب) انسجام غشاء و (ج) درصد اسپرم‌های زنده اسپرم شتر دوکوهانه نگهداری شده در ۴ درجه سانتیگراد. ارزشهای نشان داده شده عبارتند ± از میانگین خطای استاندارد. مقادیر دارای حروف لاتین بزرگ متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در یک زمان هستند ۰/۰۵> p. مقادیر دارای حروف لاتین کوچک متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در طول آزمایش و در یک تیمار هستند (۰/۰۵> p).

معنی‌داری نداشت ($p<0/05$). دوازده ساعت پس از انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد درصد اسپرم‌های زنده درمحیط سوکروز ۱۳ درصد (۱۸/۵٪) به طور معنی‌داری نسبت به ساعت ۴ کاهش یافت ($p<0/01$). درصد اسپرم‌های زنده در محلول‌های

۱۰ (۵۳ ٪، $p=0/05$)، ۱۱(۴۴/۵٪، $p=0/08$) و ۱۲(۴۴٪، $p=0/06$)

نسبت به زمان شروع آزمایش کاهش معنی‌داری نداشت. در همین زمان درصد اسپرم‌های زنده در محلول سوکروز ۱۰٪ به طور معنی‌داری بیشتر از محلول سوکروز ۱۳ درصد بود ($p<0/05$). بیست و چهار ساعت بعداز انکوباسیون اسپرم‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد درصد اسپرم‌های زنده در تمام محلول‌ها نسبت به زمان شروع آزمایش به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). در دو محلول سوکروز ۱۲ و ۱۳ درصد هیچ اسپرم زنده‌ای مشاهده نگردید (نمودار ۱، ج).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که در pH خنثی، اگرچه در زمان رقیق‌سازی تفاوتی در شاخص‌های ماندگاری اسپرم در بین غلظتهای ۱۰ و ۱۱ درصد مشاهده نشد، ولی با در نظر گرفتن حرکت پیش رونده سریع و انسجام غشاء اسپرم بهترین محلول سوکروز جهت رقیق سازی اسپرم شتر دوکوهانه، بمدت ۴ ساعت در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد، غلظت ۱۰ درصد آن می‌باشد. با توجه به اسمولالیته منی شتر دوکوهانه (اسمولالیته ۳۴۸-۳۰۰ میلی اسمول/ کیلوگرم؛ ۲۰) و نتایج بدست آمده در این پژوهش، چنین به نظر می‌رسد که محلول ایزوتونیک (۳۳۰ میلی اسمول در کیلوگرم، معادل ۱۰ درصد سوکروز) در مقایسه با سایر غلظت‌های مورد بررسی جهت رقیق سازی اسپرم شتر دوکوهانه مناسب‌تر می‌باشد. ولی باید توجه داشت که رقیق‌کننده سوکروز، حتی در غلظت ۱۰ درصد، محیط مناسبی جهت نگهداری اسپرم شتر دوکوهانه پس از گذشت ۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد نمی‌باشد زیرا حرکت پیش‌رونده سریع اسپرم پس از گذشت مدت مذکور نسبت به آغاز رقیق سازی به طور معنی‌داری کاهش یافته است. بنابراین تحقیقات دیگری به منظور دستیابی به رقیق‌کننده مناسب برای نگهداری اسپرم شتر دوکوهانه ضروری به نظر می‌رسد.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که دی‌ساکارید نظیر سوکروز و لاکتوز در پایداری ساختار غشاء دولایه سلولها مؤثر می‌باشند (۳، ۱۰، ۲۷). سوکروز و ترهالوز از جمله قندهایی هستند که توانایی عبور از غشاء سلولی را ندارند. وجود این قندها در رقیق‌کننده سبب ایجاد محیط هیپرتونیک گردیده که متعاقب آن سلول آب خود را از دست داده و چروکیدگی در آن ایجاد می‌شود (۱۶). بعلاوه این قندها با تشکیل اتصالات هیدروژنی با بخش قطبی فسفولیپیدهای غشاء سلولی (۳، ۹، ۲۳) از صدمات غشاء سلولی که ممکن است در اثر تغییرات حجم و فشار اسمزی ایجاد شود جلوگیری می‌نمایند.

