

تأثیر استفاده از سطوح مختلف قند رافینوز در نگهداری اسپرم منجمد نژادهای مختلف قوچ در فصل تولیدمثلی

پریسا دولتی دورباش^۱، غلامعلی مقدم^{۲*}، حسین دقیق‌کیا^۳، اکبر تقی‌زاده^۲ و سید عباس رافت^۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵

^۱ فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه‌ی مطالعاتی: مطالعات نشان داده که منی قوچ مشکل‌تر از سایر حیوانات اهلی منجمد می‌شود. هدف: از انجام این تحقیق هدف، بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف رافینوز بر مدت زمان ذخیره منی منجمد قوچ در سه نژاد مختلف بود. **روش کار:** در این طرح از سه رأس قوچ نژاد قزل، دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی قزل- مریوس و دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی مریوس- مغانی برای اسپرم‌گیری استفاده شد. پس از اسپرم‌گیری نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند، و پس از یک ارزیابی اولیه در 37°C با رقیق‌کننده‌ی بر پایه‌ی تریس که با ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز غنی‌سازی شده بود و یک گروه شاهد (بدون قند)، رقیق‌سازی و پس از خنک‌سازی تا دمای 5°C ، داخل نیتروژن مایع منجمد شده، و تا ۱۵ روز نگهداری شدند. برای مشاهده‌ی تغییرات نمونه‌ها به مدت ۱۵ روز برای ویژگی‌هایی چون درصد تحرک، حرکت پیشرونده، درصد اسپرم‌های زنده و غیرطبیعی ارزیابی شدند. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج نشان داد، افزودن ۷۵ میلی‌مولار رافینوز بیشترین درصد اسپرم‌های زنده را نسبت به گروه شاهد داشتند ($P < 0/05$)، سطح ۵۰ میلی‌مولار بیشترین و گروه شاهد کمترین درصد تحرک و حرکت پیشرونده را نشان داد ($P < 0/05$)، سطح ۱۰۰ میلی‌مولار کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نسبت به گروه ۵۰ میلی‌مولار و شاهد نشان داد. همچنین در بین نژادهای استفاده شده قزل بیشترین درصد اسپرم‌های زنده، درصد تحرک و حرکت پیشرونده را دارا بود ($P < 0/05$)، و نیز نژاد قزل- مریوس کمترین و نژاد قزل بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نشان دادند ($P < 0/05$). نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سطوح مختلف رافینوز بسته به اهداف مختلف می‌تواند موجب بهبود ویژگی منی منجمد قوچ شود، همچنین قابلیت نگهداری اسپرم نژاد قزل به صورت منجمد با استفاده از قند رافینوز بهتر از نژادهای آمیخته می‌باشد.

واژگان کلیدی: رافینوز، فصل تولیدمثلی، منی منجمد، نژادهای قوچ

مقدمه

صنعتی از تکنولوژی‌های مربوط به تولید مثلی مخصوصاً تلقیح مصنوعی استفاده نماید، علاوه بر این نرهایی که به طور معمول برای اسپرم‌گیری و انجماد

صنعت گوسفند به دلیل نقص در جمع‌آوری، انجماد و تلقیح منی منجمد قوچ، هنوز نتوانسته به صورت

استفاده قرار گیرند. دی و تری‌ساکاریدها ممکن است مؤثرتر از مونوساکاریدها موجب دهیدراسیون اسمزی شوند. رافینوز تری‌ساکاریدی شبیه دیگر قندهاست که از طریق واکنش با غشای لیپیدی و پروتئین‌ها خطر تشکیل کریستال یخ را کاهش داده که موجب دهیدراسیون در اثر فشار اسمزی در طول حفاظت انجمادی می‌شود. و همچنین موجب حفاظت DNA در برابر آسیب‌های انجمادی می‌شود (بوکاک و همکاران ۲۰۱۳). هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف رافینوز در نگهداری منی سه نژاد قوچ بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز، واقع در جاده باسمنج انجام گرفت. در این طرح از سه رأس قوچ نژاد قزل، دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی قزل - مریوس و دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی مریوس - مغانی (۴-۳ ساله و ۷۰-۸۰ کیلوگرم) برای اسپرم‌گیری استفاده شد. اسپرم‌گیری دو بار در هفته و به کمک واژن مصنوعی انجام شد. پس از اسپرم‌گیری نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده، و پس از یک ارزیابی اولیه (حجم، درصد تحرک، غلظت و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی)، فقط نمونه‌های با تحرک بیش از ۷۰ درصد، غلظت بیش از 3×10^9 اسپرم در هر میلی‌لیتر، حجم بیش از ۰/۵ میلی‌لیتر و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد در هر نژاد پول و برای رقیق‌سازی استفاده شدند. برای تهیه رقیق‌کننده، ۲/۷۱ گرم تریس (Merck ۶۴۲۷۱، آلمان)، ۱ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات (Appli chem GmbH ۶۴۲۹۱، آلمان)، ۱/۴ گرم فروکتوز (Daejung Chemicals ۰۰۴۳، آلمان)، و ۱۰۰۰۰۰ واحد بین الملل پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسن را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس ۷۳ میلی‌لیتر از این محلول با ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ و ۷ میلی‌لیتر گلیسرول ترکیب‌گردید، سپس رقیق‌کننده به ۴ قسمت تقسیم شده و با ۵۰، ۷۵ و

