تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸
صفحه‌های ۴۱۸-۴۰۹

اثر انجماد با رقیق‌کننده‌های مختلف برکیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین با تکنیک Real-time qPCR

سپیده رستمی[۱*]، محمدتقی بیگی نصیری[۲]، محمود نظری[۳]، صالح طباطبایی وکیلی[۴]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۳. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۰۱

چکیده
اثر دو رقیق‌کننده مختلف تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر کیفیت منی و نسبت جنسیت اسپرم گاو هلشتاین در طول فرآیند رقیق‌سازی و انجماد با استفاده از تکنیک real- time qPCR بررسی شد. این آزمایش با استفاده از چهار گاو نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی و به‌مدت چهار هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ژن‌های PLP و SRY به‌ترتیب برای جداسازی قطعات خاصی از توالی‌های کروموزوم X- و Y- تکثیر شدند. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد در مقایسه با تریس- زرده تخم‌مرغ، کیفیت منی در انجماد و یخ‌گشایی را بهبود داد. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن PLP (۱/۴۳±۰/۱۶)، (P= ۰/۰۱) و کاهش معنی‌دار بیان ژن SRY (۰/۶۴±۰/۱۱)، (P= ۰/۰۰۹) در حالت مایع و فرایند انجماد شد. استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن PLP (۰/۳±۰/۰۶)، (P <۰/۰۰۰۱) و افزایش معنی‌دار بیان ژن SRY (۱/۱۹±۰/۰۵)، (P= ۰/۰۰۱) در حالت انجماد شد. بر اساس نتایج، استفاده از منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده آندرومد و منی منجمد شده با تریس- زرده تخم‌مرغ به‌ترتیب سبب افزایش ماده‌زایی و نرزایی در گله گاو شیری می‌شود.

کلید واژه‌ها: آندرومد، زرده تخم‌مرغ، ژن PLP، ژن SRY، کروموزوم Y.

Effect of freezing with different extenders on the semen quality and sex ratio of Holstien bull sperm by Real-time qPCR technique

Sepideh Rostami[1*], Mohammad Taghi Beigi Nassiri[2], Mahmood Nazari[3], Saleh Tabatabaei Vakili[4]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
4. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
Received: February 19, 2019 Accepted: June 22, 2019

Abstract
The effects of two different extenders were investigated (Tris- egg yolk and Andromed extenders) on semen quality and sex ratio during the dilution and freezing process in Holstien bull by using the real-time qPCR technique. The experiment was conducted using four 4-years old Holstien bulls for a period of four weeks in a completely randomized design. The PLP and SRY genes were amplified to isolate the specific fragments of X- and Y- chromosome sequences, respectively. Using Andromed diluent in comparison with Tris- eggs yolk improved semen quality during freezing and thawing. Using Andromed extender significantly increased the PLP gene expression (1.43±0.16), (P= 0/01) and reduced SRY gene expression (0.64±0.11), (P= 0/009). Using Tris- egg yolk extender led to a significant reduced in expression of PLP gene (0.3±0.06), (P< 0/0001) and s increased SRY gene expression during freezing (1.19±0.05), (P= 0/001). Based on the results, sperm dilution with Andromed extender and frozen semen with Tris-egg yolk increase birth of female and male in dairy cow herd, respectively.

Keywords: Andromed, PLP gene, SRY gene, Y- chromosome, egg yolk.

* نویسنده مسئول
Email: S.Rostami1585@gmail.com

مقدمه

تاکنون تلاش‌های بسیاری برای پیشرفت تکنولوژی انجماد اسپرم انجام شده است، با این وجود موفقیت این فناوری با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و جنبایی بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مواجه است، زنده‌مانی و جنبایی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی متأثر از عوامل متعددی از قبیل کیفیت منی و نوع و غلظت ترکیبات موجود در رقیق‌کننده می‌باشد [۳]. بنابراین، استفاده از رقیق‌کننده مناسبی که اسپرم‌ها را در برابر آسیب‌های انجماد و یخ‌گشایی محافظت کرده و زنده‌مانی و جنبایی آن‌ها را بعد از یخ‌گشایی حفظ کند، بسیار حائز اهمیت است [۵]. نوع رقیق‌کننده مورد استفاده طی فرآیند انجماد، با آسیب DNA اسپرم در ارتباط است، اساساً انجماد به‌عنوان عامل آسیب به DNA مطرح می‌شود و انجماد بهینه می‌تواند توانایی اسپرم در طی فرایند انجماد و شوک سرمایی را افزایش داده و منجر به بهبود کیفیت اسپرم در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی شود [۱۲]. نقش ترکیبات زرده تخم‌مرغ بر کیفیت اسپرم و سلامت DNA ثابت شده است [۲۵]. اجزای زرده تخم‌مرغ حفاظت خوبی را در فرایند انجماد برای اسپرم ایجاد می‌کند. زرده تخم‌مرغ دارای لیپوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) است که اثرات مفیدی بر کیفیت اسپرم و سلامت DNA بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی دارد [۲۳]. مشکلات رقیق‌کننده‌های حاوی منابع حیوانی منجر به افزایش تمایل برای استفاده از منابع گیاهی شده است، آندرومد، رقیق‌کننده‌ای بر پایه بافر تریس بوده و حاوی لسیتین سویا، سیتریک اسید، قند و گلیسرول می‌باشد و برای انجماد منی استفاده می‌شود [۸].

