علوم دامی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۵ (ص ۳۳۵-۳۲۹)
DOI: 10.22059/ijas.2016.59788

ارزیابی رقیق‌کننده‌های مختلف دست‌ساز منی برای بهبود کیفیت اسپرم زنبورعسل پس از انجماد

فاطمه دادخواه[۱]، غلامعلی نهضتی پاقلعه[۲*]، مهدی ژندی[۲] و مجتبی امامووردی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران و دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۶- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، گردآوری، انجماد اسپرم زنبورعسل *Apis mellifera* و ارزیابی چندین رقیق‌کننده برای بهبود کیفیت اسپرم پس از انجماد- ذوب برای نخستین بار در ایران بود. گردآوری اسپرم از زنبورهای نر بالغ انجام شد. از سه رقیق‌کنندۀ مختلف که رقیق‌کنندۀ اول شامل بافر و زردۀ تخم‌مرغ (TEY)، رقیق‌کنندۀ دوم بافر و ۰/۵ درصد لستین سویا (TSL0.5) و رقیق‌کنندۀ سوم بافر و ۲ درصد لستین سویا (TSL2)، استفاده شد. نمونه‌ها رقیق و به‌تدریج تا دمای ۵ درجۀ سلسیوس سرد و بی‌درنگ درون پایوت کشیده و منجمد شد. داده‌ها با استفاده از رویۀ GENMOD نرم‌افزار SAS تجزیه و نتایج به‌صورت میانگین حداقل مربعات بیان شد. نتایج نشان داد که میانگین جنبایی اسپرم تازه در رقیق‌کننده‌های TEY (۴/۷۵±۰/۱۴) و TSL2 (۴/۵±۰/۲) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بالاتر از TSL0.5 (۴/۱۲±۰/۱۲) بود. میانگین جنبایی اسپرم پس از سردسازی نیز در TEY (۴/۵±۰/۲) و TSL2 (۴/۶۲±۰/۱۲) به‌طور معنی‌داری بالاتر از TSL0.5 (۳/۸۷±۰/۲۴) بود. همچنین میانگین جنبایی اسپرم پس از انجماد- ذوب در TEY (۳/۶±۰/۲۴) به‌طور معنی‌داری بالاتر از دو رقیق‌کننده بر پایۀ لستین سویا بود. بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد ذخیره‌سازی و انجماد اسپرم زنبورعسل در رقیق‌کنندۀ زردۀ تخم‌مرغ و سطح ۲ درصد لستین سویا برای استفادۀ تلقیح مصنوعی ملکۀ زنبورعسل برای تسریع برنامه‌های اصلاح نژادی، مناسب خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، انجماد، رقیق‌کننده، زنبورعسل، لستین سویا.

Evaluation of different hand-made semen extenders for improving sperm quality of honey bee after freezing

Fatemeh Dadkhah[1*], Gholamali Nehzati Paqhaleh[2], Mahdi Zhandi[2] and Mojtaba Emamverdi[3]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Assistant Professors and Ph.D. Candidate, Department of Animal Science , University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 26, 2016 - Accepted: May. 22, 2016)

ABSTRACT

The aim of this research was the collection and freezing of honey bee sperm, *Apis mellifera*, as a trail and evaluating different semen extenders to improve sperm quality after freeze-thawing process as a first trail in Iran. Semen was collected using artificial insemination device. In this experiment three different extenders including; egg yolk (TEY), buffer and 0.5% soybean lecithin (TSL0.5) and buffer and 2% soybean lecithin (TSL2), were used. Collected semen samples were evaluated using microscope and then were diluted with extenders. Diluted samples were gradually cooled in a refrigerator to 5°C and immediately loaded into straws and then frozen in liquid nitrogen. Data were analyzed using the GENMOD procedure of SAS software and results were expressed as least square means. The results demonstrated higher (P<0.05) fresh sperm motility in extenders containing egg yolk (4.75±0.14) and 2% soybean lecithin (4.5±0.2) in comparison to 0.5% soybean-lecithin based extender (4.12±0.12). Also, the average of cooled motile spermatozoa in TEY and TSL2 based extenders (4.5±0.2 and 4.62±0.12, respectively) was significantly higher than TSL0.5 based extender (3.87±0.24). Post-thawed sperm motility in TEY (3.6±0.24) was significantly (P<0.05) higher than soybean-lecithin based extenders. According to the results of this study, it seems that semen storage of honey bee using egg yolk and 2% soybean-lecithin based extenders would be an appropriate extender for artificial insemination in order to accelerate breeding programs.

