نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد ششم، شماره دوم، ۱۳۹۷
http://ejrr.gau.ac.ir

اثرات سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌های مختلف بر ویژگی‌های منی قوچ دالاق پس از یخ‌گشایی

سولماز پهملی[1]، *یوسف مصطفی‌لو[2]، فرید مسلمی‌پور[2] و آشورمحمد قره‌باش[2]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱٤

چکیده

سابقه و هدف: یکی از فناوری‌های مهم برای نگهداری ذخایر ژنتیکی، انجماد منی است. از آنجایی که انجماد باعث کاهش باروری اسپرم می‌شود، افزودن موادی به منی که باروری آن را حفظ کند، مهم می‌باشد. از ابتدای بکارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده‌های مختلفی جهت نگهداری منی در شرایط مایع و انجماد استفاده شده است. بنابراین هدف این پژوهش، بررسی افزودن سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌های شیر، تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-لسیتین سویا بر ویژگی‌های منی قوچ پس از انجماد و یخ‌گشایی بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های منی از چهار رأس قوچ دالاق بالغ جمع‌آوری و در رقیق‌کننده‌های مختلف، رقیق‌سازی شده و سپس رافینوز به آن افزوده شد. نمونه‌های منی در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری شدند و به‌مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد خنک و سپس در نیتروژن مایع منجمد گردیدند. پایوت‌های منجمد شده برای ذخیره‌سازی به تانک حاوی نیتروژن منتقل شدند. پس از یخ‌گشایی فراسنجه‌های کیفی اسپرم‌ها شامل درصد تحرک پیش‌رونده اسپرم، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل ۳×٤ با آرایش کاملا تصادفی انجام شد. تیمارها شامل چهار سطح رافینوز (صفر، ٦۰، ۷۰ و ۸۰ میلی‌مولار) و سه نوع رقیق‌کننده (شیر، تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-لسیتین سویا) بودند. داده‌های به دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم افزار آماری SAS (مدل ۹/۱) با رویه ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱ درصد انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تأثیر افزودن رافینوز بر تحرک پیش‌رونده و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). ولی بر درصد سلامت غشاء و درصد اسپرم با مورفولوژی طبیعی تاثیر معنی‌دار نداشت. تأثیر رقیق‌کننده‌ها بر درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشاء و اسپرم با مورفولوژی طبیعی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). اثر متقابل سطوح رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد تحرک پیش‌رونده، سلامت غشاء و مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها معنی‌دار بود ولی بر درصد زنده‌مانی تاثیر معنی‌دار نداشت. بیشترین تحرک پیش‌رونده اسپرم (۲/۰۹±۳۵/۰۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ حاوی ٦۰ میلی‌مولار رافینوز به دست آمد. بیشترین زنده‌مانی اسپرم (۱/۸۸±۷٤/٤۰ درصد) در سطح ۸۰ میلی‌مولار رافینوز بود ولی بیشترین درصد سلامت غشاء (۲/٦۰±٦٦/٤۰ درصد) در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ حاوی صفر میلی‌مولار رافینوز مشاهده شد. بیشترین درصد اسپرم طبیعی (۲/۸۲±۷٤/۸۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس-لسیتین سویا حاوی ٦۰ میلی‌مولار رافینوز به‌دست آمد.

*نویسنده مسئول: mostafaloo@yahoo.com

نتیجه‌گیری: یافته‌های تحقیق نشان داد که خصوصیات اسپرم شامل درصد تحرک پیش‌رونده و اسپرم طبیعی در سطح ٦٠ میلی‌مولار رافینوز، سلامت غشاء در تیمار شاهد و زنده‌مانی در سطح ٨٠ میلی‌مولار بهتر حفظ شد. از طرفی، رقیق‌کننده تریس- زرده تخم‌مرغ نسبت به شیر و تریس- لسیتین سویا تاثیر بیشتری بر حفظ ویژگی‌های اسپرم قوچ داشت.

واژه‌های کلیدی: محافظت سرمایی، رافینوز، رقیق‌کننده منی، باروری، قوچ

مقدمه

یکی از فناوری‌های مهم برای حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی، انجماد اسپرم است. با این حال انجماد باعث آسیب به اسپرم شامل کاهش جنبایی، زنده‌مانی و آسیب به غشاء و DNA اسپرم می‌شود (١٧ و ٢٩).

از مزایای منجمد کردن اسپرم قوچ می‌توان به بارور نمودن همزمان تعداد زیادی میش با استفاده از اسپرم قوچ‌های با نژاد برتر، انتقال آسان مایع منی از مرکز تولید و جمع‌آوری به دورترین دامداری‌ها، ذخیره ژن‌ها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر بفرد اشاره نمود. با این حال استفاده از این روش در گوسفند با مشکلاتی از جمله بقاء و تحرک کم اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد- ذوب همراه است. بقای اسپرم قوچ پس از انجماد- ذوب متاثر از فاکتورهای متعددی از قبیل نوع و غلظت اجزای مورد استفاده در محیط انجماد مایع منی، غلظت گلیسرول یا سایر مواد محافظ کننده در برابر انجماد، کیفیت روش انجماد-ذوب و همچنین کیفیت مایع منی مورد استفاده برای انجماد است (٨، ٩ و ٢٣).

یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در انجماد منی، محتوا و نوع رقیق‌کننده برای اسپرم قبل از انجماد می‌باشد. رقیق‌کننده معمولا حاوی یک ماده محافظت‌کننده از سرما و مواد افزودنی مغذی می‌باشد که اسپرم را در حین انجماد و ذوب محافظت می‌نماید (٢٠). از ابتدای بکارگیری تکنیک تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده‌های مختلفی جهت نگهداری منی در شرایط مایع و انجماد استفاده شده است. محققین استرالیایی پس از مقایسه تعدادی از رقیق‌کننده‌های اسپرم قوچ، استفاده از بافر تریس، فروکتوز و زرده تخم‌مرغ را برای نگهداری در شرایط مایع و اضافه کردن پنج درصد گلیسرول به بافر تریس را برای نگهداری در شرایط انجماد، پیشنهاد نمودند (٢٤).

رقیق‌کننده‌های مختلفی برای رقیق‌سازی اسپرم قوچ استفاده می‌شود. رقیق‌کننده شیر برای مایع منی قوچ به طور گسترده استفاده می‌شود. پروتئین شیر (کازئین) و لاکتوز از عوامل محافظت‌کننده اسپرم در برابر شوک سرمایی طی فرآیند انجماد-ذوب می‌باشند (٢٢). زرده تخم‌مرغ اثر مفیدی بر انجماد اسپرم به عنوان محافظ غشاء پلاسمایی و آکروزوم در برابر آسیب‌های مربوط به تغییر درجه حرارت دارد. فسفولیپیدها، کلسترول و لیپوپروتئین‌های با چگالی کم در زرده تخم‌مرغ فاکتورهایی هستند که باعث حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی در فرآیند انجماد -ذوب می شوند (٢).

با وجود اینکه زرده تخم‌مرغ به دلیل داشتن لیپوپروتئین با چگالی کم بیشترین کاربرد را به‌عنوان رقیق کننده دارد اما، به دلیل ممانعت از تنفس و کاهش تحرک اسپرم، استفاده از لسیتین سویا به عنوان منبع لیپوپروتئین‌ها و تأثیر مثبت بر افزایش درصد زنده‌مانی اسپرم و نرخ باروری مورد توجه قرار گرفته است. یافته‌ها نشان داد که استفاده از لسیتین سویا به جای زرده تخم‌مرغ باعث هماهنگی بین اجزای مایع منی و خروج از خطرات بهداشتی می‌شود (٢٦).

لسیتین سویا جایگزین مناسبی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده مایع منی است که حاوی فسفاتیدیل کولین و چند اسید چرب از جمله اسید استئاریک،

اولئیک و پالمیتیک می‌باشد. بنابراین، استفاده از لسیتین سویا به عنوان منبع لیپوپروتئین‌ها در رقیق‌کننده‌های مایع منی مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). قندهای درشت مولکول مانند لاکتوز، رافینوز، تره‌هالوز و دکستران‌ها نمی‌توانند از عرض غشاء پلاسمایی عبور کنند. در نتیجه سبب بالا رفتن فشار اسمزی شده که موجب از دست رفتن آب سلول و کاهش تشکیل یخ داخل سلولی می‌شوند. این قندها با فسفولیپیدها در غشاء پلاسمایی واکنش داده و زنده‌مانی اسپرم منجمد را افزایش می‌دهند (۵).

رافینوز تری ساکاریدی متشکل از گلوکز، فروکتوز و گالاکتوز بوده که از طریق واکنش با غشاء 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 دزوکسی ریبونوکلئیک اسید[2] در برابر آسیب‌های انجمادی می‌گردد (۱ و ٦).

از آنجائی که استفاده از ترکیبات مختلف به‌عنوان رقیق‌کننده اسپرم نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است، بنابراین هدف این تحقیق بررسی اثرات رقیق‌کننده‌های شیر، تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-لسیتین سویا، بر خصوصیات منی قوچ دالاق بود. همچنین اثرات افزودن سطوح مختلف رافینوز (٦۰، ۷۰ و ۸۰ میلی‌مولار) بر خصوصیات منی قوچ دالاق مورد بررسی قرار گرفت. بطور کلی هدف از این طرح بهبود توانایی تحرک و زنده‌مانی اسپرم قوچ دالاق با استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف و افزودن رافینوز در شرایط انجماد بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مایع منی: این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی گوسفند دانشگاه گنبد کاووس در بهار سال ۱۳۹٦ انجام گردید. برای انجام این تحقیق از چهار رأس قوچ دالاق بالغ ۳-۲ ساله با وزن ۸۰-۷۵ کیلوگرم استفاده شد. قوچ‌ها با جیره کاملاً مخلوط از یونجه، کاه گندم، دانه ذرت و سبوس گندم دارای ۲/۳ مگاکالری انرژی متابولیسمی و ۱۲/۵ درصد پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک تغذیه شدند (۱۸). نمونه‌های منی با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی[3] دو بار در هفته جمع‌آوری گردید.

ارزیابی اولیه نمونه منی: نمونه‌های مطلوب به دست آمده از چهار راس قوچ به منظور حذف اثرات فردی با یکدیگر مخلوط شدند. پس از نمونه‌گیری، لوله جمع‌آوری منی در فلاسک دارای آب با حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در حداقل زمان ممکن (۲۰-۱۵ دقیقه) به آزمایشگاه منتقل گردیده و بلافاصله مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت. تعیین حجم، غلظت، تحرک، زنده‌مانی، مورفولوژی و تعیین کیفیت ظاهری منی از جمله ارزیابی‌های اولیه می‌باشد که به منظور تعیین نمونه‌های مطلوب انجام می‌شد و در صورت مطلوب نبودن نمونه حذف می‌گردید. برای تعیین حجم منی از لوله‌های درجه‌بندی شده و برای تعیین غلظت نمونه منی از لام هموسیتومتر استفاده شد. برای تعیین درصد تحرک پیش‌رونده ابتدا نمونه منی به نسبت ۱ به ۲۰ با سرم فیزیولوژی (۱ حجم نمونه منی و ۲۰ حجم سرم فیزیولوژی) رقیق شد و سپس یک قطره کوچک از نمونه رقیق شده بر روی لام تمیز گرم ریخته و یک لامل تمیز بر روی آن قرار داده شد و با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤۰× میکروسکوپ نوری در چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیشرونده داشتند، تعیین گردید (١٤ و ١٦). برای تعیین درصد زنده‌مانی از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده گردید. این محلول رنگ شامل ۱/٦۷ گرم ائوزین، ۱۰ گرم نگروزین، ۲/۹ گرم سدیم سیترات دو آبه در ۱۰۰