منی استفاده می‌شوند هنوز نیاز به بهینه‌سازی پروتکل‌های انجمادی و پرورشی برای منی قوچ دارند (پوردی و همکاران ۲۰۱۰). انجماد اسپرم پستانداران دارای مزایای زیادی برای صنعت دام به‌ویژه در رابطه با ارزیابی و انتخاب ژنتیکی مثل برنامه‌ی پدران مرجع می‌باشد. اما فرایند انجماد و ذوب موجب آسیب‌هایی مثل شوک سرمایی، تنش اسمزی، تشکیل کریستال‌های یخ و تنش اکسیداتیو شده که موجب آسیب انجمادی و از دست دادن قابلیت زیست و باروری اسپرم می‌شود (غلامی و همکاران ۲۰۱۲). از دلایل اصلی کاهش کیفیت اسپرم تشکیل کریستال یخ در حین انجماد می‌باشد که هنگام استفاده از یک رقیق‌کننده‌ی ایزوتونیک که با قندهای نفوذناپذیر غنی‌سازی شده به حداقل می‌رسد (بدر و همکاران ۲۰۱۰). برای کاهش اثرات زیان‌آور گلیسرول در قوچ می‌توان از ترکیب گلیسرول با قند و افزایش فشار اسمزی رقیق‌کننده استفاده کرد (سویلو و همکاران ۲۰۰۷). گلیسرول با قندهایی مانند ترهالوز و رافینوز اثر سینرژیسم دارد (پرز و همکاران ۲۰۰۹؛ آیسن و همکاران ۲۰۰۲).

رقیق‌کننده‌های استفاده شده برای نگهداری منی گونه‌های اهلی باید ظرفیت بافری، pH کافی، و اسمولالیته‌ی مناسب برای حفاظت سلول اسپرم از آسیب انجمادی را داشته باشند. لاکتوز، سوکروز، رافینوز، ترهالوز و دکستران‌ها نمی‌توانند از عرض غشای پلاسمایی عبور کنند در نتیجه سبب بالا رفتن فشار اسمزی شده که موجب از دست دادن آب سلول و کاهش تشکیل یخ داخل سلولی می‌شوند، این قندها با فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی واکنش داده و زنده ماندن اسپرم منجمد را افزایش می‌دهند (بارباس و ماسکارن‌هاس ۲۰۰۹). رافینوز برای جلوگیری از تشکیل یخ خارج سلولی، فراهم کردن اسمولالیته‌ی بالا و افزایش تشکیل حالت کریستال‌های ریز یخ، استفاده می‌شود (ساری-اوزکان و همکاران ۲۰۱۲). قندهای نفوذناپذیر برای دهیدراسیون سلول قبل از انجماد می‌توانند مورد

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، رقیق-کننده‌ی حاوی ۷۵ میلی‌مولار رافینوز بیشترین و گروه شاهد کمترین درصد اسپرم‌های زنده را نشان دادند ($P < 0.05$). جعفرآوغلی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که استفاده از ۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز بیشترین درصد اسپرم‌های زنده و سطح ۵۰ میلی‌مولار درصد اسپرم‌های کمتری نسبت به ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار دارند. در بین سطوح مختلف رافینوز غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (رقیق‌کننده با فشار اسمزی بالا) و غلظت ۵۰ میلی‌مولار (رقیق‌کننده با فشار اسمزی پایین) درصد اسپرم‌های زنده کمتری داشتند، ولی سطح ۷۵ میلی‌مولار بالاترین درصد اسپرم‌های زنده را داشت. گفته شده رافینوز به صورت غیر مستقیم موجب کاهش تنش اکسیداتیو می‌شود و به عنوان یک علامت‌دهنده و تحریک تولید حذف‌کننده‌های اختصاصی ROS^۱ عمل می‌کند. قندهای نفوذناپذیر در سلول‌های پستانداران مانع از تغییرات برگشت‌ناپذیر در غشای سلول شده و موجب ثبات غشای دولایه در فرایندهای انجماد و ذوب می‌شوند (تانسر و همکاران ۲۰۱۱). استفاده از ۱۰-۵ میلی‌مولار رافینوز در بز آنقوره اثر حفاظت‌کنندگی نشان داد و موجب حفاظت آکروزوم و تمامیت DNA در برابر آسیب‌های انجمادی و کاهش سطح مالون‌دی‌آلدهید گردید (تانسر و همکاران ۲۰۱۰). رقیق‌کننده با فشار اسمزی بالا (۴۰۰-۲۰۰ mOsm) حین فرایند خنک‌سازی اثر کشنده‌ای روی اسپرم قوچ می‌گذارد و این آسیب در مرحله‌ی انجماد و ذوب آشکار می‌شود (آیسن و همکاران ۲۰۰۲).

۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز (Merck ۶۴۲۷۱، آلمان) غنی-سازی شده و یک گروه به عنوان گروه شاهد (بدون رافینوز) در نظر گرفته شد. رقیق‌سازی برحسب غلظت اسپرم با نسبت ۱ به ۶ انجام گرفت. پس از رقیق‌سازی در دمای 37°C از هر نمونه ۱۵ پایت فرانسوی ۰/۲۵ میلی‌لیتر پر شده سپس به مدت ۹۰ دقیقه در یخچال تا دمای 5°C خنک شد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در ۶-۴ سانتی‌متری بالای نیتروژن مایع منجمد شده و در داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شد (روش انجماد آهسته). نمونه‌ها هر روز و به مدت ۱۵ روز در حمام آب ۳۶-۳۸ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه یخ‌گشایی شدند. و برای صفاتی چون درصد اسپرم‌های مرده و غیرطبیعی، تحرک کلی و حرکت پیش‌رونده ارزیابی شدند. برای اندازه‌گیری میزان تحرک و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، یک قطره از نمونه اسپرم رقیق شده را بر روی لام قرار داده و بر روی آن یک لامل گذاشته تا نمونه بطور یکنواخت در زیر سطح لامل پخش شود. آنگاه با استفاده از بزرگ‌نمایی $\times 40$ میکروسکوپ نوری با بررسی چند ناحیه از لامل درصد تحرک و اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند مشخص گردید. برای اندازه‌گیری درصد اسپرم‌های زنده و غیرطبیعی از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده گردید.