Keywords: extender, freezing, honey bee, soybean lecithin, sperm.

* Corresponding author E-mail: nehzati@ut.ac.ir Tel: +98 26 32248082

مقدمه

یکی از راهکارهای اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی و کنترل تلاقی‌ها در زنبورعسل، ذخیره‌سازی و انجماد اسپرم و تلقیح مصنوعی است (Collins, 2000). اصلاح نژاد حیوان‌های اهلی مانند گاو، گوسفند، اسب، مرغ، خوک و سگ از سالیان دور توسط انسان انجام شده است، ولی در زنبورعسل این امر به دلیل نداشتن شناخت دقیق از تولیدمثل و رفتارهای تولیدمثلی آن تا اواسط سدهٔ نوزدهم میسر نبوده است. در حیوان‌های اهلی یادشده، کنترل تلاقی‌ها عملی است و این عمل با ایجاد قفس‌ها و فضاهای محدود و کنار هم قرار دادن نر و مادهٔ موردنظر صورت می‌گیرد، اما در زنبورعسل، ویژگی‌های رفتاری زنبورهای ملکه و نرها در هنگام جفت‌گیری که در آسمان و در حال پرواز انجام می‌شود، امکان کنترل تلاقی را بسیار دشوارتر از موجودهای دیگر ساخته است (Kaftanoglu & Peng, 1984). بنابراین برای حل این دشواری، پژوهشگران به فکر راه‌های دیگری مانند ذخیره‌سازی و تلقیح مصنوعی افتاده‌اند. در برنامه‌های اصلاح نژادی که از روش تلقیح مصنوعی و از اسپرم استفاده می‌شود، به زمان‌بندی و برنامه‌ریزی برای ظهور ملکه و نرها نیاز نخواهد بود. با انجام این کار، محدودیت‌های مربوط به صادرات و واردات زنبورعسل و احتمال انتقال بیماری‌ها و آفات مهم از بین خواهد رفت و امکان حفظ نژادهای مطلوب و صفات مطلوب، با روش خیلی ساده‌تری میسر می‌شود و این روش می‌تواند مسیر بسیاری از پیشرفت‌ها را در اصلاح نژاد زنبورعسل هموار سازد (Cobey, 2007). ذخیره‌سازی موفقیت‌آمیز و نگهداری درازمدت اسپرم، امکان حفظ نژادها، توده‌های ژنی و ژن‌های با ارزش و مطلوب را برای تولیدمثل و اصلاح نژاد فراهم می‌کند (Cobey *et al*., 2013). بنابراین اهمیت و ضرورت نگهداری و انجماد اسپرم زنبورعسل شامل سرعت بخشیدن در برنامه‌های اصلاح نژادی و حفظ مواد ژنتیکی با ارزش، بالا رفتن تنوع درون کلنی که سبب افزایش مقاومت به بیماری از راه کاهش هم‌خونی، بارور کردن کنترل‌شدهٔ همزمان شمار زیادی ملکه و تولیدمثل در فصل‌هایی از سال که نرها یافت نمی‌شوند، است (Trapy, 2003).

حفظ باروری اسپرم برای مدت طولانی، نیازمند رقیق‌کننده‌هایی است که محیط مناسبی را از نظر فیزیولوژیکی و متابولیکی برای بقای اسپرم فراهم کنند. همچنین رقیق‌کننده باید بتواند اسپرم را از تکانهٔ (شوک) سرمایی، انجماد و دیگر آسیب‌ها محافظت و رشد باکتری‌ها را مهار کند. رقیق‌کننده‌های متشکل از مواد مختلف (قند، الکترولیت‌ها، بافر، زردهٔ تخم‌مرغ و لستین سویا) برای نگهداری اسپرم در حیوان‌های گوناگون پیشنهاد شده‌اند (Holt, 2000; Hopkins & Herr, 2010; Emamverdi *et al*., 2013). این مواد در فراهم کردن انرژی موردنیاز، حفاظت اسپرم از آسیب‌های دمایی، کاهش تنش‌های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و انجماد- ذوب اسپرم‌ها و درنهایت ایجاد یک محیط مناسب برای حفظ کیفیت اسپرم نقش دارند (Pegg, 2007). بنابراین استفاده از رقیق‌کنندهٔ مناسب منی زنبورعسل که بتواند از اسپرم‌ها در برابر آسیب‌ها محافظت کند و بقا و تحرک اسپرم را حفظ کند، گام مهمی برای استفاده از اسپرم در تلقیح مصنوعی زنبورعسل و اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی آن را فراهم خواهد کرد. ازاین‌رو هدف این پژوهش، انجماد اسپرم زنبورعسل برای نخستین بار در کشور و بررسی سطوح مختلف لستین سویا (۰/۵ و ۲ درصد) و زردهٔ تخم‌مرغ در رقیق‌کنندهٔ منی، بر فراسنجه‌های کیفیت اسپرم زنبورعسل در فرآیند گردآوری، سردسازی و پس از انجماد- ذوب بود.

