جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

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

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

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

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۵

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 مایع بود. منی از شش راس قوچ جمع‌آوری و بلافاصله با هم مخلوط شدند. نمونه‌های منی در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس تیمارهای مختلف را دریافت نمودند. خصوصیات اسپرم، شامل درصد اسپرم‌های متحرک و زنده مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۵×۳×۳ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف ویتامین E (صفر، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ویتامین C (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت) بودند. نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس معنی‌دار بود ($P<0/01$). تأثیر ویتامین C بر درصد تحرک اسپرم‌ها در رقیق‌کننده تریس معنی‌دار بود ($P<0/05$). اثر زمان‌های مختلف نگهداری (صفر، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت) بر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس معنی‌دار بودند ($P<0/01$). مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن نشان داد که بیشترین درصد تحرک (۶۹/٤۲ درصد) و زنده مانی اسپرم‌ها (۷۱/۶۲ درصد) در رقیق‌کننده تریس حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E، به‌دست می‌آید. بنابراین به‌منظور نگهداری اسپرم قوچ آتابای در شرایط مایع استفاده از ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده تریس و استفاده از ویتامین E در رقیق‌کننده شیر توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خصوصیات اسپرم، ویتامین E، ویتامین C، قوچ آتابای

مقدمه

برای حفظ دام‌های بومی و جلوگیری از انقراض این ذخایر ژنتیکی ارزشمند لازم است که بخشی از تحقیقات در زمینه روش‌های مطلوب حفظ و انتقال این ژن‌ها به نسل‌های آینده اختصاص یابد. بنابراین می‌توان با بهبود روش‌های نگهداری اسپرم در جهت نیل به این اهداف تأثیرگذار بود (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰).

اسپرم در طی نگهداری در شرایط سرمایی با کاهش خواص حیاتی خود مثل تحرک و باروری روبرو می‌شود که این امر می‌تواند یک عامل نامطلوب در توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی باشد (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰). در همین زمینه کرابو (۱۹۹۱) نشان داد که اسپرم‌های

* مسئول مکاتبه: bahman368@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نگهداری شده در دماهای پایین از نصف باروری اسپرم‌های تازه برخوردار می‌باشند. خسارات ساختاری و غیرساختاری غشاء به‌علت نگهداری سرمایی، نقص‌های مورفولوژیک، غیرطبیعی بودن اکروزوم و دیگر تغییرات نامطلوب در طی کاهش دما می‌توانند از عوامل عمده پایین‌تر بودن باروری اسپرم‌های نگهداری شده در دماهای پایین باشند (بایلی و همکاران، ۲۰۰۰). نگهداری اسپرم در دماهای پایین تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر[1] را افزایش می‌دهد و مشخص شده که این ترکیبات اثرات مخربی بر ساختار سلول اسپرم برجای می‌گذارند. بنابراین در این شرایط، استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با کاهش سرعت اکسیداسیون، باعث حفظ سلول از آسیب‌های شدید اکسیده شدن می‌شوند. این ترکیبات ممکن است به طور 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. کارایی و درجه تأثیر یک آنتی‌اکسیدان به‌سهولت جدا شدن این اتم هیدروژن از آن مربوط می‌شود (یوپرتی و همکاران، ۱۹۹۷). یافته‌های اخیر نشان دادند که نگهداری سرمایی باعث کاهش فعالیت مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم می‌شود. کاهش فعالیت مواد آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در اسپرم گاو و انسان نگهداری شده در شرایط سرمایی در مقایسه با اسپرم تازه مشاهده شده است (برینینجر و همکاران، ۲۰۰۵). در طی کاهش دما تا ٤ درجه سانتی‌گراد تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در اسپرم انسان افزایش پیدا می‌کند (بیلودیو و همکاران، ۲۰۰۲). اکسیژن‌های واکنش‌پذیر مثل پراکسید هیدروژن[2] باعث کاهش تحرک در اسپرماتوزوای موش، انسان، گاو، خرگوش و گوسفند شده‌است (یاماموتو و اوماری، ۱۹۹٤). تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر توسط منابع مختلف در طی نگهداری سرمایی اتفاق می‌افتد (بامبر و همکاران، ۲۰۰۰). در سلول‌های سوماتیک تراوش انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر از زنجیره تنفسی میتوکندریایی در حدود ۲ تا ۵ درصد برآورد شده است. این منبع به احتمال زیاد مهم‌ترین عامل تولید انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در اسپرم می‌باشد. به‌علاوه لوکوسیت‌های آلوده در اسپرم نیز می‌توانند مقدار زیادی از انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر را تولید کنند (بونیز، ۱۹۹۷).