2 - Deoxy Ribonucleic Acid (DNA)

3. Electro ejaculator

میلی‌لیتر آب مقطر بود. برای رنگ‌آمیزی یک قطره منی یخ‌گشایی شده در یکی از دو انتهای لام تمیز و گرم شده قرار داده شده و سپس یک قطره رنگ روی آن ریخته می‌شد و گسترش نازکی از آن تهیه گردید. اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند و اسپرم‌های مرده قابل تشخیص می‌باشند و سپس با استفاده از بزرگنمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری درصد زنده‌مانی اسپرم محاسبه شد (٢٢).

برای تعیین درصد اسپرم غیرطبیعی از محلول هانکوک[4] استفاده شد. حجم منی بین ٠/٥ تا ٢ میلی‌لیتر، غلظت بیشتر از $٢/٥\times١٠^{٩}$، تحرک بیش از ٧٠ درصد و مورفولوژی اسپرم غیرطبیعی کمتر از ١٠ درصد در هر انزال به عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته می‌شد. پس از بررسی اولیه و اطمینان از مناسب بودن نمونه‌ها به منظور جلوگیری از اثرات فردی نمونه‌های منی با هم مخلوط شدند.

رقیق‌سازی مایع منی: رقیق‌کننده پایه تریس (252859، Sigma-Aldrich، آمریکا) براساس جدول ١ تهیه شد (٢٠). pH رقیق‌کننده پایه ٦/٨ بود که با دستگاه pH متر اندازه‌گیری گردیده و اسمولاریته آن ٣١٠ میلی‌اسمز بود که با دستگاه اسمومتر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد رقیق‌کننده‌های مختلف تهیه شدند که شامل: ١- شیر پاستوریزه و هموژنیزه کم‌چرب ٢- محیط پایه تریس حاوی ١٦ درصد (حجمی/ حجمی) زرده تخم‌مرغ و ٣- محیط پایه تریس حاوی ١ درصد لسیتین سویا بود. سپس چهار سطح مختلف (صفر، ٦٠، ٧٠ و ٨٠ میلی‌مولار) قند رافینوز (6107549، Sigma-Aldrich، آمریکا) به لوله‌های حاوی رقیق‌کننده‌ها اضافه شدند. نمونه‌های منی بعد از مخلوط شدن به سه قسمت مساوی تقسیم شدند و در هر قسمت با رقیق‌کننده‌های مذکور به نسبت ١ به ٢٠ (١ حجم نمونه منی و ٢٠ حجم رقیق‌کننده) رقیق گردیدند. رقیق‌سازی در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم انجام شد. نمونه‌های آزمایشی در پایوت‌های نیم میلی‌لیتری مکیده شدند و انتهای باز آن‌ها توسط خمیر هماتوکریت بسته شد.

انجماد و یخ‌گشایی: پس از اتمام رقیق‌سازی، تمام پایوت‌ها به داخل یخچال (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند و دمای آنها در عرض ٢-١/٥ ساعت از ٣٥ درجه سانتی‌گراد به ٤ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و ٢ ساعت دیگر در همین دما برای رسیدن به تعادل نگهداری شدند. سپس پایوت‌ها ١٠ دقیقه به فاصله ٤ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرار داده و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند و سپس در تانک نیتروژن در دمای ١٩٦- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند و پس از طی زمان ٤٨ ساعت یخ‌گشایی گردیدند، به این صورت که پایوت‌ها در حمام آب گرم ٣٧ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه قرار داده شدند تا نمونه‌ها ذوب شوند و مورد ارزیابی قرار بگیرند. نمونه‌ها از لحاظ درصد تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشاء اسپرم و درصد اسپرم طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی اسپرم پس از یخ‌گشایی: به منظور تعیین درصد تحرک اسپرم‌ها، یک قطره کوچک از نمونه منی یخ‌گشایی شده بر روی لام تمیز گرم شده قرار داده شد و با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری و با بررسی چند ناحیه از لام درصد اسپرم‌هایی که حرکت پیش‌رونده داشتند تعیین شدند (٢٢).

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از محلول رنگ‌آمیزی ائوزین و نگروزین استفاده شد و با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری بررسی گردید. در هر گروه تیماری در چند ناحیه از لام با استفاده از دوربین قرار گرفته روی میکروسکوپ

4. Hancock

عکس گرفته شد و حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید و درصد اسپرم‌های زنده محاسبه شد (۲۲).

برای بررسی یکپارچگی غشاء اسپرم از آزمون هاست[5] استفاده شد. محلول هاست شامل ۰/۷۳۵ گرم سدیم سیترات دو آبه و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. بعد از یخ‌گشایی پایوت‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هاست اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه با تهیه حداقل سه قطره از نمونه انکوبه شده، با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری بررسی گردید. در هر گروه تیماری در چند ناحیه از لام با استفاده از دوربین قرار گرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم طبیعی محاسبه شد. اسپرم غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم در نظر گرفته شد (۱۲).