مواد و روش‌ها

یکی از سخت‌ترین و مهم‌ترین مراحل انجام این پژوهش، گردآوری اسپرم از زنبورهای عسل نر بود که پس از گذراندن دورهٔ آموزشی در همدان این موفقیت به دست آمد. انجام آزمایش‌های اصلی از اردیبهشت تا آخر تیرماه به طول انجامید. محل استقرار کندوهای زنبورعسل برای پرورش نرهای بالغ و گردآوری اسپرم در ایستگاه پژوهشی علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بود. اسپرم‌گیری از زنبورهای نر بالغ انجام و به ریزلوله (میکروتیوب)های ۰/۲ سی‌سی منتقل و سپس به آزمایشگاه فیزیولوژی دام

گروه علوم دامی برای انجام ارزیابی‌های میکروسکوپی انتقال داده شد. برای گردآوری اسپرم، از حدود ۵۰۰ زنبور نر بالغ گردآوری‌شده از ۲۰-۱۵ کندو استفاده شد. گردآوری اسپرم با استفاده از دستگاه تلقیح مصنوعی و سرنگ ویژه انجام شد (شکل ۱).

شکل ۱. دستگاه گردآوری و تلقیح مصنوعی منی زنبورعسل و اجزای آن.
Figure 1. The collection and artificial insemination device of honey bee semen and its components.

در این پژوهش برای ساخت رقیق‌کننده‌های دارای نگه‌دارنده‌هایی با منشأ حیوانی و گیاهی از یک محیط بر پایهٔ بافر تریس استفاده شد. برای ساخت رقیق‌کننده‌ها، افزون بر یک محیط پایه به‌طورمعمول از دو مادهٔ نگه‌دارندهٔ برون‌یاخته‌ای و دو مادهٔ محافظ درون‌یاخته‌ای استفاده شد. ماده‌های نگه‌دارندهٔ برون-یاخته‌ای مورداستفاده، زردهٔ تخم‌مرغ و لستین سویا بود. لستین که نام شیمیایی آن فسفاتیدیل کولین است، حساسیت بسیار بالایی به گرما، رطوبت و نور دارد. به همین دلیل بی‌درنگ پس از تهیهٔ آن، در یخچال ۲۰- درجهٔ سلسیوس و شرایط تاریکی قرار داده شد. غلظت‌های مورداستفاده و ارزیابی‌شدهٔ لستین در این آزمایش، ۰/۵ و ۲ درصد وزنی- حجمی بود. از سوی دیگر اندازهٔ معمول مورداستفادهٔ زردهٔ تخم‌مرغ در رقیق‌کننده‌ها ۲۰-۱۵ درصد است که در اینجا ۲۰ درصد استفاده شد. زردهٔ مورداستفاده از تخم‌مرغ تازه تهیه شد. همچنین در هر دو محیط به‌طور مشترک از گلیسرول و دی متیل سولفوکساید به‌عنوان مادهٔ محافظ درون‌یاخته‌ای استفاده شد (جدول ۱). بنابراین در این پژوهش از سه رقیق‌کنندهٔ مختلف که رقیق‌کنندهٔ اول شامل محیط پایه و زردهٔ تخم‌مرغ (TEY)، رقیق‌کنندهٔ دوم شامل محیط پایه و ۰/۵ درصد لستین سویا (TSL0.5) و رقیق‌کنندهٔ سوم شامل محیط پایه و ۲ درصد لستین سویا بود (TSL2)، استفاده شد.