تقریباً تمام سلول‌ها دارای مواد و آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند اثرات سمی انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر را خنثی کنند. اما میزان توانایی آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم در مقایسه با دیگر سلول‌ها پایین‌تر است و این سلول‌ها نسبت به فشارهای اکسیداتیو آسیب‌پذیرتر هستند (اسریجیس و همکاران، ۲۰۰٦). در پلاسمای منی سه سیستم عمده آنزیمی بنام گلوتاتیون پراکسیداز[3]، سوپراکسید دیسموتاز[4] و کاتالاز[5] وجود دارد (کانکوفر و همکاران، ۲۰۰۵). از دیگر ترکیباتی که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به ویتامین E، ویتامین C، آلبومین، تائورین و هیپوتائورین اشاره کرد. مجموع سیستم‌های آنزیمی و مواد آنتی‌اکسیدانی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی را تشکیل می‌دهند (اسمیت و همکاران، ۱۹۹٦). ویتامین E مهمترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی موجود در اسپرم است و جهت مقابله بر علیه انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر در غشاء ضروری می‌باشد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). سارلوس و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که استفاده از ویتامین E در رقیق‌کننده تریس و زرده تخم‌مرغ تحت شرایط مایع توانست سبب افزایش تحرک اسپرم قوچ شود ($P<0/05$). نتایج به‌دست آمده از تحقیق دانگو و دانگو (۱۹۹۷) نشان‌دهنده بهبود تحرک و تمامیت اکروزوم اسپرم بوقلمون در رقیق‌کننده تریس با استفاده از ویتامین E بود. ویتامین C نیز به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است که می‌تواند در کاهش اثرات مخرب انواع

1- Reactive Oxygen Species
2- H_2O_2

3- Glutathione Peroxidase
4- Superoxid Dismutase
5- Catalase

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رادیکال‌های آزاد بر سلول‌ها مؤثر باشد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). در زمینه استفاده از ویتامین C گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد. در تحقیق صورت گرفته به وسیله آئوریش و همکاران (۱۹۹۷) این نتیجه حاصل شد که ویتامین C دارای اثرات حفاظتی بر تمامیت غشاء اسپرم اسب پس از ذخیره‌سازی در شرایط سرمایی می‌باشد. سونمز و دمیرسی (۲۰۰٤) گزارش کردند که استفاده از ویتامین C (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده تریس، گلوکز و زرده تخم‌مرغ نتوانست سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم قوچ شود. در آزمایش بال و همکاران (۲۰۰۱) این نتیجه حاصل شد که استفاده از ویتامین C (۰/٤۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) هیچ تأثیر مثبتی بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم اسب نگهداری شده در رقیق‌کننده شیر در شرایط نگهداری به‌صورت مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نداشت.

با توجه به موارد ذکر شده، هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر سطوح مختلف ویتامین‌های E و C بر خصوصیات اسپرم قوچ آتابای[٤] و در صورت مثبت بودن نتایج تعیین بهترین سطح از این ویتامین‌ها جهت استفاده در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند شیرنگ وابسته به معاونت امور دام استان گلستان در طی دو ماه آذر و دی سال ۱۳۸۵ انجام شد. برای انجام این تحقیق از شش راس قوچ ۲ تا ۳ ساله نژاد دالاق (آتابای) موجود در ایستگاه تحقیقاتی دام استفاده شد. قوچ‌های این مرکز با روش اسپرم‌گیری به‌وسیله مهبل مصنوعی سازگاری داده شدند و از این طریق نمونه‌های منی جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌های منی به‌دست آمده از ٦ راس قوچ با هم مخلوط شدند و سپس در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس به‌نسبت ۳ به ۱ (سه قسمت محلول رقیق‌کننده و یک قسمت منی) رقیق‌سازی گردیدند و سه سطح مختلف ویتامین E (صفر، ۳۰ و ٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و C (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به نمونه‌ها اضافه شدند و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در پنج فاصله زمانی (صفر، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت) از لحاظ درصد تحرک و زنده‌مانی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