تجزیه آماری

اسپرم‌گیری دو بار در هفته و به مدت ۹ هفته انجام شد. پس از جمع‌آوری داده‌ها به کمک مدل Mixed نرم‌افزار SAS (2003) آنالیز شد ($P < 0.05$). تأثیر ۹ هفته زمان نمونه‌گیری در مدل اولیه لحاظ شد ولی چون معنی‌دار نبود، به همین دلیل در مدل آماری نهایی حذف شد.

نتایج و بحث

مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف رافینوز بر فراسنجه‌های کیفیت اسپرم منجمد یخ‌گشایی شده در صد اسپرم‌های زنده

¹. Reactive oxygen species

درصد تحرک

مقایسه‌ی درصد تحرک (جدول ۱) سطوح مختلف قند رافینوز نشان داد سطح ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار بیشترین درصد تحرک و سطح ۱۰۰ میلی‌مولار و گروه شاهد کمترین درصد تحرک را داشتند ($P < 0/05$). نتایج حاصل از این قند با گزارش‌های جعفرآوغلی و همکاران (۲۰۱۱)، یاماشیرو و همکاران (۲۰۱۱) (برای درصد تحرک بین سطوح مختلف رافینوز تفاوت معنی‌داری گزارش نکردند) و همچنین تانسر و همکاران (۲۰۱۰) (که نشان داند غلظت ۲/۵ میلی‌مولار رافینوز بهتر از غلظت ۱۰ میلی‌مولار موجب حفظ درصد تحرک در بز آنقوره می‌شود) همخوانی نداشت. باید خاطر نشان شد که مطالعات ما با این مطالعات در نوع رقیق‌کننده، نژاد، گونه و روش آزمایش متفاوت بود که می‌تواند منشأ این اختلافات باشد. محیط‌های پرتونیک با کاهش محتویات

آب داخل سلولی موجب مهار برگشت‌پذیر تحرک می‌شود. می‌توان گفت به دلیل از دست دادن آب آزاد داخل سلولی اصطکاک افزایش یافته و این موجب مهار لغزش رشته‌های میکروتوبول و یا دیگر عناصر ساختاری در تاژک می‌شود (ولدرز و همکاران ۱۹۹۷).

درصد حرکت پیشرونده

مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده (جدول ۱) سطوح مختلف قند رافینوز نشان داد سطح ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار بیشترین درصد حرکت پیشرونده و سطح ۱۰۰ میلی‌مولار و گروه شاهد کمترین درصد را داشتند ($P < 0/05$). تانسر و همکاران (۲۰۱۰) از سه سطح رافینوز برای رقیق‌سازی منی بز آنقوره استفاده کردند که سطح ۱۰ میلی‌مولار بهتر از ۵ و ۲/۵ میلی‌مولار موجب بهبود درصد حرکت پیشرونده شد ولی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

جدول ۱- مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف قند رافینوز با گروه شاهد بر فراسنجه‌های کیفیت اسپرم

درصد اسپرم‌های رقیق‌کننده	درصد اسپرم‌های زنده	درصد تحرک	درصد حرکت پیشرونده	درصد اسپرم‌های غیرطبیعی
۱۰۰ میلی‌مولار	۷۴/۵۱±۰/۸۴ ^{ab}	۴۳/۳۰±۱/۳۹ ^b	۳۸/۰۳±۱/۳۹ ^b	۸/۵۸±۰/۳۲ ^b
۷۵ میلی‌مولار	۷۵/۴۷±۰/۸۳ ^a	۵۰/۵۵±۱/۳۶ ^a	۴۵/۹۳±۱/۳۶ ^a	۸/۹۳±۰/۳۱ ^b
۵۰ میلی‌مولار	۷۳/۳۲±۰/۷۶ ^b	۵۲/۸۴±۱/۳۳ ^a	۴۵/۹۸±۱/۳۳ ^a	۹/۶۵±۰/۳۱ ^a
شاهد	۷۰/۷۶±۰/۸۸ ^c	۴۱/۱۸±۱/۳۸ ^b	۳۵/۴۱±۱/۳۸ ^b	۹/۷۸±۰/۳۲ ^a

*حروف غیر مشابه در ستون‌ها نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$).

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی

رقیق‌کننده‌ی حاوی ۱۰۰ و ۷۵ میلی‌مولار رافینوز کمترین و رقیق‌کننده‌ی حاوی ۵۰ میلی‌مولار رافینوز و گروه شاهد بیشترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را دارا بودند ($P < 0/05$). که با گزارش جعفرآوغلی و همکاران (۲۰۱۱) که ۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز نسبت به ۵۰ میلی‌مولار اسپرم‌های غیرطبیعی را بیشتر کاهش می‌دهد همخوانی داشت. و همچنین با نتایج تانسر و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند با افزایش غلظت

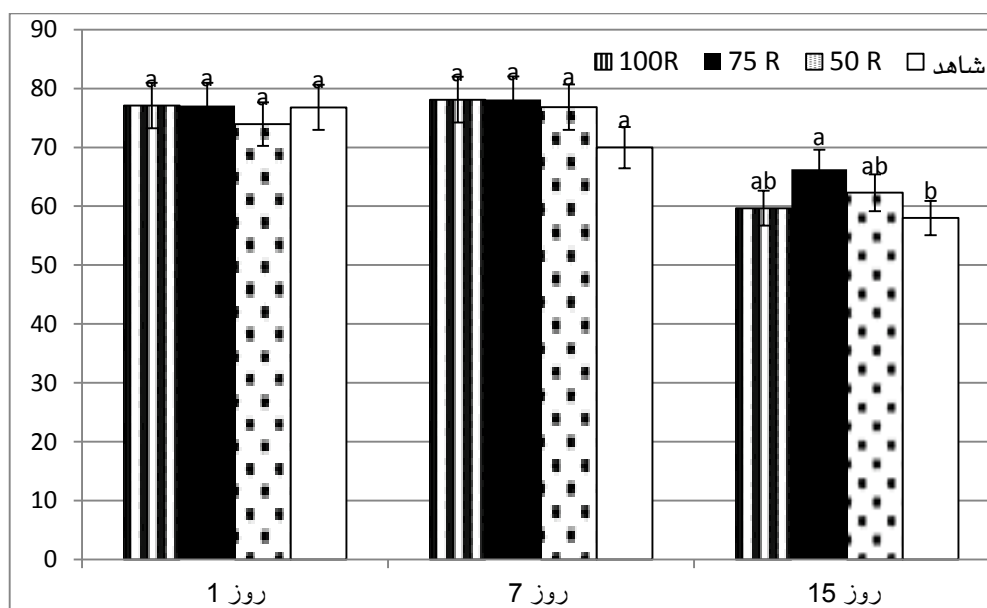
رافینوز میزان اسپرم‌های غیرطبیعی در بز کاهش می‌یابد مطابقت داشت.