Zhao مجموعه‌ای از رقیق‌کننده‌های مختلف را جهت رقیق سازی و نگهداری منی شتر دوکوهانه در شرایط سرما (۴ درجه سانتی‌گراد) پیشنهاد نمود. رقیق‌کننده‌های پیشنهادی عبارت بودند از: ترکیبی از سوکروز ۱۲٪ و گلوکز ۷٪، رقیق‌کننده سوکروز و آمینواستیک اسید، رقیق‌کننده لاکتوز و گلوکز، رقیق‌کننده سوکروز و سیترات سدیم و بالاخره رقیق‌کننده گلوکز و شیرخشک[۸]. در این گزارش به میزان مواد فوق در رقیق‌کننده و شاخص‌های ماندگاری اسپرم در هر یک از رقیق‌کننده‌ها اشاره‌ای نشده است (۳۰). چانگ محلول سوکروز ۱۲ درصد و یا مخلوطی از حجم مساوی سوکروز ۱۲ درصد و گلوکز ۶ درصد را جهت رقیق‌سازی اسپرم شتر دوکوهانه پیشنهاد نمود (۸). ولی در این مطالعه گزارشی از ارزیابی اسپرم و یا نرخ آبستنی بعد از رقیق سازی وجود ندارد. Hassan و همکاران تأثیر سه رقیق‌کننده تریس، اسیدسیتریک، گلوکز و مانوز (بافر A، اسمولالیته ۴۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم و pH ۳/۷)، بافر A به همراه ۱٪ درجنت مخصوص بنام Orvus Es Past (بافر B، اسمولالیته ۴۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم و pH ۳/۷) و ترکیب لاکتوز و فروکتوز (بافر C) را بر روی ماندگاری اسپرم شتر تک کوهانه در شرایط سرما (۴ درجه سانتی‌گراد) آزمایش کردند. درصد اسپرم‌های متحرک (نوع تحرک در مقاله ذکر نشده است) در زمان شروع آزمایش، ۱۰ و ۲۴ ساعت بعد در بافر A به ترتیب ۶۰ و ۲ و صفر، در بافر B به ترتیب ۶۰، صفر و صفر و در بافر C به ترتیب ۵۵، ۵۵ و صفر درصد گزارش شده است. در این مقاله به غلظت مواد بکار گرفته شده در رقیق‌کننده اشاره‌ای نشده است (۱۴). Anouassi و همکاران از محلول لاکتوز ۱۱ درصد جهت رقیق سازی منی و در پی آن تلقیح مصنوعی شتر تک کوهانه استفاده نمودند. در این گزارش که پس از ایجاد تخمک گذاری و تلقیح شترها در فاصله ۱۵ دقیقه پس از رقیق‌سازی منی در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد صورت پذیرفت، تعداد یک نفر از دو نفر شتر تخمک‌گذاری کرده و ۵ نفر از ۶ نفر شتر تخمک‌گذاری کرده در دو بررسی مستقل آبستن شدند (۴).

با مرور مقالات فوق و مطالعات انجام گرفته در شتر تک کوهانه و دو کوهانه معلوم می‌شود که تا کنون بررسی مقایسه‌ای کاملی در زمینه اسمولالیته مناسب جهت نگهداری منی شتر دوکوهانه انجام نگرفته است. در مطالعات صورت گرفته اطلاعات در مورد شاخص‌های ماندگاری اسپرم شتر بسیار محدود و ناقص می‌باشد و از این لحاظ تحقیق حاضر هم از نظر مقایسه اسمولالیته‌های مختلف محلول سوکروز و هم از نظر بررسی شاخص‌های ماندگاری اسپرم شتر کم‌نظیر می‌باشد.

سپاسگزاری

منابع مالی پژوهش حاضر توسط مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، معاونت پژوهشی دانشگاه تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و قطب علمی علوم درمانگاهی دامپزشکی تامین گردید. نویسندگان مراتب قدردانی خویش را از مسئولین و دست‌اندرکاران محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، به ویژه ایستگاه تحقیقات شتر دوکوهانه واقع در مشکین شهر اردبیل، ابراز می‌دارند.

پاورقی‌ها

1- Kinetic Rating
2- Hypoosmotic swelling test
3- Arcsin
4- Univariable or multivariable
5- Repeated measures analysis
6- Sphericity test
7- Least squares means

8- Skim milk

منابع مورد استفاده

۱ - ابرغانی، ا؛ خاکی، م و قنبری، ا. ۱۳۷۸؛ بررسی وضعیت شترهای دوکوهانه اردبیل. گزارش طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام وزارت جهاد کشاورزی استان اردبیل، ص ۳۲-۹. ۱-

۲- مرکز آمار ایران. ۱۳۸۰. سالنامه آماری کشور ۱۳۸۰. سازمان برنامه و بودجه.

3- Anchordoguy, T. J., Rudolph, A. S., Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. 1987; Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology. 24: 324–331.

4- Anouassi, A., Adnani, M. and Raed, E. L. 1992; Artificial insemination in the camel requires induction of ovulation to achieve pregnancy. Proc. 1st Int. Camel Conf., Dubai, U.A.E., pp: 175-177.