برای بررسی درصد اسپرم‌های طبیعی از محلول هانکوک استفاده شد. محلول هانکوک شامل ٦٢/٥ میلی‌لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/٦٨٢ گرم سدیم هیدروژن فسفات دو آبه[6] در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم از ۲۲/۲٥٤ گرم فسفات پتاسیم[7] در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی_لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی‌لیتر محلول بافر تهیه می‌شود. برای ارزیابی چند قطره از هر نمونه منی به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر از محلول هانکوک اضافه شد. یک قطره از این محلول روی لام قرار داده شد و لامل به آرامی روی آن قرار گرفت و با استفاده از بزرگ‌نمایی ٤٠× میکروسکوپ نوری بررسی شد. در هر گروه تیماری در چند ناحیه از لام با استفاده از دوربین قرار گرفته روی میکروسکوپ عکس گرفته شد و حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم طبیعی محاسبه شد. اسپرم غیرطبیعی شامل غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب‌های دم در نظر گرفته شد (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل ۳×٤ در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد که فاکتور اول شامل سطوح مختلف رافینوز (صفر، ٦٠، ٧٠ و ۸۰ میلی‌مولار) و فاکتور دوم شامل رقیق‌کننده‌های مختلف (شیر، تریس-زرده تخم‌مرغ و تریس-لسیتین سویا) بود. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS[8] نسخه ۹/۱ (۲۰۰۳) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه ANOVA[9] و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون توکی در سطح خطای ۱ درصد انجام شد. آزمایش به‌صورت ۵ تکرار در هر تیمار انجام شد.

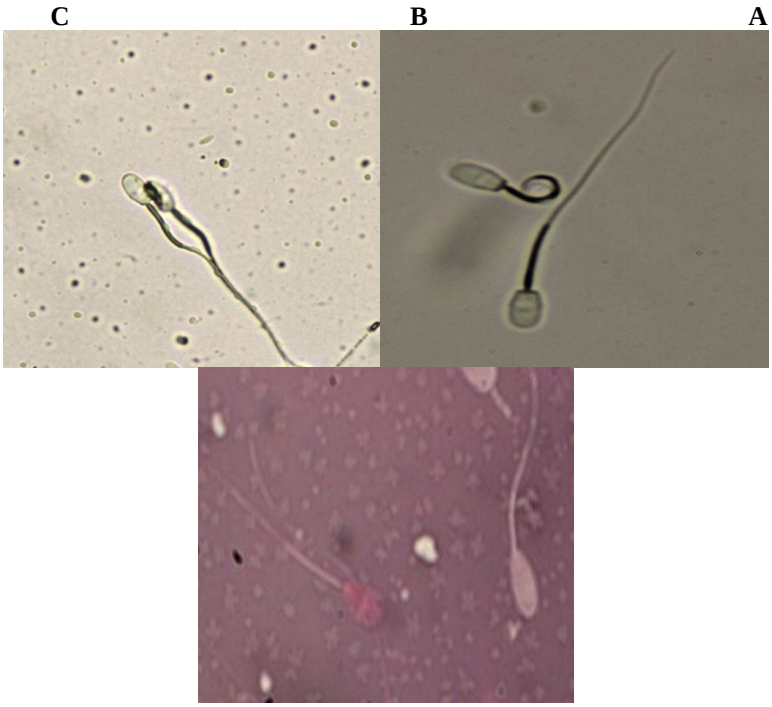
5. Hypo Osmotic Swelling Test (HOST)
6- H_2O_2/Na_2HPO_4
7 - $KHPO_4$

8. SAS, 1996. SAS/STAT Software
9. ANOVA (Analysis of variance)

جدول ١: ترکیب رقیق‌کننده تریس برای نگهداری منی قوچ در شرایط انجماد

Table 1. Tris extender composition for storage of ram semen in frozen condition

در ١٠٠ میلی‌لیتر (The 100 ml)	اجزای رقیق‌کننده (extender components)	
3.876	Tris (g)	تریس (گرم)
0.523	Fructose (g)	فروکتوز (گرم)
2.123	Citric acid (g)	اسید سیتریک (گرم)
16	Chicken egg yolk (mL)	زرده تخم‌مرغ (میلی‌لیتر)
5.3	Glycerol (mL)	گلیسرول (میلی‌لیتر)
100000	Penicillin (IU)	پنی‌سیلین
100	Streptomycin (mg)	استرپتومایسین (میلی‌گرم)
100	Distilled water to volume (mL)	آب مقطر تا حجم (میلی‌لیتر)



شکل ١: ارزیابی میکروسکوپیک نمونه‌ها از نظر زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و طبیعی بودن اسپرم‌ها.

A. رنگ‌آمیزی با ائوزین-نگروزین، اسپرم زنده (راست) و اسپرم مرده (چپ). بزرگنمایی (١٠٠×).

B. اسپرم در محلول هاست، اسپرم با غشاء ناسالم (راست) و اسپرم با غشاء سالم (چپ). بزرگنمایی (٤٠×).

C. اسپرم در محلول هانکوک، اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی (راست) و اسپرم با مورفولوژی طبیعی (چپ). بزرگنمایی (٤٠×).