مقایسه‌ی رقیق‌کننده‌های مختلف در روزهای مختلف ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده

مقایسه درصد اسپرم‌های زنده فقط در روزهای ۱، ۷ و ۱۵ در شکل ۱ نشان داده شده‌است. نتایج حاصل نشان داد که گروه شاهد در روزهای اول درصد اسپرم‌های زنده‌ی بالایی داشت به طوری که تفاوت معنی‌داری با

بود. ساری اوزکان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که استفاده از قندها اثر مفیدی روی تحرک، ریخت شناسی و یکپارچگی DNA اسپرم موش صحرایی در برابر آسیب فرایند سردسازی می‌گذارد و رافینوز اثر محافظتی قوی‌تری نسبت به ترهالوز و فروکتوز در حفظ تحرک اسپرم دارد. رافینوز یک ترکیب تری- ساکارید نفوذناپذیر بوده که در نگهداری فشار اسمزی مهم بوده، بنابراین به عنوان محافظت‌کننده عمل می‌کند (تائسر و همکاران ۲۰۱۰).

گروه‌هایی که حداکثر اسپرم‌های زنده را داشتند نشان داد، ولی با افزایش روزهای نگهداری مخصوصاً در روزهای آخر کمترین درصد اسپرم‌های زنده را داشت. پس می‌توان گفت، ممکن است غنی‌سازی رقیق‌کننده با قند رافینوز موجب بهبود درصد اسپرم‌های زنده در نگهداری دراز مدت می‌شود. سطح ۷۵ میلی‌مولار رافینوز برای بهبود درصد اسپرم‌های زنده مؤثرتر از سایر سطوح عمل کرد. مقایسه‌ی روز اول و روز آخر اکثر گروه‌ها با هم معنی‌دار بود و درصد اسپرم‌های زنده در روز آخر به طور معنی‌داری کمتر از روز اول



شکل ۱-مقایسه درصد اسپرم‌های زنده در رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف رافینوز و گروه شاهد در روزهای اول، هفتم و پانزدهم حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

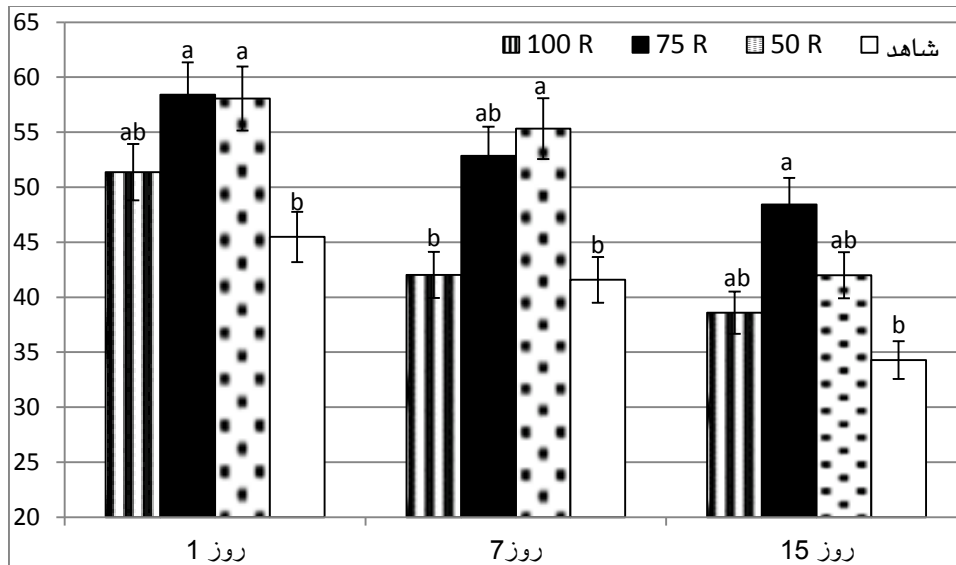
درصدتحرک

نگهداری درصد اسپرم‌های متحرک در گروه شاهد به- طور معنی‌دار کمتر از رقیق‌کننده‌های حاوی ۷۵ و ۵۰ میلی‌مولار بود. ولی سطح ۱۰۰ میلی‌مولار در روزهای مورد ارزیابی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد. آسیب اسیدهای چرب ماتریکس موجب از دست دادن یکپارچگی غشا، تخریب غشا در نتیجه‌ی فاز انتقال

مقایسه درصد تحرک در روزهای اول، هفتم و پانزدهم در شکل ۲ نشان داده شده‌است. نتایج نشان داد که سطح ۷۵ و ۵۰ میلی‌مولار در اکثر روزها بیشترین درصد تحرک را داشتند و تفاوت معنی‌داری با سطح ۱۰۰ میلی‌مولار و گروه شاهد داشتند و با افزایش روزهای

همکاران (۲۰۱۱).

