مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره پنجم، ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ آتابای در شرایط منجمد

*بهمن پریزادیان کاوان[۱]، یوسف جعفری‌آهنگری[۲] و سعید زره‌داران[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس بر خصوصیات اسپرم قوچ آتابای در شرایط منجمد بود. منی از شش راس قوچ آتابای با استفاده از مهبل مصنوعی جمع‌آوری گردید و سپس نمونه‌های مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه‌های منی تحت تأثیر تیمارهای مختلف در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس قرار گرفتند و خصوصیات اسپرم‌ها، شامل درصد اسپرم‌های متحرک و زنده به‌وسیله میکروسکوپ الکترونیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. عامل اول، سطوح مختلف ویتامین E (۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و عامل دوم، سطوح مختلف ویتامین C (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بودند. نتایج این آزمایش نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های شیر (۴۶/۴۵±۰/۰۸۵) و یا تریس (۴۸/۴۸±۰/۰۸۷) در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد. بنابراین براساس نتایج این آزمایش به‌منظور نگهداری اسپرم قوچ آتابای در شرایط منجمد استفاده از ویتامین E (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده‌های شیر و یا تریس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ویتامین‌های E و C، خصوصیات اسپرم، شرایط منجمد، قوچ آتابای

مقدمه

پرورش حیوانات اهلی در دنیا در چند دهه اخیر با سرعت چشمگیری پیشرفت نموده و دام‌های مختلف برحسب طبیعت زندگی خود به‌منظور تولید بیشتر، پرورش یافته‌اند. در این راستا، تلقیح مصنوعی ابزار موثری در پیشبرد و موفقیت صنعت دامپروری می‌باشد (بایلی و همکاران، ۲۰۰۰). با توسعه تلقیح مصنوعی هزینه‌های پرورش قوچ در گله حذف شده و می‌توان از اسپرم‌هایی

*- مسئول مکاتبه: bahman368@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

که از نظر ژنتیکی در سطح بالاتری قرار دارند جهت آبستن‌کردن میش‌های ماده و به‌حداکثر رساندن توسعه ژنتیکی استفاده کرد (سالامون و مکسول، ۲۰۰۰). از طرفی دام‌های بومی هر منطقه ذخایر ژنتیکی آن منطقه بوده که طی سالیان متمادی با محیط زندگی خود سازگاری یافته و ژن‌های لازم در آنها تثبیت شده‌است. در جهت حفظ این ذخایر ارزشمند لازم است که بخشی از تحقیقات کشور در زمینه حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد.

کاهش خواص حیاتی اسپرم مثل تحرک و زنده‌مانی در طی نگهداری در شرایط سرمایی می‌تواند یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی باشد (سالامون و مکسول، ۲۰۰۰). تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌های نگهداری شده در دماهای پایین به‌دلیل خسارات ساختاری و غیرساختاری غشاء در اثر نگهداری سرمایی و نقص‌های مورفولوژیک و غیرطبیعی بودن اکروزوم پایین‌تر می‌باشد (بایلی و همکاران، ۲۰۰۰). انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر[1] از عوامل موثر در ایجاد تغییرات نامطلوب در اسپرم در طی نگهداری در شرایط انجماد، می‌باشند. از عمده‌ترین اکسیژن‌های واکنش‌پذیر می‌توان به رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و سوپراکسید آنیون اشاره کرد (یاماموتو و اوماری، ۱۹۹۴).