جدول ۱. اجزا و میزان ترکیب‌های محیط بر پایهٔ تریس
Table 1. The component and amount of Tris-based medium composition

Material	Amount
1- Tris	1.91 g
2- Citric Acid	958 mg
3- Glucose	263 mg
4- Milli Q water	25 ml
5- Glycerol	11%
6- Streptomycin	32 mg
7- Dimethyl sulfoxide	10%

۱: تریس، ۲: سیتریک اسید، ۳: گلوکز، ۴: آب مقطر دیونیزه، ۵: گلیسرول، ۶: استرپتومایسین و ۷: دی متیل سولفوکساید.

نمونه‌های اسپرم گردآوری‌شده زیر میکروسکوپ نوری ارزیابی و آن‌گاه با رقیق‌کننده‌ها به نسبت ۱ به ۱۲ (اسپرم و رقیق‌کننده به ترتیب) مخلوط شد. نمونه‌های رقیق‌شده به‌تدریج تا ۵ درجهٔ سلسیوس برای مدت دو ساعت سرد شد و سپس به درون پایوت‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتر (IMV, France) که ۷ سانتی‌متر برش داده شده بودند، کشیده شد. پایوت‌ها بی‌درنگ در فاصلهٔ ۵ سانتی‌متری بخار نیتروژن مایع به مدت هشت دقیقه قرار داده شدند و پس‌ازآن به درون نیتروژن مایع غوطه‌ور و تا زمان ذوب ذخیره شد. پس از ذخیره‌سازی، پایوت‌ها در بن‌ماری (۳۷ درجه به مدت ده ثانیه) ذوب شدند. ارزیابی چشمی جنبایی اسپرم در بیشتر ارزیابی‌های آزمایشگاهی معمول، با میکروسکوپ نوری انجام می‌شود. جنبایی اسپرم پس از رقیق‌سازی یا تازه، سردسازی و انجماد-ذوب ارزیابی شد. برای این منظور با استفاده از نمونه‌بردار میزان ۵ میکرولیتر از نمونه را روی لام گذاشته و سپس یک لامل تمیز به آهستگی روی نمونه قرار داده شد، به‌طوری‌که نمونه به‌طور یکنواخت در زیر لامل پخش شد. لام را زیر میکروسکوپ نوری قرار داده و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰، سه میدان دید به‌صورت تصادفی انتخاب و در هر میدان شمار اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک بررسی شد. جنبایی اسپرم زنبورعسل به دلیل حرکت چرخشی روبه‌جلوی

آن به‌صورت رتبه از ۰ تا ۵ گزارش شد که به ترتیب بیانگر ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و بیشتر از ۹۰ درصد جنبایی است (Taylor *et al.*, 2009). این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار و پنج تکرار انجام شد. داده‌های جنبایی با استفاده از رویهٔ GENMOD نرم‌افزار SAS تجزیه و نتایج به‌صورت میانگین حداقل مربعات بیان شد. مدل آماری استفاده‌شده به‌صورت زیر بود:

$$Y_{ij}=\mu+T_i+e_{ij}$$

Y_{ij}: مشاهده‌ها

μ: میانگین

T_i: اثر تیمار i ام (i=1, 2, 3)

e_{ij}: تأثیر باقی‌مانده

نتایج و بحث

در این پژوهش پس از گردآوری اسپرم و رقیق‌سازی با رقیق‌کننده‌ها، جنبایی نمونه‌ها ارزیابی و نتایج نشان داد که میانگین جنبایی اسپرم تازه در رقیق‌کننده‌های دارای زردهٔ تخم‌مرغ و ۲ درصد لسیتین سویا (به ترتیب ۴/۷۵±۰/۱۴ و۴/۵±۰/۲) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بالاتر از رقیق‌کننده ۰/۵ درصد لستین سویا (۴/۱۲±۰/۱۲) بود. نتایج این ارزیابی در شکل ۲ ارائه شده است.

همچنین نتایج ارزیابی جنبایی اسپرم پس از سردسازی که در جدول ۲ گزارش شده است، نشان داد که میانگین جنبایی اسپرم پس از سردسازی در رقیق‌کننده‌های دارای زردهٔ تخم‌مرغ و ۲ درصد لسیتین سویا (به ترتیب ۴/۵±۰/۲ و۴/۶۲±۰/۱۲) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بالاتر از رقیق‌کننده ۰/۵ درصد لستین سویا (۳/۸۷±۰/۲۴) بود.