غشا، کاهش تحرک، از دست دادن باروری و تخریب DNA از طریق تنش اکسیداتیو می‌گردد (تانسر و

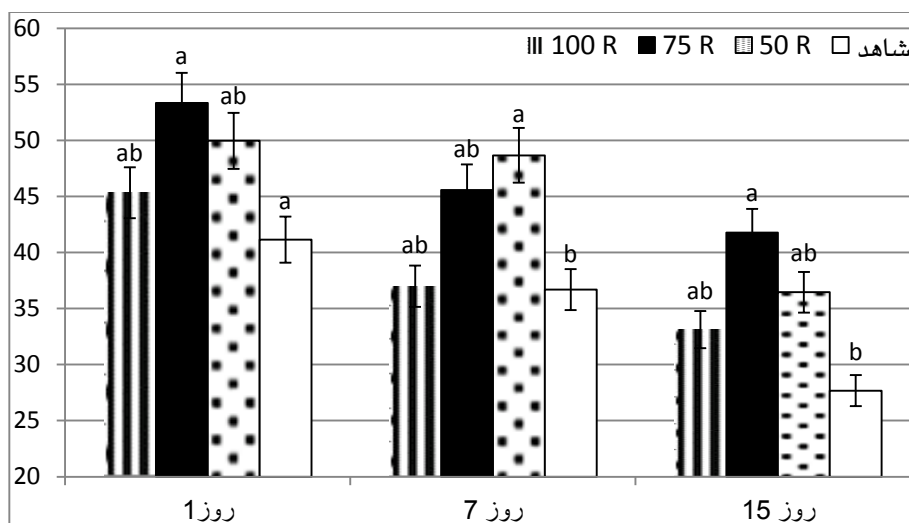


شکل ۲- مقایسه درصد تحرک در رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف قند با گروه شاهد در روزهای اول، هفتم و پانزدهم حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

سطح ۱۰۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد. با افزایش روزهای نگهداری درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده در گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کمتر از رقیق‌کننده‌های حاوی ۷۵ و ۵۰ میلی‌مولار بود.

درصد حرکت پیشرونده

مقایسه درصد حرکت پیشرونده در روزهای ۱، ۷ و ۱۵ در شکل ۳ نشان داده شده است. مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده در اکثر روزها نشان داد که سطح ۵۰ و ۷۵ میلی‌مولار بیشترین درصد حرکت پیشرونده را دارا بودند و تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشتند، ولی

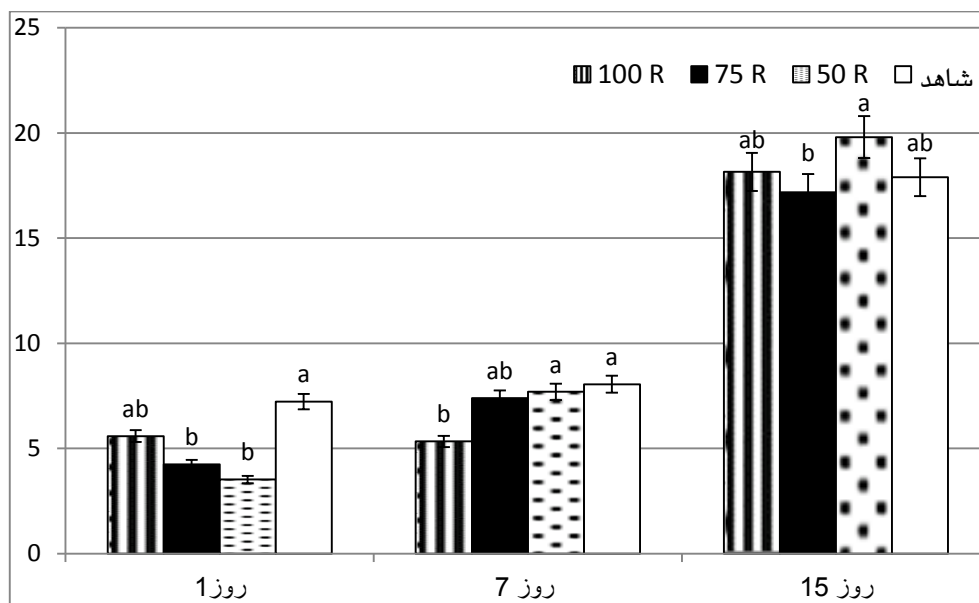


شکل ۳- مقایسه درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیشرونده در رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف قند با گروه شاهد در روزهای اول، هفتم و پانزدهم

حاوی سطوح مختلف قند رافینوز تفاوت معنی‌داری و جود نداشت. ولی در کل درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در رقیق‌کننده‌ی استفاده شده در این تحقیق پایین بود (شکل ۴).

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در اکثر روزهای نگهداری در گروه ۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز کمتر از دیگر سطوح بود. در اکثر روزها بین گروه شاهد با رقیق‌کننده‌های



شکل ۴- مقایسه درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در رقیق‌کننده‌ی حاوی سطوح مختلف قند با گروه شاهد در روزهای اول، هفتم و پانزدهم

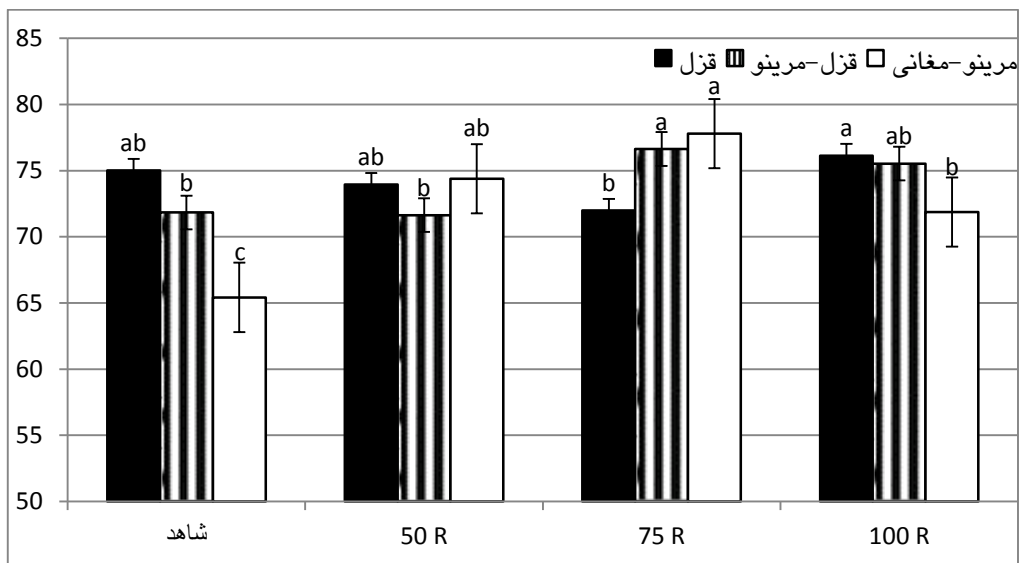
حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