نتایج

خصوصیات اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی:

درصد اسپرم متحرک (پیشرونده): نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر سطوح مختلف رافینوز بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار بود (P<٠/٠١). بیش‌ترین درصد تحرک اسپرم (٢٩/٣٣ درصد) در سطح ٦٠ میلی‌مولار رافینوز بدست آمد (جدول ٢). تاثیر رقیق‌کننده‌ها نیز بر درصد اسپرم متحرک معنی‌دار بود (P<٠/٠١). بیش‌ترین درصد تحرک اسپرم (٢٩/٧٥ درصد) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ بدست آمد (جدول ٢). اثر متقابل سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم‌های متحرک معنی‌دار بود

(P<۰/۰۱). به‌طور کلی بیش‌ترین درصد تحرک اسپرم (۳۵/۰۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی ٦۰ میلی‌مولار رافینوز بدست آمد و کم‌ترین درصد تحرک (١٤/۰۰ درصد) در رقیق‌کننده شیر حاوی صفر میلی‌مولار رافینوز بدست آمد (جدول ۳).

درصد اسپرم زنده: نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر سطوح مختلف رافینوز بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم زنده (٧٤/٤۰ درصد) در سطح ۸۰ میلی‌مولار رافینوز بدست آمد (جدول ۲). تاثیر رقیق‌کننده‌ها نیز بر درصد اسپرم زنده معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد اسپرم زنده (۷۳/۸۰) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ بدست آمد (جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم‌های زنده معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

درصد سلامت غشاء اسپرم: نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر سطوح مختلف رافینوز بر درصد سلامت غشاء اسپرم معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، اما تاثیر رقیق‌کننده‌ها بر درصد سلامت غشاء اسپرم معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). بیش‌ترین درصد سلامت غشاء (٦۱/۰۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ بدست آمد (جدول ۲). اثر متقابل سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد سلامت غشاء معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). به‌طورکلی بیش‌ترین درصد سلامت غشاء (٦٦/٤۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ حاوی صفر میلی‌مولار رافینوز بدست آمد و کم‌ترین درصد سلامت غشاء (٤٦/٤۰ درصد) در رقیق‌کننده تریس-لسیتین سویا حاوی ۷۰ میلی‌مولار رافینوز بدست آمد (جدول ۳).

درصد اسپرم طبیعی: نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر سطوح مختلف رافینوز بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)، اما تاثیر رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار بود (P<۰/۰۱).

جدول ۲: میانگین ویژگی‌های اسپرم در سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها پس از انجماد و یخ‌گشایی

Table 2. Means of sperm characteristics in different raffinose levels and extenders after freezing and thawing

متغیر Variable	درصد تحرک Motility (%)	درصد زنده‌مانی Viability (%)	درصد سلامت غشاء Membrane integrity (%)	درصد اسپرم طبیعی Normal morphology (%)
سطوح رافینوز (میلی‌مولار) Raffinose levels (mM)				
0	23.00^{b}	64.73^{b}	59.13	58.00
60	29.33^{a}	63.73^{b}	58.46	61.26
70	23.33^{b}	69.06^{ab}	56.33	59.93
80	24.33^{b}	74.40^{a}	55.26	58.33
SE	1.20	1.88	1.50	1.63
P value	0.0016	0.0007	0.2429	0.4687
رقیق‌کننده‌ها (extenders)				
شیر (Milk)	16.75^{b}	64.75^{b}	58.35^{a}	55.90^{b}
تریس- زرده تخم‌مرغ (Tris-chicken egg yolk)	29.75^{a}	73.80^{a}	61.00^{a}	53.55^{b}
تریس-لسیتین سویا (Tris-soybean lecithin)	28.50^{a}	65.40^{b}	52.55^{b}	68.70^{a}
SE	1.04	1.63	1.30	1.41
P value	0.0001	0.0003	0.0001	0.0001

a-b تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۱)

(a-b difference between the numbers in each column, with dissimilar letters is significant) (P<0.01)

بیش‌ترین درصد اسپرم طبیعی (٦٨/٧٠ درصد) در رقیق‌کننده تریس- لسیتین سویا بدست آمد (جدول ٢). اثر متقابل سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر درصد اسپرم طبیعی معنی‌دار بود (P<٠/٠١). بیش‌ترین درصد اسپرم طبیعی (٧٤/٨٠ درصد) در رقیق‌کننده تریس-لسیتین سویا حاوی ٦٠ میلی‌مولار رافینوز بدست آمد و کم‌ترین درصد اسپرم طبیعی (٤٧/٠٠ درصد) در رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ حاوی صفر میلی‌مولار رافینوز بدست آمد (جدول ٣).

جدول ٣: میانگین اثر متقابل سطوح مختلف رافینوز و رقیق‌کننده‌ها بر ویژگی‌های اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی

Table 2. Means interaction of different raffinose levels and extenders on characteristics of sperm after freezing and thawing