مواد آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در خنثی‌سازی انواع رادیکال‌های آزاد[2] دارند ولی متاسفانه خصوصیات آنتی‌اکسیدانی رقیق‌کننده‌های متداول مورد استفاده اغلب ضعیف می‌باشد (بیلودیو و همکاران، ۲۰۰۱). از طرفی میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (اسریجیس و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین تحت این شرایط استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین‌های E و C می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم موثر باشد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده‌شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به‌طور طبیعی در مواد وجود داشته باشند و یا از طریق مصنوعی سنتز و به آنها اضافه گردند. مکانیزم اثر این ترکیبات به این صورت است که با دادن یک اتم هیدروژن به رادیکال آزاد تشکیل شده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند. مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان طبیعی شناخته شده ویتامین E می‌باشد (یوپرتی و همکاران، ۱۹۹۷). از طرفی ویتامین C نیز به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌است که می‌تواند در کاهش اثرات مخرب انواع رادیکال‌های آزاد بر سلول‌ها موثر باشد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). در زمینه استفاده از ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده‌های منی گزارشات متعددی وجود دارد. در همین راستا، آزمایش انجام شده توسط برینینجر و همکاران (۲۰۰۵) نشان‌دهنده افزایش تحرک اسپرم خوک منجمد شده با استفاده از ویتامین E پس از یخ‌گشایی بود. آزمایش انجام شده توسط اونجون و همکاران (۱۹۹۷) حاکی از افزایش تحرک اسپرم قوچ منجمد شده در نمونه‌های دارای ویتامین C پس از یخ‌گشایی بود. پنا و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که استفاده از ترلوکس (آنالوگی از ویتامین E) در رقیق‌کننده گلوکز، سیترات سدیم، پنی‌سیلین و استرپتومایسین منجر به افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از انجماد گردید. با توجه به موارد ذکر شده هدف از انجام این تحقیق بررسی توان تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس با استفاده از ویتامین های E و C در شرایط منجمد بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند شیرنگ وابسته به معاونت امور دام استان گلستان در طی پاییز و زمستان سال ۱۳۸۵ انجام شد. برای انجام این تحقیق از شش راس قوچ ۲ تا ۳ ساله نژاد آتابای موجود در ایستگاه تحقیقاتی دام استفاده شد. قوچ‌های این مرکز با

1- Reactive Oxygen Species
2- Free Radicals

Archive of SID

www.SID.ir

روش اسپرم‌گیری به‌وسیله مهبل مصنوعی سازگاری داده شدند و از این طریق نمونه‌های منی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های منی به‌دست آمده، در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس (جدول ۱)، به‌نسبت ۳ به ۱ (سه قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) رقیق‌سازی شده و سه سطح مختلف ویتامین E (۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و C (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به آنها اضافه شدند. نمونه‌ها منجمد شده و پس از ۱۰ روز یخ‌گشایی شدند و از لحاظ درصد تحرک و زنده‌مانی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوا، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق شده بر روی یک لام تمیز گرم شده قرار داده شد. سپس بر روی آن یک لامل گذاشته شد تا نمونه به‌طور یکنواخت در زیر سطح لامل پخش شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰ × میکروسکوپ و با بررسی چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند شمارش شدند. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین و نکروزین استفاده شد. برای ساخت این محلول ابتدا ۵ گرم نکروزین و ۰/۸۵ گرم ائوزین و ۱/۴۵ گرم سیترات سدیم آنیدرات را در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و محلول به‌دست آمده برای مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از رسیدن دمای محلول به دمای محیط، محلول دوبار از فیلتر عبور داده شد و در شیشه‌ای تیره ریخته شد و دور از نور خورشید در دمای اتاق نگهداری شد. برای رنگ‌آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده شد و سپس یک قطره از رنگ بر روی منی رقیق شده ریخته شد. بعد از مدت یک دقیقه توسط لبه لام دیگری گسترش نازکی از آن تهیه شد و سپس به‌مدت ۵ دقیقه لام در مجاورت هیتر قرار داده شد تا خشک شود. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰× میکروسکوپ در چند ناحیه از لام تعداد اسپرم‌های زنده شمارش شدند (سالامون و مکسول، ۲۰۰۰).

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۳×۳ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول، سطوح مختلف ویتامین E (۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و فاکتور دوم، سطوح مختلف ویتامین C (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بودند. داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق با استفاده از تست نرمالیته مورد بررسی قرار گرفتند و به‌دلیل نرمال بودن داده‌ها از تبدیل زاویه‌ای استفاده نشد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1[1] (۲۰۰۶) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن[2] استفاده شد (۱۹۹۵).

جدول ۱- ترکیب رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی قوچ در شرایط انجماد.

اجزای رقیق‌کننده	مقدار در ۱۰۰ میلی‌لیتر
تریس (گرم)	۳/۸۷۶
گلوکز (گرم)	۰/۵۲۳
اسید سیتریک (گرم)	۲/۱۲۳
زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر)	۱۶
گلیسرول (میلی‌لیتر)	۵/۳
پنی‌سیلین (واحد بین‌المللی)	۱۰۰۰۰۰
استرپتومایسین (واحد بین‌المللی)	۱۰۰
آب مقطر تا حجم (میلی‌لیتر)	۱۰۰

1- Statistical Analysis System
2- Duncan Test

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده تریس: نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C و همچنین اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس در سطوح ۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E، به‌ترتیب ۴۴/۲۷±۰/۰۶۶، ۴۸/۴۸±۰/۰۸۷ و ۴۵/۱۰±۰/۲۰ بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم متحرک پس از یخ‌گشایی در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و کمترین درصد اسپرم متحرک پس از یخ‌گشایی در سطح ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E حاصل می‌گردد. میانگین درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس در سطوح ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C به‌ترتیب ۴۵/۷۱±۰/۳۵، ۴۵/۹۴±۰/۳۱ و ۴۶/۱۹±۰/۴ بود (جدول ۲).

درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس: نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر ویتامین E در رقیق‌کننده تریس بر درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C و همچنین اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس در سطوح ۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E، به‌ترتیب ۴۷/۱۹±۰/۰۳۳، ۵۱/۶۶±۰/۰۴۲ و ۴۷/۵۰±۰/۰۴۰ بود. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم زنده در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و کمترین درصد اسپرم زنده در سطح ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E حاصل می‌گردد. میانگین درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس در سطوح ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C به‌ترتیب ۴۸/۷۲±۰/۰۹، ۴۸/۸۶±۰/۱۱ و ۴۸/۷۷±۰/۱۱ بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک و زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده تریس (هر یک از میانگین‌ها حاصل ۹ مشاهده می‌باشند).

منابع تغییر	درصد اسپرم‌های متحرک	درصد اسپرم‌های زنده
سطوح مختلف ویتامین E (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۴۴/۲۷^{c}±۰/۰۶۶	۴۷/۱۹^{c}±۰/۰۳۳
۳۰	۴۸/۴۸^{a}±۰/۰۸۷	۵۱/۶۶^{a}±۰/۰۴۲
۶۰	۴۵/۱۰^{b}±۰/۲۰	۴۷/۵۰^{b}±۰/۰۴۰
سطوح مختلف ویتامین C (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۴۵/۷۱^{b}±۰/۳۵	۴۸/۷۲^{b}±۰/۰۹
۱۵۰	۴۵/۹۴^{ab}±۰/۳۱	۴۸/۸۶^{a}±۰/۱۱
۳۰۰	۴۶/۱۹^{a}±۰/۴	۴۸/۷۷^{ab}±۰/۱۱

در هر ستون میانگین‌های با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده شیر: نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C و همچنین اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر در سطوح ۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E، به‌ترتیب ۴۲/۲۴±۰/۰۵۴، ۴۶/۴۵±۰/۰۸۵ و ۴۳/۰۶±۰/۱۹ بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم متحرک پس از یخ‌گشایی در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و کمترین درصد اسپرم متحرک پس از یخ‌گشایی در سطح ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E حاصل می‌گردد. میانگین درصد اسپرم‌های متحرک پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر در سطوح ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C به‌ترتیب ۴۳/۷۱±۰/۳۲، ۴۳/۹۱±۰/۵ و ۴۴/۱۲±۰/۴۰ بود (جدول ۳).

درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر: نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر ویتامین E در رقیق‌کننده شیر بر درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C و همچنین اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر در سطوح ۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E، به‌ترتیب ۴۵/۱۸±۰/۰۲۸، ۴۹/۶۱±۰/۰۵۲ و ۴۵/۴۳±۰/۰۴۱ بود. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد اسپرم زنده در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E و کمترین درصد اسپرم زنده در سطح ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E حاصل می‌گردد. میانگین درصد اسپرم‌های زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر در سطوح ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C، به‌ترتیب ۴۶/۷۰±۰/۷۱، ۴۶/۸۲±۰/۷۲ و ۴۶/۷۰±۰/۷۰ بود **(جدول ۳)**.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک و زنده پس از یخ‌گشایی در رقیق‌کننده شیر (هر یک از میانگین‌ها حاصل ۹ مشاهده می‌باشند).

منابع تغییر	درصد اسپرم‌های متحرک	درصد اسپرم‌های زنده
سطوح مختلف ویتامین E (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۴۲/۲۴^{c}±۰/۰۵۴	۴۵/۱۸^{c}±۰/۰۲۸
۳۰	۴۶/۴۵^{a}±۰/۰۸۵	۴۹/۶۱^{a}±۰/۰۵۲
۶۰	۴۳/۰۶^{b}±۰/۱۹	۴۵/۴۳^{b}±۰/۰۴۱
سطوح مختلف ویتامین C (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۴۳/۷۱^{b}±۰/۳۲	۴۶/۷۰^{a}±۰/۷۱
۱۵۰	۴۳/۹۱^{ab}±۰/۵	۴۶/۸۲^{a}±۰/۷۲
۳۰۰	۴۴/۱۲^{a}±۰/۴۰	۴۶/۷۰^{a}±۰/۷۰