امروزه پیش انتخاب جنسیت، نشان‌دهنده یک پتانسیل بزرگ در جهت پیشرفت ژنتیکی و رضایت تقاضای بازار است. بسیاری از تکنیک‌های گذشته انتخاب جنسیت، بر جداسازی فیزیکی اسپرم X و Y تمرکز داشتند که این روش‌های جداسازی، بر اساس اختلاف در تحرک، محتوای DNA و آنتی‌ژن سطح اسپرم‌ها بوده و اغلب اثرات نامطلوبی بر کیفیت منی داشتند [۱۸]. هم‌چنین روش‌های دیگری برای جداسازی اسپرم گزارش شده است که شامل شیب غلظت، گرادیان آلبومین، شنا به سمت بالا و گرادیان پرکل (جداسازی بر پایه تفاوت در چگالی اسپرم‌ها) می‌باشد، نتایج این روش‌ها بجز فلوسایتومتری رضایت‌بخش نبوده‌است. امروزه استفاده از روش Real time qPCR، برای ارزیابی نسبت جنسیت اسپرم‌های مایع منی پیشنهاد شده است، با استفاده از این تکنیک می‌توان نسبت جنسیت را به‌طور آسان‌تر و با دقت ۹۹ درصد ارزیابی کرد [۶].

یکی از ژن‌های موجود در کروموزوم Y، ناحیه کدکننده جنسیت کروموزوم Y یا ژن SRY (Sex- related Y) می‌باشد، این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم Y نزدیک به سانترومر قرار دارد. ژن SRY بر زنده‌مانی کروموزوم Y مؤثر است، لذا می‌توان نقش آن بر نسبت جمعیتی کروموزوم‌های X و Y را بررسی نمود [۱۸]. اخیراً پروتئولیپید پروتئین یا ژن PLP (Proteolipid protein) برای شناسایی کروموزوم X پیشنهاد شده است. این ژن در همه بافت‌های عصبی و غیرعصبی بیان می‌شود و در تمام بافت‌های غیرعصبی در طی تکثیر طبیعی، مانع آپوپتوز می‌شود [۲۰]. با توجه به این‌که انجماد موجب تخریب DNA و تغییر در نسبت جنسیت اسپرم می‌شود، این تغییر در نسبت جنسیت ممکن است تحت تأثیر رقیق‌کننده‌ها یا فرایند انجماد قرار گیرد [۱۹]. هدف از این پژوهش، بررسی اثر انجماد با استفاده از رقیق‌کننده‌های آندرومد و تریس- زرده تخم‌مرغ بر نسبت جنسیت اسپرم در گاو هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

تمام مواد مورداستفاده برای استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدها از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. جهت انجام واکنش Real time-qPCR از کیت تجاری Amplicon (Cat. NO: 5000830-1250) استفاده شد. نمونه‌گیری و انجماد منی در مرکز تولید مواد ژنتیکی دام و طیور خوزستان، واقع در شهر ملاثانی در ۳۷ کیلومتری شمال‌شرقی اهواز انجام شد. مراحل مربوط به استخراج DNA و سایر مراحل آزمایشگاهی، در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. از چهار گاو بالغ نر نژاد هلشتاین در سن چهار سالگی به‌مدت چهار هفته، به تعداد یک بار در هفته با استفاده از مهبل مصنوعی اسپرم‌گیری شد. پس از اسپرم‌گیری نمونه‌ها به سرعت به داخل بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و تحرک اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد و نمونه‌های دارای بیش‌تر از ۷۰ درصد تحرک برای ادامه آزمایش انتخاب و با هم مخلوط شدند [۹].

سپس نمونه‌های منی جمع‌آوری‌شده به دو بخش تقسیم شدند، یک بخش با استفاده از رقیق‌کننده آندرومد (مینی‌تب، آلمان) و بخش دیگر با استفاده از بافر تریس رقیق شدند. رقیق کننده آندرومد حاوی ترکیب چربی‌های با منشأ گیاهی، فسفولیپیدها، اسید سیتریک، قند، آنتی‌اکسیدان‌ها، بافرها و گلیسرول بود. رقیق‌کننده تریس حاوی تریس (۳۰/۲۵ گرم در لیتر)، اسیدسیتریک (۱۷ گرم در لیتر) و فروکتوز (۱۲/۵ گرم در لیتر) بود [۲] و مقدار ۱۶ میلی‌لیتر زرده تخم مرغ، ۵/۳ درصد گلیسرول، پنی سیلین ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، استرپتو مایسین ۱۰۰ میلی‌گرم، آب مقطر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد. پس از رقیق‌سازی، بخشی از نمونه‌ها در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری بسته‌بندی‌شده، سپس پایوت‌ها به‌مدت چهار ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، سپس به تانک ازت (دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. پس از دو هفته، پایوت‌ها از تانک ازت خارج و در حمام آب گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) یخ‌گشایی شدند.

pH نمونه‌های منی و خصوصیات کیفی اسپرم نظیر جنبائی، زنده‌مانی و سلامت غشا در طی سه مرحله قبل رقیق‌سازی، بعد از رقیق‌سازی و بعد یخ‌گشایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی (زنده‌مانی) از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. در این روش، اسپرم‌های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند، ولی اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای ارزیابی نمونه ده میکرولیتر اسپرم به‌وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم تمیز قرار داده شد. لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی، زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰× ارزیابی شدند. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ‌نشده (زنده)، محاسبه شد.