خصوصیات حیاتی که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، شامل درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در تیمارهای مختلف بود. به‌منظور تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوا، یک قطره کوچک از نمونه منی رقیق‌شده برروی یک لام تمیز گرم شده قرار داده شد. سپس برروی آن یک لامل گذاشته شد تا نمونه به‌طور یکنواخت در زیر سطح لامل پخش شود.

جدول ۱- رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی قوچ در شرایط مایع (سالامون و ماکسول، ۲۰۰۰).

اجزای رقیق‌کننده	مقدار در ۱۰۰ میلی‌لیتر
تریس (گرم)	۳/٦۳٤
فروکتوز (گرم)	۰/۵
اسید سیتریک (گرم)	۱/۹۹
زرده تخم مرغ (میلی‌لیتر)	۱٤
پنی سیلین (واحد بین‌المللی)	۱۰۰۰۰۰
استرپتومایسین (واحد بین‌المللی)	۱۰۰
آب مقطر تا حجم (میلی لیتر)	۱۰۰

در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× 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 رنگ‌آمیزی ابتدا یک قطره از منی رقیق‌شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم‌شده قرار داده شد و سپس یک قطره از رنگ بر روی منی رقیق‌شده ریخته شد. بعد از مدت یک دقیقه توسط لبه لام دیگری گسترش نازکی از آن تهیه شد و سپس به‌مدت ٥ دقیقه لام در مجاورت هیتر قرار داده شد تا خشک شود. اسپرم‌های زنده به‌دلیل داشتن غشاهای سالم در مقایسه با اسپرم‌های مرده تحت تأثیر محلول رنگ‌آمیزی ائوزین و نکروزین رنگی را به خود جذب نکرده و از این طریق از اسپرم‌های مرده قابل تشخیص می‌باشند. در مرحله بعد با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ در چند ناحیه از لام تعداد اسپرم‌های زنده شمارش شدند (جعفری‌آهنگری، ١٩٩٦).

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل ٥×٣×٣ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که فاکتور اول، سطوح مختلف ویتامین E (صفر، ٣٠ و ٦٠ میکروگرم در میلی‌لیتر)، فاکتور دوم، سطوح مختلف ویتامین C (صفر، ١٥٠ و ٣٠٠ میکروگرم در میلی‌لیتر) و فاکتور سوم، زمان‌های مختلف نگهداری در دمای ٥ درجه سانتی‌گراد (صفر، ٤، ٨، ١٢ و ٢٤ ساعت) بودند. داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن[1] استفاده شد.

نتایج

درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده تریس: نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع معنی‌دار بود (P<٠/٠١). تأثیر ویتامین C بر درصد اسپرم‌های متحرک نیز معنی‌دار بود (P<٠/٠٥). اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). بیشترین درصد تحرک اسپرم (٦٩/٤٢ درصد) در رقیق‌کننده تریس حاوی ٣٠ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد (جدول ٢). اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده تریس در شرایط مایع معنی‌دار بودند (P<٠/٠١). اثر متقابل ویتامین E و زمان‌های نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار بودند (P<٠/٠١). همان‌طوری‌که در جدول ٣ مشاهده می‌گردد، بیشترین درصد تحرک اسپرم (٩٠/٤٥ درصد) در شرایط نگهداری در زمان صفر و سطح ٣٠ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد. اثر متقابل ویتامین C و زمان‌های نگهداری و اثر متقابل ویتامین‌های E و C و زمان‌های نگهداری معنی‌دار نبودند (P>٠/٠٥).

درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس: نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع معنی‌دار بود (P<٠/٠١). تأثیر ویتامین C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). بیشترین درصد اسپرم زنده (٧١/٦٢ درصد) در رقیق‌کننده تریس حاوی ٣٠ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد (جدول ٢). اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس در شرایط مایع معنی‌دار بودند (P<٠/٠١). اثر متقابل ویتامین E و زمان‌های نگهداری بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار بودند (P<٠/٠١). همان‌طوری‌که در جدول ٣ مشاهده می‌گردد، بیشترین درصد اسپرم زنده (٩٢/٤٤ درصد) در شرایط نگهداری در زمان صفر و سطح ٣٠ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد. اثر متقابل ویتامین C و زمان‌های نگهداری و اثر متقابل ویتامین‌های E و C و زمان‌های نگهداری معنی‌دار نبودند (P>٠/٠٥).

1- Duncan Test

درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده شیر: نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده شیر در شرایط نگهداری به‌صورت مایع معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین درصد تحرک اسپرم (٦٧/٧٨ درصد) در رقیق‌کننده شیر حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد (جدول ٤). اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک در رقیق‌کننده شیر در شرایط مایع معنی‌دار بودند (P<۰/۰۱). اثر متقابل ویتامین E و زمان‌های نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار بودند (P<۰/۰۱). همان‌طوری‌که در جدول ۵ مشاهده می‌گردد، بیشترین درصد تحرک اسپرم (٨٨/٤١ درصد) در شرایط نگهداری در زمان صفر و سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد. اثر متقابل ویتامین C و زمان‌های نگهداری و اثر متقابل ویتامین‌های E و C و زمان‌های نگهداری معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵).

درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر: نتایج نشان داد که تأثیر ویتامین E بر درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر در شرایط نگهداری به‌صورت مایع معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تأثیر ویتامین C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). اثر متقابل ویتامین‌های E و C بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بیشترین درصد اسپرم زنده (٧٠/٣٧ درصد) در رقیق‌کننده شیر حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد (جدول ٤). اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر در شرایط مایع معنی‌دار بودند (P<۰/۰۱). اثر متقابل ویتامین E و زمان‌های نگهداری بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار بودند (P<۰/۰۱). همان‌طوری‌که در جدول ۵ مشاهده می‌گردد، بیشترین درصد اسپرم زنده (٩٢/٣٦ درصد) در شرایط نگهداری در زمان صفر و سطح ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E به‌دست آمد. اثر متقابل ویتامین C و زمان‌های نگهداری و اثر متقابل ویتامین‌های E و C و زمان‌های نگهداری معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع.

منابع تغییر	درصد اسپرم‌های متحرک	درصد اسپرم‌های زنده
ویتامین E (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	٦٦/٣٢[a]	٦٨/٥٢[a]
۳۰	٦٩/٤٢[b]	٧١/٦٢[b]
٦۰	٦٨/١٣[c]	٧٠/٣٥[c]
SE	۰/۰۳۵	۰/۰۳۳
ویتامین C (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	٦٧/٩٢[a]	٧٠/١٣[a]
١٥۰	٦٨/۰٣[b]	٧٠/٢٣[b]
٣۰۰	٦٧/٩٢[a]	٧٠/١٣[a]
SE	۰/۰۳۵	۰/۰۳۳
زمان‌های مختلف نگهداری (ساعت)		
۰	٨٩/۰٧٨[a]	٩١/۰٦٧[a]
٤	٨٤/۰٦٧[b]	٨٦/۰٦٧[b]
٨	٧٥/٦٣[c]	٧٧/٧۰[c]
١٢	٦٤/٩٤[d]	٦٦/٩٦[d]
٢٤	٢٦/۰٩[e]	٢٩/۰٤[e]
SE	۰/۰٤٦	۰/۰٤٣

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف ویتامین E و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده تریس در شرایط مایع.