در هر ستون میانگین‌های با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوا، خسارت‌های ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو می‌باشد. کاهش تمامیت غشاء منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش توانایی تنظیم سطوح داخل سلولی یون‌ها می‌شود که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم مضر می‌باشند (بامبر و همکاران، ۲۰۰۰). اسپرم پستانداران (مثل گاو و گوسفند) و پرندگان (مثل خروس و بوقلمون) حاوی مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء پلاسما می‌باشد که همین امر دلیل اصلی حساسیت آنها نسبت به آسیب‌های ایجاد شده توسط پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (مسائلی و همکاران، ۱۹۹۹). مواد آنتی‌اکسیدانی مثل ویتامین‌های E و C در منی وجود دارند، اما به‌دلیل ضعیف بودن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اکثر رقیق‌کننده‌ها مانند شیر و تریس و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در طی نگهداری در شرایط انجماد، استفاده از این ترکیبات می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم موثر باشد (سونمز و دمیرسی، ۲۰۰۴). عدم وجود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در زرده تخم‌مرغ می‌تواند دلیلی برای ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانی موجود در رقیق‌کننده تریس، گلوکز و زرده تخم‌مرغ باشد. دلیل دیگر برای پایین بودن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی زرده تخم‌مرغ، وجود آهن و فلزات واسطه‌ای در زرده است که تأثیر پراکسید هیدروژن را افزایش می‌دهند. پراکسید هیدروژن باعث اختلال در روند فسفریلاسیون اکسیداتیو در اسپرم می‌شود (بیلودیو و همکاران، ۲۰۰۲).

در تحقیق حاضر استفاده از ویتامین E در رقیق کننده‌های شیر و تریس باعث افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در شرایط نگهداری به‌صورت منجمد گردید. بیشترین درصد تحرک اسپرم در رقیق‌کننده‌های شیر (۴۶/۴۵±۰/۰۸۵) و تریس (۴۸/۴۸±۰/۰۸۷) در سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد.

در این آزمایش بهبود تحرک نمونه‌های اسپرماتوزوا در رقیق کننده‌های حاوی ویتامین E ممکن است به‌دلیل اثرات مثبت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E در غیرفعال نمودن اثرات مخرب انواع اکسیژن‌های فعال بر غشاء اسپرم و ساختار میتوکندری باشد. میتوکندری دربرگیرنده مسیرهایی برای تولید انرژی می‌باشد و به‌نظر می‌رسد که حساس‌ترین بخش ساختار اسپرم نسبت به نگهداری در دماهای پایین باشد. انواع اکسیژن‌های فعال می‌توانند تغییراتی را در عملکرد میتوکندری ایجاد کنند که نتیجه آن در تحرک اسپرم بروز می‌نماید. استفاده از ویتامین E از بروز چنین مشکلاتی جلوگیری می‌نماید (برینینجر و همکاران، ۲۰۰۵). از دیگر فرضیه‌های موجود در زمینه کاهش تحرک اسپرم در حین نگهداری سرمایی، کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اکسونم می‌باشد که برای جابجایی اسپرم ضروری‌اند. انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر از توانایی لازم جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های موثر در فرایندهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP[1] برای سلول اسپرم برخوردار می‌باشند. استفاده از ویتامین E می‌تواند سبب خنثی شدن اثر اکسیژن‌های فعال بر این آنزیم‌ها شود و از این طریق از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری نماید (بامبر و همکاران، ۲۰۰۰). به‌علاوه ویتامین E یک ترکیب محلول در چربی است که می‌تواند به‌راحتی در پلاسمای غشاء نفوذ کند و باعث توقف خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد بر غشاء اسپرم شود (پنا و همکاران، ۲۰۰۳). در زمینه استفاده از ویتامین E در رقیق‌کننده‌های منی، آزمایش‌های انجام شده توسط برینینجر و همکاران (۲۰۰۵) و پنا و همکاران (۲۰۰۳) نشان‌دهنده افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم با استفاده از ویتامین E پس از یخ‌گشایی بود.