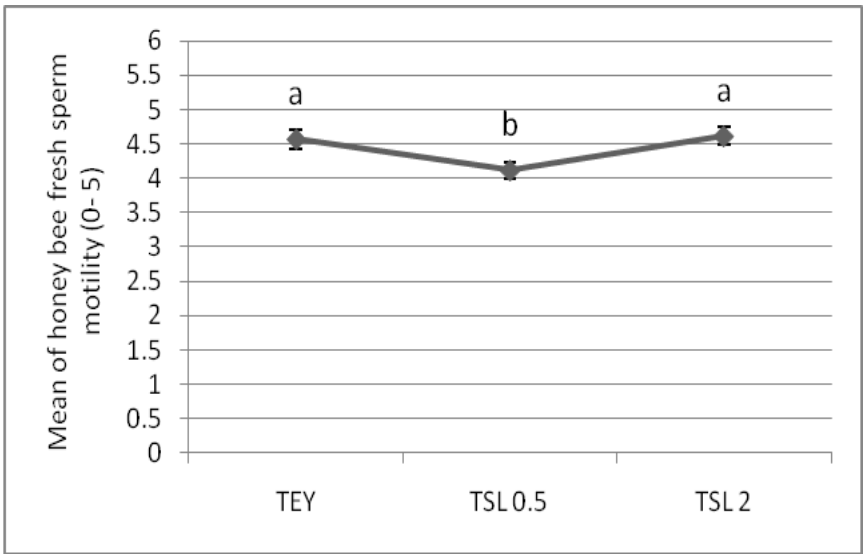
جدول ۲. میانگین حداقل مربعات جنبایی اسپرم زنبورعسل در رقیق‌کننده‌های مختلف منی پس از سردسازی

Table 2. Least square mean honey bee sperm motility in different semen extender after cooling (Lsmean ± SEM)

Parameter	Semen Extenders		
	TEY	TSL0.5	TSL2
Motility	4.5 [a]	3.87 [b]	4.62 [a]
SEM	0.2	0.24	0.12

TEY (رقیق‌کنندهٔ دارای زردهٔ تخم‌مرغ)، TSL0.5 (رقیق‌کنندهٔ دارای ۰/۵ درصد لستین سویا) و TSL2 (رقیق‌کنندهٔ دارای ۲ درصد لستین سویا) .حروف ناهمسان [a,b] بین رقیق‌کننده‌ها در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

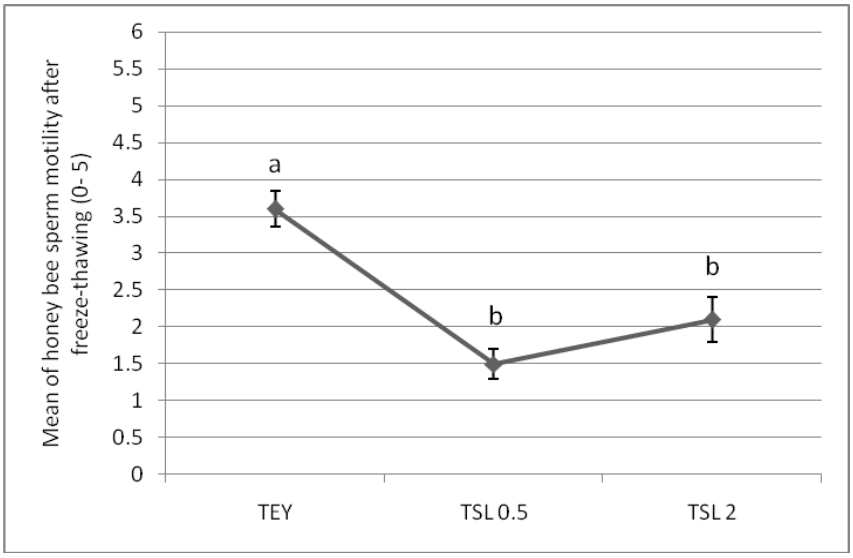
TEY (egg yolk- based extender), TSL0.5 (0.5% soybean lecithin-based extender) and TSL2 (2% soybean lecithin-based extender). [a ,b] Different superscripts within rows are significantly differences (p<0.05).