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به‌وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک بررسی شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و پس از تهیه اسمیر (گسترش) روی لام و خشک‌شدن آن، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰×، ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای دم گره‌خورده (اسپرم‌های دارای غشای فعال) محاسبه شد. دو هفته پس از انجماد، پایوت‌های منجمد در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه قرار گرفته و خصوصیات کیفی اسپرم مطابق با مرحله پیش از انجماد تعیین شد. در این تحقیق به‌منظور شست‌وشوی منی و حذف سلول‌های مرده و سایر مواد اضافی اسپرم در

مرحله قبل رقیق‌سازی، بعد رقیق‌سازی و بعد یخ‌گشایی، از تکنیک Swim up (شنا به سمت بالا) استفاده شد [۱۰]. سپس جهت استخراج DNA از اسپرماتوزوئیدهای زنده جداسازی‌شده با تکنیک Swim up، از پروتکل استخراج نمکی استفاده شد [۱۵]، و برای تعیین خلوص DNA از ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

در پژوهش حاضر، ژن SRY به‌عنوان ژن نرزایی روی کروموزوم Y با طول قطعه ۸۹ بیس پیر و توالی رفت F:5´CTCAGACATCAGCAAGCAGC-3´ و برگشت R:5´-GTAGTCTCTGTGCCTCCTCA-3´ و با شماره بانک ژنی AJ009913-1 انتخاب شد. هم‌چنین ژن PLP به‌عنوان ژن ماده‌زایی با طول قطعه ۹۰ بیس پیر و توالی رفت F:5´GAGGGAGGGTGGATCATAGA-3´ و برگشت R:5´-:CCTCTGGGACCTTCAACAAT-3´ و با شماره بانک ژنی EU581861-1 انتخاب شد، از ژن گیرنده پروتئیناز فعال (PAR) به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. این ژن دارای طول قطعه ۷۹ بیس پیر و توالی رفت F:5´-GCCATCACATCTGAGACCAC-3´ و برگشت R:5´-GACTCAGCATCTCGAAGCAA-3´ و با شماره بانک ژنی AC234910-2 مورد استفاده قرار گرفت [۱].

به‌منظور تأیید تکثیر اختصاصی ژن‌های موردنظر، با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، ابتدا واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermalcycler Mini، کشور آلمان) انجام گرفت. پس از طی مراحل ذکرشده، واکنش Real-time PCR برای نمونه‌های DNA حاصل از اسپرماتوزوئید با دو تکرار آزمایشی برای ژن‌های PLP، SRY، و ژن مرجع PAR با استفاده از دستگاه (Step one Real Time PCR System Plus، کشور آمریکا) در پلت‌های مجزا انجام شد. (جدول ۱) مراحل انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز را نشان می‌دهد.

جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از Real-time PCR ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Step-one ABI، یک گزارش از کلیه اطلاعات موجود به‌صورت فایل Word (نسخه 2013) استخراج شده و سپس به نرم‌افزار Excel (نسخه 2013) انتقال داده شد. برای بررسی و تحلیل مراحل فوق مقادیر مربوط به چرخه آستانه (CT) حاصل از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی هر نمونه وارد نرم‌افزار Excel شد. به‌منظور محاسبه درصد نسبی ژن PLP و SRY در اسپرماتوزوئیدهای جمع‌آوری‌شده، میانگین CT برای تکرارهای تکنیکی محاسبه شد (روابط ۱، ۲ و ۳) و پس از تعیین میزان ΔCT برای تمامی نمونه‌ها، میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر (Foldchange) با استفاده از (رابطه ۴) محاسبه شد.

رابطه ۱) $\Delta CT = CT_{(Target)} - CT_{(Refrence)}$

رابطه ۲) $\Delta CT = CT_{(PLP)} - CT_{(PAR)}$

رابطه ۳) $\Delta CT = CT_{(SRY)} - CT_{(PAR)}$

رابطه ۴) $\text{Fold change} = \frac{2^{-(ct\,\text{target}-ct\,reference)}sample}{2^{-(ct\,\text{target}-ct\,reference)}control} = 2^{-(\Delta ct\ sample-\Delta ct\ control)}$

جدول ۱. چرخه دمایی مورداستفاده در واکنش Real- time PCR

مراحل	تعداد چرخه‌ها		دما	زمان
مرحله اول	۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه
مرحله دوم	۴۰	واسرشت‌سازی	۹۵	۱۵–۳۰ ثانیه
		اتصال پرایمر	۶۰	۳۰ ثانیه
مرحله سوم		بسط	۷۲	۳۰ ثانیه
		(رسم منحنی تفکیک)	۵۵–۵۹	۱۰ ثانیه

تجزیه داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و با استفاده از رویه آماری GLM انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند، داده‌های مربوط به real time به‌روش t-test مقایسه شدند (رابطه ۵).