ویتامین C نیز به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده‌است که می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم در طی نگهداری سرمایی موثر واقع گردد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). در تحقیق حاضر استفاده از ویتامین C نتوانست

1- Adenosine Triphosphate

Archive of SID

www.SID.ir

همانند ویتامین E در بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس موثر باشد. سونمز و دمیرسی (۲۰۰۴) گزارش کردند که استفاده از ویتامین C (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده تریس، گلوکز و زرده تخم مرغ نتوانست سبب بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی شود.

براساس نتایج این آزمایش، استفاده از ویتامین E (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس در شرایط نگهداری به‌صورت منجمد موجب بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای می‌گردد.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه معاونت امور دام استان گلستان و کارکنان محترم ایستگاه تحقیقاتی شیرنگ سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1.Baily, J.F., Bilodeau, J.F., and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology. 21:1-7.
2.Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., and Davies, M.C.G. 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. Andrology. 21:895-902.
3.Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Sirad, M.A., and Gagnon, C. 2001. Thiols prevent H_2O_2 mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56:275-286.
4.Bilodeau, J.F., Blanchette, S., Cormier, N., and Sirad, M.A. 2002. Reactive oxygen species mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extender: protection by pyruvate metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57:1105-1122.
5.Breininger, V.E., Beorlegui, N.B., Oflaherti, C.M., and Beconi, M.T. 2005. Alpha tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology. 63:2126-2135.
6.Duncan, D.B. 1995. Multiple range and multiple F test. Biometrics. 11: 1-42.
7.Massaeli, H., Sobrattee, S., and Pieree, G.N. 1999. The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical generating systems for determining lipoprotein peroxidation. Free. Radic. Biol. Med. 26:1524-1530.
8.Ongun, U., Kinet, H., Cevik, M., and Cetinkoya, S. 1997. Fertility obtained from frozen ram semen with different extenders containing varied antioxidants. Theriogenology. 58:744-753.
9.Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., and Martinez, H.R. 2003. Antioxidant supplementation invitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fraction of the ejaculate. Anim. Reprod. Sci. 78:85-98.
10.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62:77-111.
11.SAS. 2006. SAS User' s Guide: Statistics (Version 9.1 Ed). SAS Institute. Inc., Cary, NC.
12.Sonmez, M., and Demirci, E. 2004. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. Turk. J. Anim. Sci. 28:893-899.
13.Sreejith, J.N., Brar, A.S., Ahuja, C.S., and Sangha, S.P.S. 2006. A comparative study on lipid peroxidation activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. Anim. Reprod. Sci. 96:21-29.
14.Upreti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., and Munday, R. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically defined diluent containing antioxidants. Anim. Reprod. Sci. 48:269-278.
15.Yamamoto, Y., and Omori, M. 1994. Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins. Biosci. Biothech. Biochem. 58:1711-1730.
16.Yousef, M.I., Abdollad, G.A., and Kamel, K.I. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Anim. Reprod. Sci. 76:99-111.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(5), 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Investigation the effect of various levels of Vitamins E and C in milk and tris extenders on characteristics of Atabay ram semen in frozen condition

[*]B. Parizadian Kavan[1], Y. Jafari Ahangari[2] and S. Zerehdaran[3]
[1]Former M.Sc. student, Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

The objective of present study was to investigate the effect of various levels of Vitamins E and C in milk and tris extenders on Atabay ram semen characteristics in frozen condition. Semen were collected from 6 Atabay rams using artificial vagina and suitable samples were mixed together and subjected to different treatments in milk and tris extenders. Spermatozoa characteristics including percentage of motile and viable cells were assessed by electronic microscope. This experiment was carried out in 3×3 factorial arrangement on the basis of completely randomized design. First factor was various levels of Vitamin E (0, 30 and 60 µg/ml) and second factor was various levels of Vitamin C (0, 150 and 300 µg/ml). Results indicated that in frozen condition, the effect of Vit. E on motility and viability percentage of spermatozoa in milk and tris extenders was significant ($P<0.01$). The effect of Vit. C on motility and viability percentage of spermatozoa in milk and tris extenders was not significant ($P>0.05$). Mean comparison on the basis of Duncan test showed that the highest motility of spermatozoa in tris (48.48±0.087) and milk extenders (46.45±0.085) were obtained in level 30 µg/ml Vit. E. In conclusion, use of Vitamin E (30 µg/ml) in milk and tris extenders is recommended for storage of Atabay ram semen in frozen condition.

Keywords: Vitamins E and C; Sperm characteristics; Frozen condition; Atabay ram

Archive of SID

[*]- Corresponding Author; Email: bahman368@gmail.com

www.SID.ir