درصد اسپرم طبیعی Normal morphology (%)	درصد سلامت غشاء Membrane integrity (%)	درصد زنده‌مانی Viability (%)	درصد تحرک Motility (%)	متغیر Variable
60.60^{b}	53.80^{b}	59.60	14.00^{c}	رافینوز صفر در شیر (Raffinose 0 in lecithin)
47.00^{c}	66.40^{a}	72.20	30.00^{a}	رافینوز صفر در زرده تخم‌مرغ (Raffinose 0 in lecithin)
66.40^{b}	57.20^{b}	62.40	25.00^{b}	رافینوز صفر در لسیتین سویا (Raffinose 0 in lecithin)
53.20^{bc}	57.00^{b}	63.00	19.00^{c}	رافینوز ٦٠ در شیر (Raffinose 60 in milk)
55.80^{bc}	62.20^{ab}	67.60	35.00^{a}	رافینوز ٦٠ در زرده تخم‌مرغ (Raffinose 60 in egg yolk)
74.80^{a}	56.20^{b}	60.60	34.00^{a}	رافینوز ٦٠ در لسیتین سویا (Raffinose 60 in lecithin)
60.60^{b}	61.40^{ab}	70.20	16.00^{c}	رافینوز ٧٠ در شیر (Raffinose 70 in milk)
50.60^{c}	61.20^{ab}	74.60	23.00^{bc}	رافینوز ٧٠ در زرده تخم‌مرغ (Raffinose 70 in egg yolk)
68.60^{ab}	46.40^{c}	62.40	31.00^{a}	رافینوز ٧٠ در لسیتین سویا (Raffinose 70 in lecithin)
49.20^{c}	61.20^{ab}	66.20	18.00^{c}	رافینوز ٨٠ در شیر (Raffinose 80 in milk)
60.80^{b}	54.20^{bc}	80.80	31.00^{a}	رافینوز ٨٠ در زرده تخم‌مرغ (Raffinose 80 in egg yolk)
65.00^{b}	50.40^{bc}	76.20	24.00^{b}	رافینوز ٨٠ در لسیتین سویا (Raffinose 80 in lecithin)
2.82	2.60	3.26	2.09	SE
0.0004	0.0024	0.1931	0.0127	P value

a-c تفاوت اعداد در هر ستون، با حروف غیر مشابه معنی‌دار است (P<٠/٠١)

(a-c difference between the numbers in each column, with dissimilar letters is significant) (P<0.01)

بحث

لیو و همکاران (١٩٩٨) گزارش کردند که رقیق‌کننده‌های حاوی قندهای ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز با ایجاد یک فشار اسمزی و خروج آب از سلول باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی در طی فرآیند انجماد می‌شوند و همچنین این قندها به غشاء پلاسمایی اسپرم نفوذ می‌کنند و با سر

قطبی فسفولیپیدهای غشاء تشکیل پیوند هیدروژنی می‌دهند و در نتیجه از آسیب به لیپید غشاء جلوگیری می‌کنند (۱۵).

ساری اوزکان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که رافینوز برای جلوگیری از تشکیل یخ خارج سلولی، فراهم کردن اسمولالیته بالا و افزایش تشکیل حالت کریستال‌های ریز یخ، استفاده می‌شود (۲۵). همچنین اگکا و همکاران (۲۰۰۲) و استوری و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند، رافینوز مانع تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی و حفظ فشار اسمزی می‌شود (۱ و ۲۷).

در مطالعه‌ای جعفراوغلی و همکاران (۲۰۱۱) اثر افزودن غلظت‌های مختلف (۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) قندهای ساکارز، رافینوز و تره‌هالوز در رقیق‌کننده پایه تریس-زرده تخم‌مرغ بر قدرت باروری اسپرم قوچ را بررسی کردند که همه رقیق‌کننده‌های حاوی قند از نظر کیفیت اسپرم نسبت به گروه شاهد بالاتر بودند. نتایج مطلوب با ۷۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار تره‌هالوز و رافینوز بدست آمد (۱۱). در آزمایشی دولتی دورباش و همکاران (۱۳۹٤) اثر استفاده از سطوح مختلف رافینوز (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار) در نگهداری اسپرم منجمد قوچ را بررسی کردند که افزودن ۷۵ میلی‌مولار رافینوز بیش‌ترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد و تیمارهای دیگر داشتند و کم‌ترین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی در سطح ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌مولار بدست آمد (۷). تانسر و همکاران (۲۰۱۰) در آزمایشی اثر سطوح مختلف قند رافینوز (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) بر خصوصیات اسپرم بز را بررسی کردند و نشان دادند که با افزایش غلظت رافینوز درصد تحرک افزایش و میزان اسپرم‌های غیرطبیعی در بز کاهش می‌یابد (۲۸). در این مطالعات خصوصیات اسپرم در سطوح بالاتر رافینوز بهتر حفظ شده بود ولی در تحقیق حاضر بالاترین درصد تحرک و اسپرم طبیعی در سطح پایین‌تر قند (٦۰ میلی‌مولار) بدست آمد که با نتایج آزمایشات بالا مطابقت ندارد. بیش‌ترین درصد زنده‌مانی در سطح ۸۰ میلی‌مولار قند بدست آمد و بین سطوح دیگر قند اختلاف معناداری مشاهده نشد بنابراین، نتایج آزمایش حاضر از لحاظ صفت زنده‌مانی با نتایج آزمایش‌های بالا مطابقت دارد. با توجه به اینکه درصد سلامت غشاء در تیمار شاهد بالاتر از تیمارهای دیگر بوده است، به نظر می‌رسد که افزودن سطوح (٦۰، ۷۰ و ۸۰ میلی‌مولار) رافینوز تاثیر چندانی بر سلامت غشاء اسپرم‌ها ندارد. باید خاطر نشان کرد که مطالعات ما با این مطالعات در نوع رقیق‌کننده، نژاد، گونه و روش آزمایش متفاوت بود که می‌تواند منشأ این اختلافات باشد. پروتئین شیر و لاکتوز از عوامل محافظت‌کننده اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌باشند، بنابراین رقیق‌کننده پایه شیر اجزایی برای محافظت اسپرم در برابر شوک‌سرمایی طی فرآیند انجماد-ذوب دارد. برای رقیق‌سازی اسپرم قوچ رقیق‌کننده طبیعی شیر گاو می‌باشد که به صورت شیر پس‌چرخ یا پودر شیر خشک برای رقیق کردن اسپرم استفاده می‌شود. در بعضی از کشورها شیر استریلیزه که ماندگاری بیشتری دارد استفاده می‌شود (۲۲).