5- Bearden, H. J. and Fuquary, J. 2000; Buffer solution used in semen dilution. Applied animal reproduction, 5th ed, pp: 185-190.

6- Bravo, P. W., Skidmore, J. A. and Zhao, X. X. 2000; Reproduction aspects and storage of semen in camelidae. Anim. Reprod. Sci. 62: 173-193.

7- Bredderman, P. J. and Foote, R. H. 1969; Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets, and the relationship of cell size to motility and fertility. J. Anim. Sci. 28: 496–501.

8- Chong, S., 1995; The order of performing Winter artificial insemination in Bactrian camels. Camel News-Lett. 11: 25-32.

9- Crowe, L. M., Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Aurrel Wistrom, C., Spargo, P. J. and Anchordoguy, T. J. 1990; Interactions of sugars with membranes. Biochim. Biophys. Acta. 947: 367–384.

10- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B. and Verkleij, A. J. 1993; Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling. Cryobiology. 30: 32–44.

11- Deen, A. and Sahani, M. S. 2000; Preliminary attempts to collect and cryopreserve camel semen. J. Camel Prac. Res. 7: 181-186.

12- England G. W. C., 1992; The Cryopreservation of dog semen. PhD thesis, University of London.

13- Fiser, P. S., Ainsworth, L. and Langford G. 1981; Effect of osmolality of skim-milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. Cryobiology. 18: 399-403.

14- Hassan, M. M., Saeed, M. and Ul-Moqtadir, R. 1995; Semen collection by artificial vagina and cryopreservation of camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. Pakis. Vet. J. 15: 105-108.

15- Kumi Diaka, J., 1993; Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. Theriogenology. 39: 1279-1289.

16- Liu, Z., Foote R. T. and Brockett C. C. 1998; Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiology 37: 219–230.

17- Loskutoff, N. M., 1999; Generalized procedures for harvesting sperm post-mortem for cryobanking. In: Standard Operating Procedure: Genome Resource Banking and Assisted Reproduction. Loskutoff N.M and Crichton E.G (eds). The Bill and Berniece Grewcock Center for Conservation and Research Omaha's Henry Doorly Zoo, pp: 8-16.

18- Mann, T. and Lutwak-Mann C. 1981; Male reproductive Function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag, Berlin, pp: 150-155.

19- Mann, T., 1964; The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, 2ed., Methuen, Press, London, pp: 265-364.

20- Mosaferi, S., Niasari-Naslaji, A., Abarghani, A., Gharahdaghi A. A. and Gerami A. 2005; Biophysical and biochemical characteristics of bactrian camel semen collected by artificial vagina. Theriogenology. 63: 92-101.

21- Murray, E. F. 1997; Evolutionary history and differences between camels and ruminants. J. Camel Prac. Res. 4: 99-105.

22-O'Dell, W. T., Almquist, J. O. and Flipse, R. j. 1959; Metabolism of bovine semen: Effect of fructose and arabinose on the uptake and metabolic utilization of glycerol-l-C14 by bovine spermatozoa. J. Dairy Sci. 42: 89-93.

23- Rudolph, A. S. and Crowe, J. H. 1985; Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology. 22: 367–377.

24- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. 2000; Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 77-111.

25- SAS/STAT 1996; User's Guide (version 6.12). SAS Institute Inc., Cary, NC.

26- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980; Principles and Procedure of Statistics. A biometrical Approach. 2nd ed., McGraw-Hill, pp: 544-545.

27- Strauss, G., Schurtenberger, P. and Hauser, H. 1986; The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: Stabilization during freezing–thawing and freezing– drying. Biochim. Biophys. Acta 858: 169–180.

28- Watson, P. F., 1979; The preservation of semen in mammals. In: Oxford reviews of reproductive biology. Finn C.A. (ed.), Oxford University Press, Vol. l, pp: 283-350.

29- Watson, P. F., 1990; Artificial insemination and the preservation of Semen. In: Marshall's physiology of Reproduction, Vol. 2. Reproduction in the male. Lamming G.E.(ed), Churchill Livingston, pp: 746-869.

30- Zhao, X. X., 2000; Reproduction in the Bactrian camel. In: Selected Topics on Camelids. Gahlot, T.K. and Singh, J. (eds). The Camelid Publishers, Bikaner, pp: 499-538.

31- Zhao, X. X., Huang, Y. M., Nie, Q. C., Zhang, Y. K. and Chen, B. X. 1996; Effect of different extenders on motility survival and acrosomal integrity of camel spermatozoa frozen in ampoules. J. Camel Prac. Res. 3: 23-25.