رابطه ۵) $Y_{ij}= \mu+ t_i+ e_{ij}$

در این رابطه، Y_{ij}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر تیمار؛ و e_{ij}، اثر خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

نتایج بررسی اثر دو رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین بعد از رقیق‌سازی در (جدول ۲) ارائه شده است. تحرک اسپرم، زنده‌مانی و سلامت غشا تحت تأثیر رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (P<۰/۰۵).

مقایسه اثر رقیق‌کننده آندرومد و زرده تخم‌مرغ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بعد از فرایند انجماد و یخ‌گشایی مانند تحرک، زنده مانی، سلامت غشا و ناهنجاری و PH در (جدول ۳) گزارش شده است. تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم و pH منی هنگام استفاده از رقیق‌کننده آندرومد بالاتر و میزان ناهنجاری آن کم‌تر از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ بود (P<۰/۰۵).

ژن‌های PLP، SRY و PAR به شکل مناسبی تکثیر شدند (شکل ۱). هم‌چنین آنالیز منحنی ذوب که یکی از مراحل اصلی در بررسی داده‌های حاصل از واکنش Real-time PCR می‌باشد، در (شکل ۲)، نمودارهای الف، ب و ج مشاهده می‌شود. نمودار قله ذوب ژن PLP، SRY و PAR تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را نشان می‌دهد.

نتایج آنالیزهای آماری اطلاعات حاصل از Real time PCR در تحقیق حاضر در جدول‌های ۴ و ۵ ارائه شده است، نتایج ارائه‌شده در جدول ۴ نشان داد که تکنیک Swim up منجر به افزایش معنی‌دار ژن SRY (P= ۰/۰۱) و کاهش معنی‌دار ژن PLP (P= ۰/۰۴) شد. علاوه بر این، افزودن زرده تخم‌مرغ به رقیق‌کننده تریس در حالت مایع، اثر معنی‌داری روی بیان ژن SRY و PLP نداشت، اما افزودن رقیق‌کننده آندرومد به منی در حالت مایع منجر به کاهش معنی‌دار ژن SRY (P= ۰/۰۰۹) و افزایش معنی‌دار ژن PLP (P= ۰/۰۱) شد.

جدول ۲. اثر دو رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین (خطای استاندارد ± میانگین)

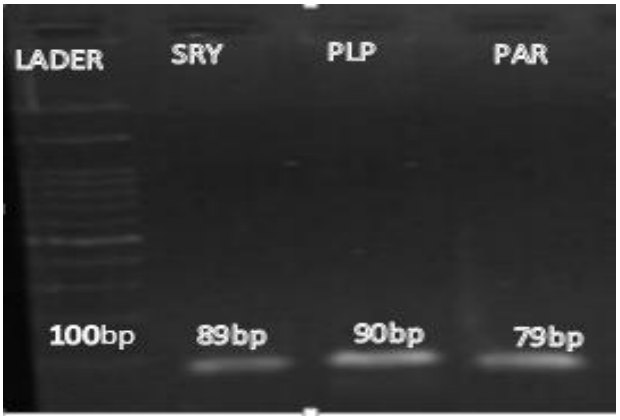
	تحرک (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	سلامت غشا (درصد)	ناهنجاری (درصد)	pH
شاهد	۷۲/۲۵±۱/۱۰^{b}	۸۴/۰۰±۲/۱۶^{b}	۷۴/۲۵±۱/۱۰^{c}	۴/۷۵±۰/۴۷^{ab}	۶/۹۶±۰/۰۱
تریس- زرده تخم‌مرغ	۸۰/۵±۱/۰۴^{a}	۹۱/۵۰±۱/۴۴^{a}	۸۱/۲۵±۲/۲۸^{b}	۵/۷۵±۰/۴۷^{a}	۶/۹۸±۰/۰۰۹
آندرومد	۹۲/۰۰±۱/۰۳^{a}	۹۱/۲۵±۱/۴۹^{a}	۹۱/۰۰±۱/۶۸^{a}	۳/۷۵±۰/۴۷^{b}	۶/۹۶±۰/۰۰۷