شکل ۲. میانگین حداقل مربعات جنبایی اسپرم تازهٔ زنبورعسل در رقیق‌کننده‌های دارای زردهٔ تخم‌مرغ (TEY)، ۰/۵ درصد لستین سویا (TSL0.5) و ۲ درصد لستین سویا (TSL2). حروف ناهمسان [a,b] بین رقیق‌کننده‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Figure 2. Least square mean honey bee fresh sperm motility in extenders containing egg yolk (TEY), 0.5% soybean lecithin (TSL0.5) and 2% soybean lecithin (TSL2). [a ,b] Different superscripts in extenders indicated significantly differences (p<0.05).

همچنین در این پژوهش جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- ذوب ارزیابی شد. نتایج این ارزیابی نشان داد که میانگین جنبایی اسپرم در رقیق‌کنندهٔ دارای زردهٔ تخم‌مرغ (۳/۶±۰/۲۴) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بالاتر از دو رقیق‌کنندهٔ ۰/۵ درصد لستین سویا (۱/۵±۰/۲) و ۲ درصد لستین سویا (۲/۱±۰/۳۱) بود. نتایج این تجزیه‌وتحلیل در شکل ۳ ارایه شده است.



شکل ۳. میانگین حداقل مربعات جنبایی اسپرم زنبورعسل پس از انجماد در رقیق‌کننده‌های دارای زردهٔ تخم‌مرغ (TEY)، ۰/۵ درصد لستین سویا (TSL0.5) و ۲ درصد لستین سویا (TSL2). حروف ناهمسان [a,b] بین رقیق‌کننده‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

Figure 3. Least square mean of honey bee sperm motility after freezing in extenders containing egg yolk (TEY), 0.5% soybean lecithin (TSL0.5) and 2% soybean lecithin (TSL2). [a,b] Different superscripts in extenders indicated significantly differences (p<0.05).

در طول سال‌های اخیر پژوهش‌های انگشت‌شماری روی اسپرم زنبورعسل صورت گرفته است. چالش‌های اصلی پژوهش و ذخیره‌سازی اسپرم زنبورعسل نسبت به دیگر حیوان‌های شامل تولید کم منی و سختی گردآوری آن، یافتن رقیق‌کنندهٔ مناسب و نسبت مطلوب رقیق‌سازی و روش بهینهٔ ذخیره‌سازی بود. کیفیت اسپرم پس از ذخیره‌سازی و سردسازی تحت تأثیر عامل‌های چندی مانند کیفیت منی گردآوری‌شده، زنبورهای نر، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط نگهداری منی است (Hopkins *et al*., 2012). کاهش کیفیت اسپرم زنبورعسل پس از سردسازی و انجماد مانند زنده‌مانی، جنبایی و پایین آمدن کیفیت و باروری اسپرم زنبورعسل، علت نداشتن موفقیت در حفظ انجماد منی زنبورعسل و تلقیح مصنوعی آن است (Collins, 2000). بنابراین یکی از راهکارهای اصلی که محققان بسیاری برای رفع این چالش‌ها در سال‌های اخیر انجام داده‌اند، استفاده از رقیق‌کننده‌های مناسب و یافتن روش مطلوب برای حفظ کیفیت اسپرم زنبورعسل بوده است (Taylor *et al*., 2009; Hopkins & Herr, 2010). نتایج این پژوهش نشان داد که رقیق‌کنندهٔ دارای زردهٔ تخم‌مرغ نسبت به رقیق‌کننده بر پایهٔ لستین سویا سبب حفظ بهتر جنبایی اسپرم زنبورعسل پس از انجماد- ذوب شد، اما جنبایی اسپرم تازه و پس از سردسازی در رقیق‌کننده‌های بر پایهٔ زردهٔ تخم‌مرغ و ۲ درصد لسیتین عملکرد بهتری نشان دادند. ممکن است این نتایج به دلیل سازوکار حفاظتی لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زردهٔ تخم‌مرغ روی غشای اسپرم زنبورعسل بوده و یا نیاز به درصد مناسب لستین سویا در رقیق‌کننده باشد. پژوهشی درزمینهٔ تأثیر زردهٔ تخم‌مرغ و لستین سویا در رقیق‌کننده روی کیفیت اسپرم زنبورعسل گزارش نشده است. گزارش شده است که رقیق‌کنندهٔ دارای اسیدهای آمینه منجر به بهبود کیفیت اسپرم زنبورعسل پس از انجماد شده