پاسخ اسپرم به حفاظت‌کننده‌ها در بین نرهای یک گونه و نیز گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. به طور کلی اسپرم نشخوارکنندگان کوچک نسبت به انجماد در مقایسه با دیگر گونه‌ها متفاوت می‌باشد (کوچوک و همکاران ۲۰۱۴). اثرات استفاده از قند روی قابلیت زیست اسپرم پس از یخ‌گشایی به علت تفاوت‌های فیزیکی و شیمیایی ترکیبات اسپرم در بین گونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تفاوت‌های مشاهده شده در ویژگی‌های منی ممکن است در نتیجه‌ی فاکتورهای مختلف مانند تفاوت‌های گونه‌ای و فردی، دمای نگهداری، نوع بافر، نسبت سردسازی و ترکیبات رقیق‌کننده مانند حضور حفاظت‌کننده‌ها بستگی داشته باشد (ناینینگ و همکاران ۲۰۱۰).

مقایسه‌ی رقیق‌کننده‌های مختلف در نژادهای مختلف

درصد اسپرم‌های زنده

مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های زنده بین نژادهای قزل مرینوس- قزل- مرینوس ($74/38 \pm 0/67$)، قزل- مرینوس ($74/00 \pm 0/77$) و مرینوس- مغانی ($72/36 \pm 0/76$) معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). در حالیکه برای نژاد قزل ۱۰۰ میلی‌مولار رافینوز بیشترین و ۷۵ میلی‌مولار رافینوز کمترین درصد اسپرم‌های زنده را نشان داد ($P < 0/05$). در قوچ-های قزل- مرینوس سطح ۷۵ میلی‌مولار بیشترین و ۵۰ میلی‌مولار کمترین درصد اسپرم‌های زنده را دارا بودند و تفاوت معنی‌داری باهم داشتند ($P < 0/05$). برای نژاد مرینوس- مغانی سطح ۷۵ میلی‌مولار بیشترین و گروه شاهد کمترین درصد اسپرم‌های زنده را نشان دادند ($P < 0/05$). نتایج این بخش در شکل ۵ آورده شده است.

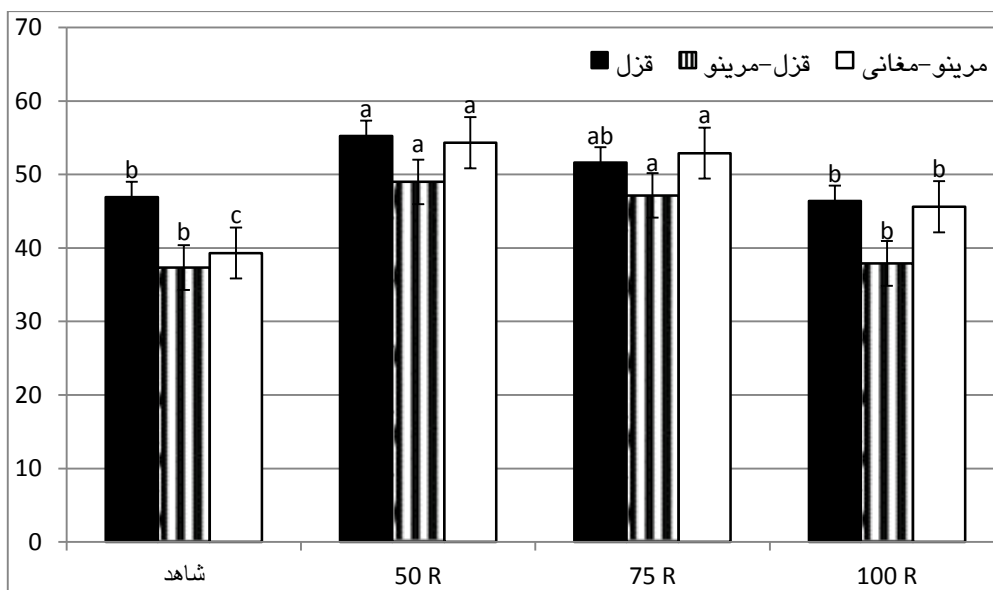


شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین‌های حداقل مربعات، درصد اسپرم‌های زنده در نژاد های مختلف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

درصد تحرک

کمترین درصد تحرک را نشان دادند ($P < 0.05$). در قوچ-های قزل-مرینوس و مرینوس-مغانی ۵۰ میلی‌مولار بیشترین و گروه شاهد کمترین درصد تحرک را نشان دادند ($P < 0.05$). تفاوت در روش آزمایش، گونه حیوان و تفاوت‌های فردی ممکن است علت تفاوت مشاهده شده در حساسیت اسپرم توسط تنش اکسیداتیو باشد (بوکاک و همکاران ۲۰۰۸).