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

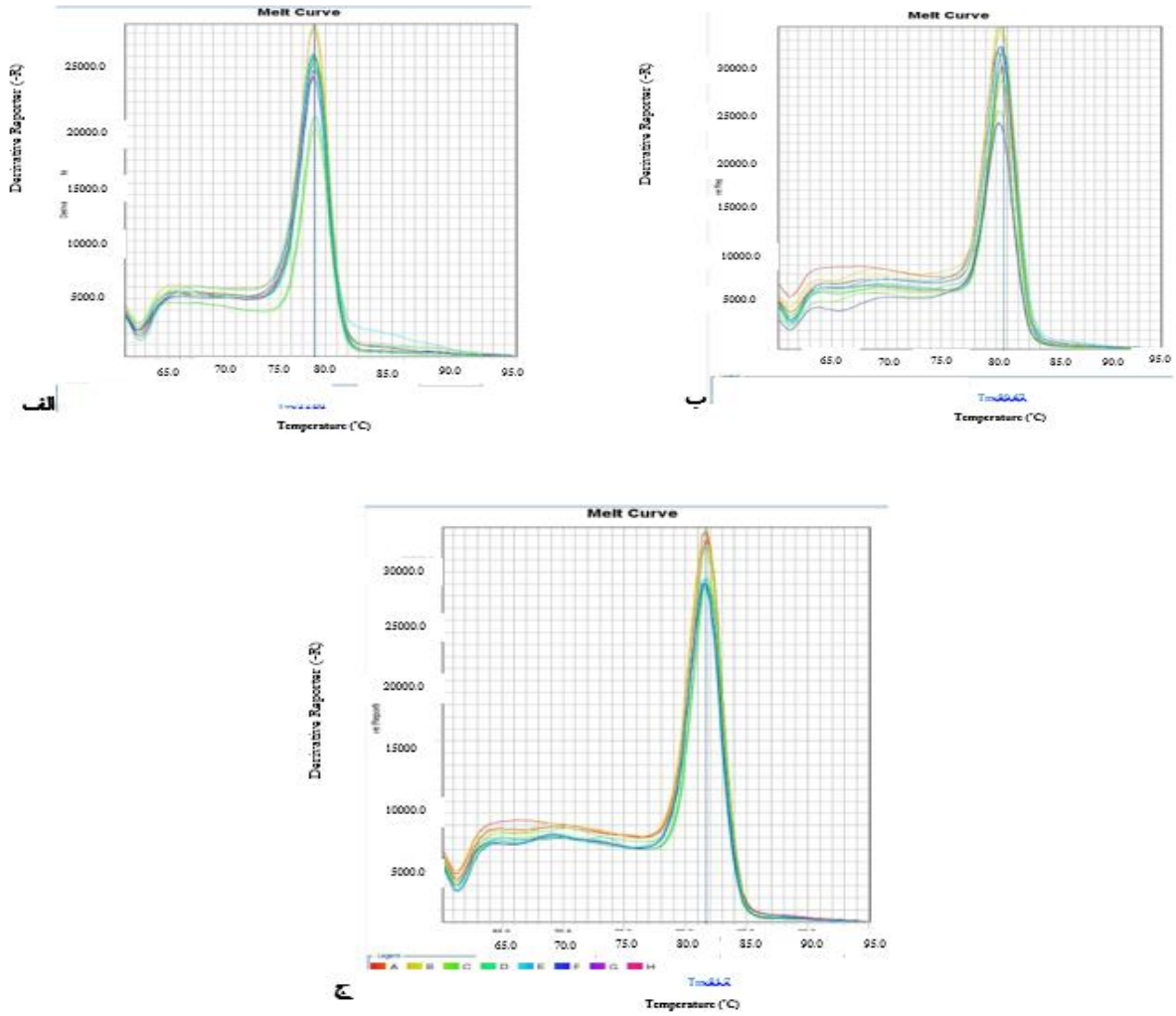
جدول۳. اثر دو رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم گاو هلشتاین بعد از فرایند یخ‌گشایی (خطای استاندارد ± میانگین)

	تحرک (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	سلامت غشاء (درصد)	ناهنجاری (درصد)	pH
تریس- زرده تخم‌مرغ	۴۳/۷۵±۱/۳۲^{b}	۶۲/۲۵±۱/۶۵^{b}	۵۹/۷۵±۱/۶۵^{b}	۱۰/۷۵±۰/۶۲^{b}	۷/۰۲±۰/۰۱^{a}
آندرومد	۵۷/۰۰±۲/۲۱^{a}	۷۴/۰۰±۱/۳۲^{a}	۷۷/۰۰±۱/۲۹^{a}	۶/۵۰±۰/۶۴^{a}	۶/۸۷±۰/۰۲^{b}

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است (P<۰/۰۵).



شکل ۱. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز دو درصد



شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های PLP (نمودار الف)، SRY (نمودار ب) و PAR (نمودار ج)

جدول ۴. اثر رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ و آندرومد بر بیان ژن SRY و PLP (خطای استاندارد ± میانگین)

	SRY	PLP
شاهد[1]	۱[b]	۱[b]
Swim up[2]	۱/۳۷±۰/۱۳[a]	۰/۷۵±۰/۱۱[c]
تریس- زرده تخم‌مرغ	۰/۹۱±۰/۱۶[b]	۰/۹۴±۰/۱۲[b]
آندرومد	۰/۶۴±۰/۱۱[c]	۱/۴۳±۰/۱۶[a]

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

۱. Arbitrray unit (AU) به‌طور اختیاری عدد ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته می‌شود [۱۴].

۲. به‌منظور شست‌وشوی منی و حذف سلول‌های مرده انجام شد.

با توجه به نتایج گزارش شده در جدول ۵، انجماد منی با استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ منجر به افزایش معنی‌دار در ژن SRY (P= ۰/۰۰۱) و کاهش معنی‌دار ژن PLP شده است (P<۰/۰۰۰۱)، برخلاف نتایج حاصل از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ، استفاده از رقیق‌کننده آندرومد، موجب کاهش معنی‌دار ژن SRY (P= ۰/۰۰۶) و افزایش معنی‌دار ژن PLP (P= ۰/۰۰۲) بعد از فرآیند انجماد- یخ‌گشایی گردید.