است (Taylor *et al*., 2009). لازم به یادآوری است که این نخستین پژوهش است که از لستین سویا به‌عنوان یک محافظت‌کنندهٔ بیرون یاخته‌ای به همراه ترکیبی از گلیسرول و دی‌متیل‌سولفوکساید به‌عنوان محافظت‌کننده‌های درون‌یاخته‌ای برای بهبود کیفیت اسپرم زنبورعسل استفاده شده است که نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. به‌طورکلی در بیشتر بررسی‌هایی که روی اسپرم موجودهای دیگر شده است، پیشنهاد شده است که لستین (فسفاتیدیل کولین) موجود در سویا و زردهٔ تخم‌مرغ، فسفولیپیدهای غشای اسپرم را با قرارگیری روی سطح غشاها محافظت کرده و تحمل و مقاومت اسپرم به آسیب‌های فرآیند سردسازی و انجماد- ذوب را افزایش می‌دهند (Watson *et al*., 1981). به نظر می‌رسد که منابع فسفولیپیدی با تشکیل لایهٔ محافظتی در اطراف غشای اسپرم، موجب محافظت اسپرم در برابر آسیب‌های سرمایی و انجمادی می‌شوند. کویین و همکاران پیشنهاد دادند که فسفولیپیدها می‌توانند یک لایهٔ محافظتی را در سطح غشای اسپرم پس از ژلاتینه شدن لیپوپروتئین‌ها به وجود بیاورند (Quinn *et al*., 1980). همچنین Graham *et al*. (1981) و Trimeche *et al*. (1977) گزارش دادند که فسفولیپیدهای موجود در لیپوپروتئین‌های با چگالی کم، می‌توانند میزانی از فسفولیپیدهای غشای اسپرم که در حین آسیب سرمایی و انجمادی از بین می‌روند جایگزین کنند و منجر به بهبود کیفیت اسپرم گردند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به‌نظر می‌رسد ذخیره‌سازی و انجماد منی زنبورعسل در رقیق‌کنندهٔ زرده تخم‌مرغ و سطح ۲ درصد لستین سویا برای استفادهٔ تلقیح مصنوعی ملکهٔ زنبورعسل برای تسریع برنامه‌های اصلاح نژادی، مناسب خواهد بود. البته پژوهش‌های بیشتری برای بهبود عملکرد این رقیق‌کننده و ارزیابی کیفیت باروری اسپرم با استفاده از تلقیح مصنوعی ملکه موردنیاز است.

سپاسگزاری

از مسئولان مربوطه در دانشگاه تهران، به خاطر پشتیبانی مالی و نیز مسئول در زمینهٔ تأمین امکانات و تجهیزات مورد نیاز آزمایشگاه فیزیولوژی دام گروه علوم دامی وهمچنین راهنمایی‌های آقای دکتر برندون هاپکینز (Dr. Brandon Hopkins) برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Cobey, S.W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4), 390-410.
2. Cobey, S.W., Tarpy, D.R. & Woyke, J. (2013). Apis mellifera queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-18.
3. Hopkins, B.K., Herr, C. & Sheppard, W.S. (2012). Sequential generations of honey bee (Apis mellifera) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1079-1083.
4. Kaftanoglu, O. & Peng, Y.S. (1984). Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 157-163.
5. Wegener, J. & Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3), 600-607.
6. Sheppard, W.S. & Meixner, M.D. (2003). Apis mellifera pomonella, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34, 367-376.
7. Tarpy, D.R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 270, 99-103.
8. Emamverdi, M., Zhandi, M., Shahneh, A.Z., Sharafi, M., Akhlaghi, A., Motlagh, M.K., Dadkhah, F. & Davachi, N.D. (2014). Flow cytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science*, 55(4), 551-558.
9. Holt, W.V. (2000). Basic aspect of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.
10. Watson, P. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of reproduction and fertility*, 62, 483-492.

11. Quinn, P., Chow, P. & White, I. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of reproduction and fertility*, 60, 403-407.
12. Graham, J. & Foote, R. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24, 42-52.
13. Pegg, D. (2007) Principles of cryopreservation. In 'Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols'.(Eds JG Day and GN Stacey), *Humana Press*, Totowa, NJ, 39-57.
14. Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*, 34, 385-393.
15. Taylor, M., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N. & Buhr, M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee *Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72, 149-159.
16. Hopkins, B.K. & Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (Apis mellifera) spermatozoa. *Apidologie*, 41, 548-556.