مقایسه‌ی درصد تحرک بین نژادهای مختلف (شکل ۶) تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). تفاوت قزل معنی‌دار نبود ولی تفاوت این دو با قزل-مرینوس (50.03 ± 1.44) با مرینوس-مغانی (48.03 ± 1.68) معنی‌دار بود ($P < 0.05$). برای نژاد قزل سطح ۵۰ میلی‌مولار بیشترین و سطح ۱۰۰ میلی‌مولار

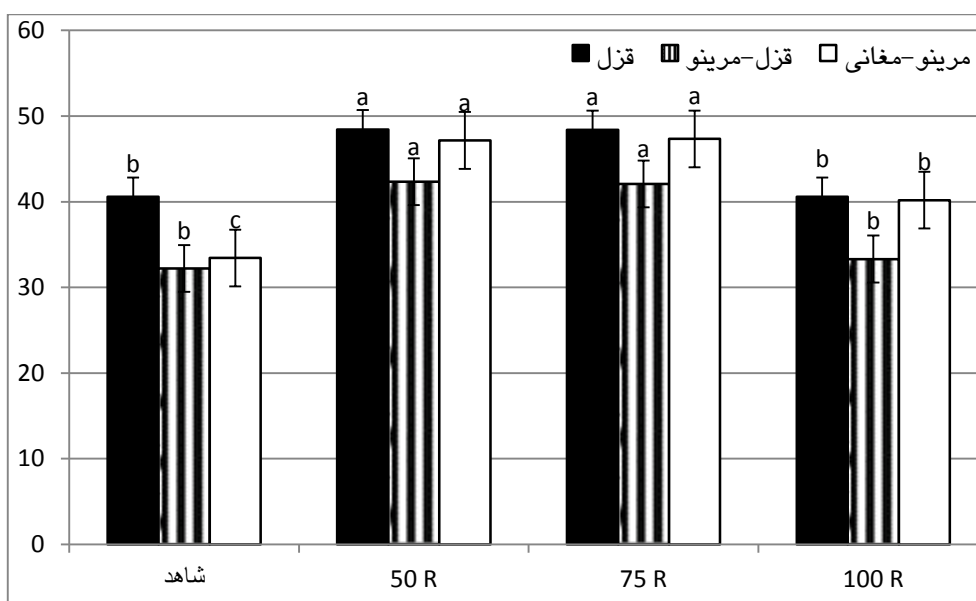


شکل ۶- مقایسه‌ی میانگین‌های حداقل مربعات، درصد تحرک در نژاد های مختلف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

درصد حرکت پیشرونده

مقایسه‌ی درصد حرکت پیشرونده بین نژادهای مختلف (شکل ۷) تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). تفاوت قزل ($44/50 \pm 1/48$) با مریوس-مغانی ($42/03 \pm 1/73$) معنی‌دار نبود ولی با قزل-مریوس ($37/48 \pm 1/71$) معنی‌دار بود. همچنین تفاوت بین مریوس-مغانی با قزل-مریوس معنی‌دار نبود. برای نژاد قزل و قزل-مریوس سطح ۵۰ میلی‌مولار بیشترین و گروه شاهد

کمترین درصد حرکت پیشرونده را نشان داد ($P < 0.05$). همین‌طور در قوچ‌های مریوس-مغانی سطح ۷۵ میلی-مولار بیشترین و گروه شاهد کمترین درصد حرکت پیشرونده را نشان دادند ($P < 0.05$). کاسیمانیکام و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند نژاد قوچ درصد حرکت پیشرونده‌ی منی ذخیره شده در دمای 4°C را تحت تأثیر قرار داد.

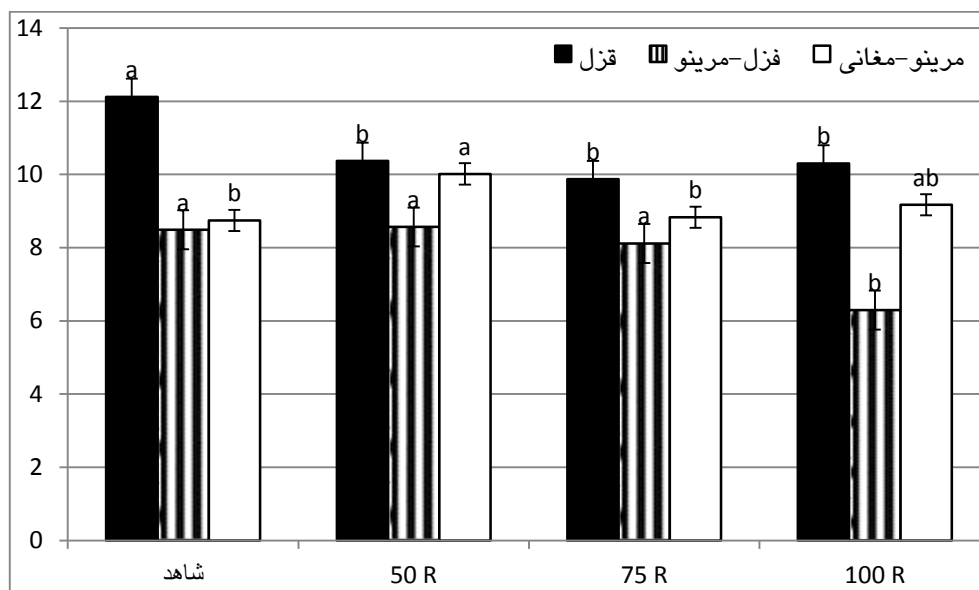


شکل ۷- مقایسه‌ی میانگین‌های حداقل مربعات، درصد حرکت پیشرونده در نژادهای مختلف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی

مقایسه‌ی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی بین نژادهای مختلف (شکل ۸) تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). نژاد قزل ($10/76 \pm 0/39$) بیشترین و قزل-مریوس ($7/86 \pm 0/47$) کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نشان دادند تفاوت بین قوچ‌های مریوس-مغانی ($9/19 \pm 0/47$) با قزل و قزل-مریوس معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در نژاد قزل گروه شاهد بیشترین و سطح ۷۵ میلی‌مولار کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نشان دادند. در نژاد قزل-مریوس ۵۰ میلی‌مولار

بیشترین و ۱۰۰ میلی‌مولار کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را دارا بودند. در گروه مریوس-مغانی ۵۰ میلی‌مولار رافینوز بیشترین و شاهد کمترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را نشان دادند ($P < 0.05$). در کل درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در رقیق‌کننده‌ی استفاده شده در این تحقیق پایین بود. این اختلافات احتمالاً به این علت می‌باشد که پاسخ اسپرم نژادهای مختلف و حتی تفاوت فردی بین قوچ‌ها به انجماد متفاوت می‌باشد (تانسر و همکاران ۲۰۱۱).