جدول ۵. اثر افزودن رقیق‌کننده آندرومد و تریس- زرده تخم‌مرغ بر بیان ژن SRY و PLP بعد از فرایند انجماد- یخ‌گشایی (خطای استاندارد ± میانگین)

	SRY	PLP
شاهد[1]	۱[b]	۱[b]
تریس- زرده تخم‌مرغ	۱/۱۹±۰/۰۵[a]	۰/۳۰±۰/۰۶[c]
آندرومد	۰/۶۱±۰/۱۲[c]	۱/۷۳±۰/۱۹[a]

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌داری است (P<۰/۰۵).

۱. Arbitrray unit (AU) به‌طور اختیاری عدد ۱ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته می‌شود [۱۴].

نتایج مندرج در جدول ۴ نشان داد که تکنیک Swim up منجر به افزایش درصد اسپرم حامل کروموزم Y و کاهش درصد اسپرم حامل کروموزم X می‌شود که دلیل آن را می‌توان این‌گونه بیان کرد که اسپرم حامل کروموزم Y بدلیل اندازه کوچک‌تر آنها، شنای سریع‌تری دارند و حرکت آنها به سمت بالای لوله سریع‌تر است، درحالی‌که اسپرم حامل کروموزم X تمایل دارند در قسمت پایین لوله قرار گیرند، اسپرم حامل کروموزم X حاوی DNA بیش‌تری نسبت به اسپرم حامل کروموزم Y است که منجر به مهاجرت کندتر می‌شود و سرعت اسپرم حامل کروموزم Y بیش‌تر از اسپرم حامل کروموزم X است [۴].

با توجه به نتایج ارائه‌شده در جدول ۴، در بین دو رقیق‌کننده استفاده شده در حالت مایع، فقط رقیق‌کننده آندرومد منجر به تغییر نسبت جنسیت شد. رقیق‌کننده آندرومد دارای ویژگی‌های خاص نسبت به زرده تخم‌مرغ است که عبارت است از عاری‌بودن از مواد حیوانی که می‌تواند منبع آلودگی باشد و عاری‌بودن از هرگونه هورمون، باکتری و داروهای مختلف است، هم‌چنین تفاوت ترکیبات آن با رقیق‌کننده‌های دیگر و اثر محافظتی بالای آن نسبت به دیگر رقیق‌کننده‌ها می‌تواند دلیل تفاوت مشاهده شده در نتایج به‌دست آمده باشد. برخی از محققین طی آزمایش روی اسپرم انسان گزارش دادند، که اسپرم‌های حامل کروموزوم X دارای دانسیته بیش‌تری در ناحیه سر نسبت به اسپرم‌های حامل کروموزوم Y هستند، بنابراین این اسپرم‌ها در لایه تحتانی بعد از سانتریفیوژ قرار گرفته، در صورتی‌که اسپرم‌های حامل کروموزوم Y به‌دلیل مقدار DNA کم‌تر، بیش‌تر در لایه رویی قرار می‌گیرند [۲۱].

انجماد اسپرم می‌تواند بر مکان و توزیع پروتامین‌ها اثرگذار باشد، اگرچه این اثرات پس از پایان انجماد از بین می‌روند اما تعامل پل‌های دی سولفیدی سیستئین با پروتامین‌ها به منزله اسکلت استخوانی کروماتین پس از فرایند یخ‌گشایی نیز مختل می‌شود [۲۵]. میزان آسیب واردشده به اسپرم، به توانایی خود اسپرم نیز بستگی دارد، با

توجه به آن‌که قطعه‌قطعه‌شدن DNA یک نگرانی محسوب می‌شود، تأثیر آن بر عملکرد تولیدمثلی اسپرم بارز می‌باشد، از جمله علل اصلی آسیب DNA اسپرم، می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو، کمبود پروتامین در طی بسته‌بندی کروماتین و نیز آپوپتوز اشاره نمود و این نقایص می‌تواند با میزان لقاح و باروری در افراد نابارور مرتبط باشد [۲۲]. مطالعات انجام‌شده در این زمینه، مکانیسم اثر انجماد بر هسته اسپرم به‌ویژه کروماتین را بررسی می‌کنند، کروماتین اسپرم از DNA و نوکلئوپروتئین‌ها، عمدتاً پروتامین (P1 و P2) و درصد کمی هیستامین تشکیل شده است [۲۳]. نوع پروتامین‌ها و هم‌چنین نسبت P1 به P2 بین گونه‌های مختلف یکسان نیستند که می‌تواند بر میزان مقاومت هسته نسبت به فرایند انجماد و یخ‌گشایی اثرگذار باشد، تاکنون مکانسیم‌هایی که علت افزایش قطعه‌قطعه‌شدن DNA را پس از انجماد توضیح دهد، مشخص نشده اما به‌نظر می‌رسد که در ارتباط با افزایش آسیب اکسیداتیو DNA باشد. انجماد اسپرم باعث تغییر در ساختار کروماتین، اختلال در ژن‌های مهم دخیل در لقاح و رشدونمو جنین و هم‌چنین آسیب غلاف اطراف هسته اسپرم و تغییر در ثبات پروتئین اکتین‌ها و در نهایت اختلال در بین غلاف و اسکلت اکتینی می‌شود [۲۵].