فاکتورهای آزمایش	درصد تحرک اسپرم	درصد اسپرم زنده
ویتامین E با زمان‌های مختلف نگهداری		
E_1T_1	۸۷/۴۱[a]	۸۹/۳۸[a]
E_1T_2	۸۲/۴۳[b]	۸۴/۴۳[b]
E_1T_3	۷۴/۲۶[c]	۷۶/۲۸[c]
E_1T_4	۶۳/۱۲[d]	۶۵/۱۴[d]
E_1T_5	۲۴/۴[e]	۲۷/۳۷[e]
E_2T_1	۹۰/۴۵[f]	۹۲/۴۴[f]
E_2T_2	۸۵/۴۸[g]	۸۷/۴۸[g]
E_2T_3	۷۷/۴۲[h]	۷۹/۴۲[h]
E_2T_4	۶۶/۳۴[i]	۶۸/۳۷[i]
E_2T_5	۲۷/۴۵[k]	۳۰/۴۱[k]
E_3T_1	۸۹/۸۳[l]	۹۱/۳۸[l]
E_3T_2	۸۴/۲۸[m]	۸۶/۲۸[m]
E_3T_3	۷۵/۲۰[n]	۷۷/۳۸[n]
E_3T_4	۶۵/۳۷[o]	۶۷/۳۵[o]
E_3T_5	۲۶/۴۲[p]	۲۹/۳۵[p]
SE	۰/۰۸	۰/۰۷۵

E_1، E_2 و E_3 بیانگر سطوح مختلف ویتامین E شامل ۰، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و T_1، T_2، T_3، T_4 و T_5 بیانگر زمان‌های مختلف نگهداری شامل ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت می‌باشند.

جدول ۴- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر در شرایط نگهداری به‌صورت مایع.

منابع تغییر	درصد اسپرم‌های متحرک	درصد اسپرم‌های زنده
ویتامین E (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۶۴/۶۸[a]	۶۷/۲۷[a]
۳۰	۶۷/۷۸[b]	۷۰/۳۷[b]
۶۰	۶۶/۴۹[c]	۶۹/۱۰[c]
SE	۰/۰۳۱	۰/۰۲۹
ویتامین C (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۰	۶۶/۲۹[a]	۶۸/۸۹[a]
۱۵۰	۶۶/۳۸[b]	۶۸/۹۶[b]
۳۰۰	۶۶/۲۸[a]	۶۸/۹۰[a]
SE	۰/۰۳۱	۰/۰۲۹
زمان‌های مختلف نگهداری (ساعت)		
۰	۸۷/۰۴[a]	۹۱/۰۲[a]
۴	۸۲/۰۳[b]	۸۴/۹۶[b]
۸	۷۳/۵۸[c]	۷۶/۶۳[c]
۱۲	۶۳/۹۱[d]	۶۴/۹۳[d]
۲۴	۲۵/۰۴[e]	۲۷/۰۲[e]
SE	۰/۰۴۰	۰/۰۳۷

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف ویتامین E و زمان‌های مختلف نگهداری بر درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده شیر در شرایط مایع.

فاکتورهای آزمایش	درصد اسپرم متحرک	درصد اسپرم زنده
ویتامین E با زمان‌های مختلف نگهداری		
E_1T_1	۸۵/۳۷[a]	۸۹/۳۲[a]
E_1T_2	۸۰/٤۰[b]	۸۳/۳۳[b]
E_1T_3	۷۲/۲[c]	۷۵/۲۸[c]
E_1T_4	٦۲/۰۸[d]	٦۳/۱۰[d]
E_1T_5	۲۳/۳۷[e]	۲۵/۳٤[e]
E_2T_1	۸۸/٤۱[f]	۹۲/۳٦[f]
E_2T_2	۸۳/٤۳[g]	۸٦/٤۱[g]
E_2T_3	۷۵/۳۷[h]	۷۸/۳٤[h]
E_2T_4	٦۵/۳۱[i]	٦٦/۳٤[i]
E_2T_5	۲٦/۳۸[k]	۲۸/٤۰[k]
E_3T_1	۸۷/۳۵[l]	۹۱/۳۹[l]
E_3T_2	۸۲/۲٦[m]	۸۵/۱٦[m]
E_3T_3	۷۳/۱٤[n]	۷٦/۲۷[n]
E_3T_4	٦٤/۳٤[o]	٦۵/۳۵[o]
E_3T_5	۲۵/۳۵[p]	۲۷/۳٤[p]
SE	۰/۰۷	۰/۰٦۵

E_1، E_2 و E_3 بیانگر سطوح مختلف ویتامین E شامل ۰، ۳۰ و ٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و T_1، T_2، T_3، T_4 و T_5 بیانگر زمان‌های مختلف نگهداری شامل ۰، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت می‌باشند.