آری و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای اثر استفاده از شیر گاو و بز به عنوان رقیق‌کننده در انجماد اسپرم قوچ را بررسی کردند. نتایج نشان داد بالاترین درصد تحرک در رقیق‌کننده شیر گاو بدون چربی و شیر بز نیمه‌چرب نسبت به رقیق‌کننده تریس بود (۳). که در تضاد با نتایج آزمایش ما می‌باشد که کمترین درصد تحرک در رقیق‌کننده شیر بدست آمد. فولادوند و همکاران (۱۳۹۲) اثرات سه رقیق‌کننده لسیتین، شیر و زرده تخم‌مرغ بر نگهداری منی قوچ در شرایط سرد را بررسی کردند که نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از لسیتین سویا در مقایسه با رقیق‌کننده‌های حاوی زرده تخم‌مرغ و شیر کاهش معناداری در

فراسنجه‌های تحرک و زنده‌مانی اسپرم ایجاد نمی‌کند و همچنین سلامت غشاء و اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده لسیتین سویا تا حدی بهتر حفظ شده است (١٠). در این تحقیق در بین رقیق‌کننده‌ها بالاترین درصد تحرک و زنده‌مانی و سلامت غشاء اسپرم در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ بدست آمد که با نتایج آزمایش بالا مطابقت ندارد. ولی بیش‌ترین درصد اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده تریس-لسیتین سویا بدست آمد که از این لحاظ با نتایج آزمایش فولادوند و همکاران (١٣٩٢) مطابقت دارد. در توافق با نتایج مطالعه حاضر کاسیمانیکام و همکاران (٢٠١١) گزارش کردند که رقیق‌کننده‌های زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا باعث محافظت بهتر خصوصیات اسپرم قوچ نسبت به رقیق‌کننده شیر می‌شوند. در این تحقیق کمترین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده شیر بدست آمد (١٣). بایلی و همکاران (٢٠٠٠) گزارش کردند که وارد شدن شوک سرمایی، در طی فرآیند انجماد باعث کاهش فعالیت متابولیکی تنفس سلولی و درصد تحرک اسپرم می‌شود (٤). در این تحقیق درصد تحرک اسپرم نسبت به صفات دیگر کمتر بود که دلیل آن می‌تواند ایجاد شوک سرمایی در طی فرآیند انجماد- ذوب باشد. به عبارتی شوک سرمایی تحرک اسپرم را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد. محیط‌های هایپرتونیک با کاهش 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 (٣٠).

نتیجه گیری:

به‌طورکلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که خصوصیات اسپرم شامل درصد تحرک پیش‌رونده و درصد اسپرم طبیعی در سطح ٦٠ میلی‌مولار رافینوز، سلامت غشاء در تیمار شاهد و زنده‌مانی در سطح ٨٠ میلی‌مولار بهتر حفظ شد. بنابراین استفاده از سطوح مذکور رافینوز در شرایط انجماد می‌تواند کیفیت منی قوچ دالاق را بالا ببرد و در بین رقیق‌کننده‌ها خصوصیات اسپرم شامل درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و درصد سلامت غشاء در رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ نسبت به شیر و لسیتین بهتر حفظ شده است ولی اسپرم طبیعی در رقیق‌کننده تریس-لسیتین سویا بیش‌تر بود. بنابراین، بطور کلی استفاده از رقیق‌کننده تریس-زرده تخم‌مرغ برای رقیق نمودن اسپرم قوچ دالاق مناسب می‌باشد. برای به دست آوردن بهترین میزان استفاده از رافینوز در رقیق‌کننده‌ها پیشنهاد می‌گردد مقادیر دیگر رافینوز در رقیق‌کننده‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1.Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E., Liu, J., and Critser, J.K. 2002. Osmotic Characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extender and sugers. Biology of Reproduction. 67: 1493-1510.

2.Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L., and Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk . Theriogenology. 61: 895–907.

3.Ari, U.Ç., Kulaksiz, R., and Öztürkler, Y. 2011. Freezability of Tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. Reproduction in Domestic Animals. 46: 975–979.

4.Baily, J.F., Bilodeau, J.F., and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals. Andrology. 21: 1-7.

5.Barbas, J., and Mascarenhas, R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell and Tissue Banking. 10: 49-62.

6.Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıozkan, S., Bas-pınar, N., Tas-pınar, M., Coyan, K.,

Bilgili, A., Akalın, P.P., Buyukleblebici, S., Aydos, S., and Ilgaz, S. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology. 61: 248–253.

7.Dolati Doorbash, P., Moghaddam, Gh., Daghighkia, H., Taghizadeh, A. and Rafat, S.A. 2015. The effect of adding different raffinose concentrations in the diluents in semen cryopereservation of different breeds of ram at the reproductive season. Animal Science Researches. 25: 121-132. (In Persian)

8.Evans, G., and Maxwell, W.M.C. 1987. Salamons artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Sydney. 194.

9.Fiser, P.S., Ainsworth, L., and Fairfull, R.W. 1987. Evaluation of new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. Theriogenology. 28: 599-607.

10.Fouladvand, F., Karimi, K., Zhandi, M. and Tofighi, K. 2013. Comparison the effects of lecitine, egg yolk and milk as extenders on preservation of ram semen in cool condition. Scientific Research Journal of Animal Environment. 6: 83-90. (In Persian).

11.Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., and Zamiri, M.J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents whit sugars on the post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Reserch. 96: 58-63.

12.Hancock, J. 1956. The morphology of boar spermatozoa. Journal of the Royal Microscopical Society. 76: 84-97.