گزارش شده است که فرآیند انجماد موجب تغییر نسبت جنسیت اسپرم به صورت حداقل ۳۰ درصد کاهش در ژن SRY و حداکثر ۶۹ درصد افزایش در ژن ZFX (ژن ماده‌زایی) می‌شود. این تنوع و اختلاف در نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y ممکن است به‌دلیل استفاده از رقیق‌کننده‌ها و یا تحت تأثیر عملیات مختلف روی مایع منی در طی فرایند انجماد، ایجاد شود، انجماد منجر به کاهش اسپرم حامل کروموزوم Y می‌شود که بیان‌کننده حساسیت بالای اسپرم حامل کروموزوم Y نسبت به فرایند انجماد است [۱۱] که با نتایج پژوهش ما در تیمار منجمدشده با آندرومد مطابقت داشته اما با نتایج نمونه‌های منجمدشده با زرده تخم‌مرغ مطابقت ندارد. طبق پژوهش حاضر استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف طی فرایند انجماد اثرات متفاوتی روی نسبت جنسیت دارد. دلایل تفاوت نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y، بین منی تازه و منجمد شناخته‌شده نیست، اگر اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y دارای حساسیت متفاوت نسبت به انجماد باشند، می‌تواند تفاوت مشاهده‌شده در نسبت جنسیت را توضیح دهد [۲۴].

در پژوهش حاضر این نتیجه به‌دست آمد که علاوه بر فرایند انجماد، نوع رقیق‌کننده مورد استفاده جهت انجماد بر نسبت اسپرماتوزوئیدهای حامل کروموزوم X و Y مؤثر بوده است. رقیق کردن منی موجب کاهش غلظت‌های ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی اسپرم شده، در نتیجه اسپرم‌ها آسیب‌پذیر می‌شوند، وقتی اسپرماتوزوآ طی محافظت سرمایی در معرض آسیب قرار می‌گیرند، شرایط برای تولید (رادیکال‌های آزاد اکسیژن) ROS افزایش می‌یابد و از طرف دیگر کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در منی رقیق‌شده اسپرم‌ها را آسیب‌پذیرتر می‌نماید [۱۳]. به‌دلیل تفاوت در ترکیبات رقیق‌کننده‌های استفاده‌شده و تفاوت در تحمل اسپرم‌های حامل کروموزوم X و Y در محیط اسپرم، مرگ‌ومیر در محیط‌های مختلف، متفاوت بوده که نتیجه آن تغییرات متفاوت در نسبت جنسیت منی است. احتمال داده می‌شود که در نتایج مربوط به رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ به‌دلیل اثر محافظتی کم آن نسبت به رقیق‌کننده آندرومد، افزایش خطر آلودگی میکروبی و عدم استفاده از آنتی‌اکسیدان در این رقیق‌کننده، درصد بیش‌تری از اسپرم‌های حامل کروموزوم X نسبت به اسپرم حامل کروموزوم Y طی فرایند انجماد از بین رفته که منجر به کاهش معنی‌دار نسبت ژن PLP و افزایش معنی‌دار نسبت ژن SRY شده باشد. با توجه به نتایج ارائه

شده در جدول ۳، استفاده از رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ منجر به افزایش pH منی شده است، با افزایش pH درصد زنده‌مانی اسپرم حامل کروموزوم X کاهش می‌یابد که منجر به کاهش نسبت ژن PLP شده است.

نتایج مربوط به رقیق‌کننده آندرومد در جدول ۳، نشان داد که درصدی از اسپرم‌های حامل کروموزوم Y در طی فرایند انجماد از بین رفته است، چرا که اسپرم حامل کروموزوم Y نسبت به اسپرم حامل کروموزوم X در محیط اسیدی آسیب‌پذیرتر است [۱۷]. استفاده از رقیق‌کننده آندرومد طی فرایند انجماد منجر به کاهش pH و به‌دنبال آن افزایش مرگ و میر اسپرم‌های حامل کروموزوم Y شد. احتمالاً دلیل دیگر کاهش نسبت اسپرم‌های حامل کروموزوم Y حساسیت بالای آن‌ها نسبت به فرایند انجماد باشد. اسپرم به‌علت تغییراتی که طی فرایند انجماد و یخ‌گشایی متحمل می‌شود، مستعد آسیب‌های اسمزی، مکانیکی و اکسیداتیو است. راهکاری که امروزه پیشنهاد شده است، افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده منی می‌باشد تا از این آسیب‌ها جلوگیری نماید [۱۶]. با توجه به این‌که اثر اصلی زرده تخم‌مرغ در حفظ انجمادی سلول‌ها مربوط به بخش لیپوپروتئین‌های با چگالی کم مانند لسیتین می‌باشد، لذا استفاده از لسیتین سویا در ترکیب رقیق‌کننده تجاری آندرومد به‌عنوان ماده تجاری قابل دسترس در محیط رقیق‌کننده منی می‌تواند کیفیت محیط انجمادی را تا حد قابل‌قبولی افزایش دهد [۷].