بحث

اسپرم پستاندارانی مانند گاو، گوسفند و پرندگانی مانند خروس و بوقلمون حاوی مقدار زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاء پلاسما می‌باشند که همین امر دلیل اصلی حساسیت آنها نسبت به آسیب‌های ایجاد شده توسط پراکسیداسیون لیپید می‌باشد (فونوهاشی و سانو، ۲۰۰۵). یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرماتوزوا، خسارت‌های ساختاری ناشی از فشارهای اکسیداتیو بر تمامیت غشاء می‌باشد که منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش توانایی تنظیم سطوح یونی در داخل سلول می‌شود که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم مضر می‌باشند (بامبر و همکاران، ۲۰۰۰).

اگرچه مواد آنتی‌اکسیدانی مثل ویتامین‌های E و C در منی وجود دارند، اما به‌دلیل مقدار کم آنها و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منی در طی نگهداری در شرایط سرمایی، استفاده از این ترکیبات می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم مؤثر باشد (سونمز و دمیرسی، ۲۰۰٤). 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 پایین‌بودن 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 زمینه استفاده از ویتامین‌های E و C در رقیق‌کننده‌های منی گزارش‌های متعددی وجود دارد. آزمایش‌های انجام شده توسط سارلوس و همکاران

(۲۰۰۲) و دانگو و دانگو (۱۹۹۷) نشان‌دهنده بهبود خصوصیات اسپرم (تحرک و زنده‌مانی) در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E بودند. در شرایط این آزمایش استفاده از ویتامین E باعث افزایش معنی‌دار تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد گردید. البته بیشترین درصد تحرک (۶۹/۴۲ درصد) و زنده‌مانی (۷۱/۶۲ درصد) اسپرم در رقیق‌کننده تریس حاوی ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین E حاصل شد.

به‌دلیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی ویتامین E، انواع اکسیژن‌های فعال اثرات به‌مراتب کمتری بر غشاء اسپرم و ساختار میتوکندری وارد می‌کنند. 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 (برینینجر و همکاران، ۲۰۰۵). از دیگر فرضیات موجود در زمینه کاهش تحرک اسپرم در طی نگهداری سرمایی، کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اکسونم می‌باشد که برای جابجایی اسپرم ضروری‌اند. انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر از توانایی لازم جهت جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های مؤثر در فرایندهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP برای سلول اسپرم برخوردار می‌باشند. استفاده از مواد آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سبب خنثی‌شدن اثر اکسیژن‌های فعال بر این آنزیم‌ها شود و در نتیجه از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری نماید (بامبر و همکاران، ۲۰۰۰). تنها اسپرم‌های زنده با غشاء سالم هستند که می‌توانند واکنش اکروزومی را طی کنند و با نفوذ در لایه زوناپلوسیدا تخمک با اووسیت ترکیب شوند. در طی نگهداری سرمایی میزان زنده‌مانی نمونه‌های اسپرم کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از تأثیر رادیکال‌های آزاد بر ساختار غشاء باشد (بال و همکاران، ۲۰۰۱). یکی از نتایج تخریب اکروزوم ترشح مواد آنزیمی است. ترشح ۵ آنزیم آسپارتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، هیالورونو گلوکو زامینداز، اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز در اثر تخریب اکروزوم گزارش شده‌است و مشخص شده که بین آزاد شدن این آنزیم‌ها و تحرک اسپرم ارتباط منفی وجود دارد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طورکلی ویتامین E به‌دلیل حلالیت در چربی به راحتی می‌تواند در پلاسمای غشاء نفوذ کند و باعث کاهش خسارات ناشی از رادیکال‌های آزاد بر ساختار اسپرم شود (دانگو و دانگو، ۱۹۹۷).

ویتامین C نیز به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدانی شناخته شده است که می‌تواند در بهبود خصوصیات اسپرم در طی نگهداری سرمایی مؤثر واقع گردد (یوسف و همکاران، ۲۰۰۳). در تحقیق حاضر استفاده از ویتامین C منجر به بهبود تحرک اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده تریس شد ولی نتوانست اثر مثبتی بر تحرک و زنده مانی اسپرم قوچ آتابای در رقیق‌کننده شیر و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده تریس داشته باشد.