شکل ۸- مقایسه‌ی میانگین‌های حداقل مربعات، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در نژاد های مختلف حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی معنی‌داری در سطح ۵٪ می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج مطلوب بدست آمده از ارزیابی اسپرم منجمد در مدت پانزده روز و بقای اسپرم با ویژگی‌های مناسب از نظر قابلیت زیست و درصد تحرک، می‌توان اسپرم قوچ را به مدت طولانی با هدف استفاده در تلقیح مصنوعی نگهداری کرد. همچنین نتایج نشان داد که قند رافینوز سبب بهبود ویژگی اسپرم منجمد شده و

نیز قابلیت نگهداری اسپرم نژاد قزل به صورت منجمد با افزودن این قند بهتر از نژادهای آمیخته بوده‌است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات و همکاری‌های جناب آقای مهندس حبیب چراغی و مهندس حسین احمدیان که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Aisen EG, Medina VH, and Venturino A, 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57(7): 1801-1808.
- Badr MR, Abdelmalak MG, and Hassan MH, 2010. Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. *J Reprod and Infert* 1: 50-57.
- Barbas JP and Mascarenhas RD, 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking* 10(1): 49-62.
- Bucak MN, Keskin N, Taşpınar M, Çoyan K, Başpınar N, Cenariu M C, Bilgili A, Ozturk C and Kurşunlu AN, 2013. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 67(1): 34-39.
- Bucak MN, Ateşşahin A and Yüce A, 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research* 75 (2): 128-134.
- Gholami M, Faraji Z and Zamiri MJ, 2012. Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian J Vet Res* 13 (1): 23-27.

- Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A and Zamiri M J, 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research* 96(1): 58-63.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer K D and Dascanio JJ, 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 C. *Anim reprod scien* 101(1): 60-73.
- Küçük N, Aksoy M, Uçan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A and Serin İ, 2014. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology* 68(3): 327-331.
- Naing SW, Wahid H, Mohd Azam K, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T and San, MM, 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim reprod scien* 122(1): 23-28.
- Pérez GO, Juárez-Mosqueda MDL, Carvajal SU, and Ortega MET, 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58(3): 287-292.
- Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, and Blackburn, HD, 2010. The fertility of ram sperm held for 24h at 5° C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Scien* 118(2): 231-235.
- Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan, I, Sagirkaya, H, Gunay U, and Ak K, 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy* 51(2): 241.
- Sarıözkan S, Bucak MN, Canturk F, Özdamar S, Yay A, Tuncer PB, Ozkan S, Sorgucu N and Caner, Y, 2012. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4° C. *Cryobiology* 65(2): 93-97.
- Tuncer PB, Sarıözkan S, Bucak MN, Ulutaş PA, Akalın PP, Büyükleblebici S and Canturk F, 2011. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology* 75(8): 1459-1465.
- Tuncer PB, Bucak MN, Sarıözkan S, Sakin F, Yeni D, Çiğerci İH, Ateshahin A, Avdatek F, Gundoghan M and Büyükleblebici O, 2010. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircusancryrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. *Cryobiology* 61(1): 89-93.
- Woelders H, Matthijs A and Engel B, 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35(2): 93-105.
- Yamashiro H, Wando JR, Okoth E, Sugimura S, Moisyadi S, Sato E, Rege EO and Mwai, A O, 2011. A case study on cryopreservation of African sheep semen for the Red Maasai, Dorper breeds and their crosses. *African J Agricul Rese* 6(4): 844-848.

The effect of adding different raffinose concentrations in the diluents in semen cryopreservation of different breeds of ram at the reproductive season

P Dolati Doorbash¹, Gh Moghaddam^{2*}, H Daghighkia³, A Taghizadeh², SA Rafat³

Received: January 18, 2015 Accepted: May 05, 2015

¹ MSc Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

² Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³ Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: Ram semen has proven to be more difficult to cryopreserve than semen of other farm animals. Cryopreservation, adversely the cryosurvive of spermatozoa, leads to reduction of sperms fertile life. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the effect of supplementation of diluent with different raffinose concentrations in the cryopreservation of three breeds of ram semen during reproductive season. **METHODS:** Ejaculate samples were collected from 3Ghezel, 2Ghezel-Merinos and 2Merinos-Moghani rams using artificial vagina. Samples immediately were transported to the laboratory and a primary evaluation was done at 37°C. Semen samples were diluted with a Tris-based extender complemented with 50, 75, 100 mM raffinose and an extender containing no raffinose as a control group. Semen samples were aspirated into 0.25 ml straws, cooled to 5°C and after frozen finally stored in liquid nitrogen. **RESULTS:** Achieved result showed that the highest percentage of alive sperms belonged to 75 mM raffinose (75.47±0.83) and the lowest to control groups (70.76±0.88). The highest percentage of motility and progressive motility were observed in raffinose 50 mM (52.84±1.33 and 45.98±1.33 respectively), while the control group had the lowest percentage of motile sperm and progressive motility (41.18±1.38 and 35.41±1.38 respectively). Percentage of abnormal sperm in 100 and 75 mM Mraffinose (8.58±0.32 and 8.93±0.31) was the lowest and the control group (9.78±0.32) had the highest percentage of abnormal sperm (P<0.05). **CONCLUSIONS:** This study showed that raffinose improved cryopreservation of ram semen. Also the highest percentage of alive sperms, motility and progressive motility were observed in the Ghezel rams and the lowest percentage of abnormal sperm recorded in Ghezel-merinos rams. This study showed that raffinose improved cryopreservation of ram semen. Also preservation capacity of Ghezel rams were better than the other breeds.

Keywords: Raffinose, Reproductive season, Frozen semen, Ram breeds