با توجه به مطالب ارائه‌شده می‌توان گفت که احتمالاً آنتی‌اکسیدان موجود در رقیق‌کننده آندرومد منجر به کاهش اکسیداسیون و آپوپتوز اسپرماتوزوئیدهای حساس شده ولی در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ آنتی‌اکسیدان استفاده نشده، پس درصد مرگ‌ومیر در آن هم بالاتر بوده است. هم‌چنین با توجه به تفاوت فسفولیپید موجود در رقیق‌کننده آندرومد با فسفولیپید موجود در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ، اختلاف ایجادشده در نتایج نسبت جنسیت را می‌توان تا حدودی به اختلاف ترکیبات دو رقیق‌کننده نسبت داد.

به‌طورکلی، نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که رقیق‌کننده‌های مختلف اثرات متفاوتی روی نسبت جنسیت اسپرم در حالت مایع و پس از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی دارند و این‌که، استفاده از منی رقیق‌شده با رقیق‌کننده آندرومد و منی منجمدشده با تریس- زرده تخم‌مرغ بتواند به‌ترتیب سبب افزایش ماده‌زایی و نرزایی در گله گاوشیری گردد.

منابع

۱. خلقی م، حیدری ف، رستم‌زاده ج و رزم کبیر م (۱۳۹۳) بررسی نسبت جمعیت کروموزوم‌های جنسی X و Y در انزال گاوهای نر هلشتاین و نقش غلظت تستوسترون خون بر نسبت جمعیتی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱ (۲۹): ۷۹-۷۲.

۲. موسوی م، توحیدی ا، ژندی م، محمدی سنگ چشمه ع. و عموعابدینی ق (۱۳۹۵) اثر سطوح مختلف فشار اسمزی و گلیسرول در رقیق‌کننده بر پایه لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم گاو پس از انجماد. مجله تولیدات دامی. ۳ (۱۸): ۶۰۱-۵۹۳.

3. Ansari MS, Rakha BA. Akhter S and Ashiq M (2016) Optixcell improves the post thaw quality and fertility of buffalo bull sperm. Theriogenology 85(3): 528-532.Azizeddin A, Ashkar FA, King WA and Revay T (2014) Enrichment of Y-Chromosome-Bearing Bull Spermatozoa by Swim-up through a Column. Reproduction in domestic animals 49(1): 1-4.
4. Barbas JP and Mascarenhas RD (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and tissue banking 10(1): 49-62.
5. Delgado PA, Lester TD, and Rorie RW (2010) Variation in the Ratio of X-to Y-Chromosome Bearing Spermatozoa in Ejaculates of Semen Collected Weekly from Beef Bulls. Animal Science Arkansas Animal Science 28-30.

6. Forouzanfar, M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, and Nasr-Esfahani MH (2010) In vitro comparison of egg yolk–based and soybean lecithin–based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology 73(4): 480-487.
7. Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, and Okabe K (2008) Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. Journal of Reproduction and Development 54(4): 286-289.
8. Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, and Rodríguez-Martínez H (2003) Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology 59(5-6): 1241-1255.
9. Hansen PJ (2013) Alternative Sperm Purification Proce. University of Florida. Animal Science.
10. Hassan BJ, Hossain SO, and Jebur MSh (2016) Evaluation of semen sex ratio in cooled and frozen semen straws by real -time PCR. Journal of Veterinary Research 15(3): 225-235.
11. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, and Li WY (2008) Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. Cryobiology 57(3): 257-262.
12. Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, and Rehman H (2009) Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 71(8): 1326-1329.
13. Larionov A, Krause A, and Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC bioinformatics 6(1): 62.
14. Miller SA, Dykes DD, and Polesky, HFRN (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research 16(3): 12-15.
15. Najafi A, Asadi E, Moawad AR, Mikaeili S, Amidi F, Adutwum E, and Sobhani AG (2016) Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. Fertility and sterility 106(7): 1658-1665.
16. Papa F, Henrion R, and Breart G (1983) Preconceptional selection of sex using the ionic method. Dietary regime. Results of a 2 years' prospective clinical study. Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction 12(4): 415-422.
17. Parati K, Bongioni G, Aleandri R, and Galli A (2006) Sex ratio determination in bovine semen: A new approach by quantitative real time PCR. Theriogenology 66(9): 2202-2209.
18. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, and Agarwal A (2015) Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. System Biology Reproduction Medicen 61(1): 1-12.
19. Skoff RP, Bessert D A, Cerghet M, Franklin MJ, Rout UK, Nave KA, and Armant DR (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. Cell death and differentiation 11(12): 1247.
20. Sumner AT, Robinson JA and Evans HJ (1971) Distinguishing between XY and YY-bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content. Nature new biology 229: 231-233.
21. Tavalaee M, Abbasi H, Deemeh MR, Fotohi F, Gilani, MAS and Esfahani M HN (2012) Semen parameters and chromatin packaging in microsurgical varicocelectomy patients. International journal of fertility & sterility 6(3): 165.
22. Ward WS (2009) Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. MHR: Basic science of reproductive medicine 16(1): 30-36.
23. Xu ZZ, Johnson DL, and Burton LJ (2000) Factors affecting the sex ratio in dairy cattle in New Zealand. Proceedings-new zealand society of animal production. New Zealand Society of Animal Production 60: 301-302.
24. Yeste M (2016) Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. Theriogenology 85(1): 47-64.