نتایج به‌دست آمده در مورد اثر زمان‌های مختلف نگهداری بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در شرایط مایع در تحقیق حاضر با نتایج جعفری آهنگری (۱۹۹۶) و کورتیل و برایل (۱۹۷۷) مطابقت داشت. جعفری آهنگری (۱۹۹۶) حداکثر زمان نگهداری اسپرم قوچ را تحت شرایط مایع ۱۲ ساعت معرفی کرد.

براساس نتایج این آزمایش، استفاده از ویتامین E در رقیق‌کننده‌های شیر و تریس در شرایط نگهداری به‌صورت مایع موجب بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ آتابای می‌گردد. به‌علاوه استفاده از ویتامین C در رقیق‌کننده تریس نیز می‌تواند در بهبود تحرک اسپرم قوچ آتابای مؤثر باشد.

سپاسگزاری

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

منابع

1.Aurich, J.E., Schonherr, U., Hoppe, H., and Aurich, C. 1997. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. Theriogenology. 48:185-192.
2.Baily, J.F., Bilodeau, J.F., and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology. 21:1-7.
3.Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G., and Baumber, J. 2001. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degree C. Theriogenology. 56:577-589.
4.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.
5.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.
6.Bovenis, A. 1997. Mitochondrial production of superoxide and hydrogen peroxide. Adv. Exp. Med. Biol. 78:67-82.
7.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.
8.Corteel, J.M., and Brail, G. 1977. Production, storage and artificial insemination of goat semen. In: Management of reproduction in sheep and goat symposium. Madison. Pp:41-57.
9.Crabo, B.G. 1991. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. In: Johnson, L. A., D. Rath. Boar semen preservation. Berlin: Paul. Parey. Scientific Publishers. Pp:3-9.
10.Donoghue, A.M., and Donoghue, D.J. 1997. Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. Theriogenology. 55:144-150.
11.Funahashi, H., and Sano, T. 2005. Selected antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degree C. Theriogenology. 63:1605-1616.
12.JafariAhangari, Y. 1996. An investigation on the effect of various buffers (Tris, Citrate and Skimmed milk) on ram semen motility and survival characteristics in liquid storage. Final report of Research Plan. Animal Science Research Institute. 37p.
13.Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J., and Aurich, C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degree C. Theriogenology. 63:1354-1365.
14.Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62:77-111.
15.Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., Gabor, G., and Ratkey, J. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. Acta. Vet. Hun. 50:235-245.
16.Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J., and Lissi, E. 1996. Total antioxidant capacity of human sperm. Hum. Reprod. 11:1655-1660.
17.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.
18.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.
19.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.
20.Yamamoto, Y., and Omori, M. 1994. Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins. Biosci. Biothech. Biochem. 58:1711-1730.
21.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.

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

The effects of various levels of Vitamins E and C in milk and tris extenders on characteristics of Atabay ram semen in liquid 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 effects of various levels of vitamins E and C in milk and tris extenders on Atabay ram semen characteristics in liquid condition. Semen was collected from 6 rams and mixed together at once. Semen samples received different treatments in milk and tris extenders. Spermatozoa characteristics including percentage of motile and viable cells were assessed. This experiment was carried out in 3×3×5 factorial arrangement with the use of completely randomized design. Treatments were included various levels of vitamin E (0, 30 and 60 µg/ml), vitamin C (0, 150 and 300 µg/ml) and different storage times (0, 4, 8, 12 and 24 hour). Results showed that the effect of vit. E on motility and viability percentage of spermatozoa in milk and tris extenders were significant ($P<0.01$). The effect of vit. C on motility percentage of spermatozoa in tris extender was significant ($P<0.05$). The effect of different storage times on viability and motility percentage of spermatozoa in milk and tris extenders were significant ($P<0.01$). Mean comparison on the basis of Duncan test showed that the highest motility (%69.42) and viability (%71.62) of spermatozoa were obtained in tris extender containing 30 µg/ml vit. E. Therefore, use of vitamins E and C in tris extender and use of vitamin E in milk extender is recommended for storage of Atabay ram semen in liquid condition.

***Keywords*:** Sperm Characteristics; Vitamin E; Vitamin C; Atabay ram

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