13.Kasimanickam, P., Kasimanickam, V., Tibaryc, A., and Pelzer, K. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 ◦C. Small Ruminant Research. 99: 208-213.

14.Linford, E., Glover, F.A., Bishop, C., and Stewart, D.L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bulls. Reproduction and Fertility. 47: 283-291.

15.Lio, Z., Foote, R.H., and Brockett, C.C. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality. Cryobiology. 37: 219-230.

16.Martin, I.C.A. 1963. The freezing of dog spermatozoa to -79°C. Research in Veterinary Science. 4: 304.

17.Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., and Rodrigues, J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. Theriogenology. 57: 327-344.

18.NRC, 1985. Nutrient Requirements of Sheep. National Research Council. Academy Press, USA.

19.Papa, F.O., Felicio, G.B., Melo-Ona, C.M., Avarenga, M.A., De.Vita, B., Trinque, C., Puoli-Filhob, J.N., and Dell Aqu, J. 2011. Replacing egg yolk with soyban lecithin in the cryopreservation of stallion semen. Animal Reproduction Science. 129: 73-77.

20.Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., and Ahmad, N. 2003. Effect of buffering system postthaw motion characteristics, plasma membrane integrity, acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Animal Reproduction Science. 59: 31-4.

21.Revell, S., and Mrode, R. 1994 .An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science. 36:1- 77-86.

22.Safdarian, M. 2007. Artificial insemination of sheep and goats. The first Edition. Institute Applied Science Agriculture. 232p. (In Persian).

23.Salamon, S., and Maxwell, W.M. 1995. Frozen storage of ram semen. Cause of low fertilitafter cervical insemination and metod of improvement. Animal Reproduction Science. 38: 1-36.

24. Salamon, S., and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 62:77-111.

25. Sarıözkan, S., Bucak, M.N., Canturk, F., Özdamar, S., Yay, A., Tuncer, P.B., 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: 93-97.

26. Sharafi, M., Eghbalsaied, S., Nili, N., and Nasr-Esfahani, M.H. 2009. Ram semen in vitro fertility cryopreservation

using soybean lectin and egg yolk based extenders. 13th Annual Conference on Reproduction in Domestic Animals. 44: 90-95.

27. Storey, B., Noiles, E.E., and Thompson, K.A. 1998.Comparison glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology. 37: 46-58.
28. Tuncer, P.B., Bucak, M.N., Sarıözkan, S., Sakin, F., Yeni, D., Çiğerci, İ.H., 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: 89-93.
29. Vishwanath, R., and Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animal Reproduction Science. 62: 23-53.
30. 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: 93-105.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 6(2), 2018
http://ejrr.gau.ac.ir

The effect of different levels of raffinose and different extenders on post-thawing characteristics of Dalagh ram semen

S. Pahamly[1], *Y. Mostafaloo[2], F. Moslemipur[2], A. Gharehbash[2]
[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Agriculture and Natural Resources Faculty, Gonbad Kavous University
Received: 30/09/2017; Accepted: 04/05/2018

Abstract

Background and objectives: One of the pivotal technology for genetic reservoirs preservation is the freezing of semen. As freezing causes a reduction in sperm fertility, adding some components to semen to preserve its fertility would be important. Since beginning the time of artificial insemination technique, different diluents have been used to preservation semen in liquid and frozen condition. Therefore, the goal of this study was to investigate the effect of adding different levels of raffinose and milk, Tris-chicken egg yolk and Tris-soybean lecithin extenders on ovine semen characteristics after freezing and thawing.

Materials and methods: Samples were collected from four mature Dalagh rams and extended by different extenders and then raffinose was added. Semen samples were aspirated into 0.5 ml straws and cooled to 4°C within 150 min and then frozen in liquid nitrogen. Frozen straws were transferred to a tank containing liquid nitrogen. After thawing, spermatozoa quality parameters including percentage of sperm motility, viability, membrane integrity and sperm normality were evaluated. This study was performed in a 4 × 3 factorial experiment with a completely randomized arrangement. Treatments were four levels of raffinose (0, 60, 70 and 80 mM) and also three kinds of extenders (milk, tris-egg yolk, and tris-soy lecithin). The obtained data from this study were analyzed by ANOVA procedure of Statistical Analysis System (SAS; version 9.1). Comparison of data means were performed by Tukey test at the level of 1% error.

Results: Results showed that adding raffinose had a significant effect(increase or decrease????) on sperm viability and mobility ($P<0.01$), but did not significantly affect on sperm membrane integrity and normal morphology percentages. Effect of extender on percentages of motility, viability, membrane integrity and normal morphology of sperms was significant ($P<0.01$). The interaction between raffinose levels and extenders on percentages of motility, membrane integrity and normal morphology of sperms was significant while it was not for viability percentage. The greatest sperm mobility (35.00±2.09%) was in tris-egg yolk extender containing 60 mM raffinose while that greatest sperm viabilty (74.40±1.88%) was in tris-egg yolk extender containing 80 mM raffinose. Furthermore, the most percentages of membrane integrity (66.40±2.60%) was observed in Tris-egg yolk without raffinose. The greatest sperm normal morphology (74.80±2.82%) was observed in tris-soy lecithin extender containing 60 mM raffinose.

Conclusion: Findings of the study showed that sperm characteristics including mobility and normal morphology percentages in level 60 mM raffinose, membrane integrity percentages in level 0 mM raffinose while for viability percentage were better preserved in 80 mM level. In the other hand, Ttris-egg yolk extender had more prominent effect on preservation of sperm characteristics.

***Keywords*:** Cryopreservation, Raffinose, Semen extender, Fertility, Ram

*Corresponding author; mostafaloo@yahoo.com