

اثر سطوح مختلف ویتامین های E و C بر کیفیت اسپرم رقیق شده قوچ تالشی در ذخیره سازی در دمای ۵ درجه سانتیگراد

مجید شهبازی اردشیر محیط* مهرداد محمدی

(۱) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریورماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۳ آذرماه ۱۳۸۹)

چکیده

در طول دوره ذخیره سازی اسپرم، آسیب ناشی از اکسیداسیون مواد یکی از علل مهم کاهش قدرت و تحرک و باروری اسپرم می باشد. در این تحقیق سطوح متفاوتی از ویتامین های E و C به عنوان آنتی اکسیدان در اسپرم رقیق شده قوچ تالشی مورد استفاده قرار گرفت و اثر محافظتی آنها بر روی صفات کیفی اسپرم مورد مقایسه قرار گرفت. به همین منظور یک آزمایش فاکتوریل دو عاملی شامل سطوح مختلف ویتامین های E، C، و شاهد، به عنوان عامل اول و زمان های صفر و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره سازی به عنوان عامل دوم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد استفاده قرار گرفت. سطوح ویتامین E شامل E۲، E۴ و E۶ بود که در آنها به ترتیب ۲، ۴ و ۶ میلی گرم ویتامین E در هر ۱۰ میلی لیتر اسپرم رقیق شده مورد استفاده قرار گرفت و سطوح ویتامین C شامل C۰/۳، C۰/۶، C۰/۹ بود که در آنها به ترتیب ۰/۳، ۰/۶ و ۰/۹ میلی گرم ویتامین C در هر میلی لیتر اسپرم رقیق شده بکار رفت. در زمان شروع ذخیره سازی، بین سطوح مختلف ویتامین های E، C، و شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ($p > 0.05$) بعد از ۷۲ ساعت از نظر درصد اسپرم های متحرک بین سطوح ویتامین E با سایر تیمارها تفاوت معنی دار شد ($p > 0.05$). زنده ماندن اسپرم ها در E۴ و E۶ از بقیه سطوح به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0.05$) و بین E۲ و E۴ اختلاف معنی داری نبود ($p > 0.05$). سلامتی غشای اسپرم در E۶ و E۲ از سایر گروه ها به صورت معنی داری بالاتر بود ($p < 0.05$). بر اساس نتیجه این تحقیق، استفاده از ویتامین E به میزان ۶ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر از رقیق کننده بر پایه تریس بهترین اثر در کیفیت اسپرم قوچ تالشی در دمای ۵ درجه سانتیگراد را داشت.

واژه های کلیدی: قوچ تالشی، کیفیت اسپرم، آنتی اکسیدان، ویتامین E و ویتامین C.

یک نقش محافظتی در مقابل یونهای آزاد را داشته و باعث نگهداری غشای سلول در مقابل اکسیده شدن می شود (۱۳). بر اساس آزمایش هایی که بر روی اسب انجام شد نشان دادند که اضافه نمودن اسید اسکوربیک به منی نریان، قدرت تحرک اسپرم در طی ۹۶ ساعت ذخیره سازی نسبت به گروه شاهد بهبودی نیافت (۴). عملکرد ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان درون سلولی بیشتر مربوط به جذب اکسیژن آزاد و اکنشی و هیدروپروکسیدازهای چربی و تبدیل آن ها به اشکال غیر واکنشی می باشد (۱۸). در تحقیق دیگری که با مکمل نمودن ویتامین E در منی قوچ انجام گرفت نشان دادند که ویتامین E تاثیر نگهدارنده در میزان قدرت تحرک و سلامتی غشاء اسپرم در منی منجمد شده داشت (۸). هدف از این مطالعه، بررسی چگونگی حفظ کیفیت اسپرم در زمان ذخیره سازی از طریق مکمل نمودن ویتامین های E و C در سطوح مختلف به منی رقیق شده و همچنین مقایسه بین این سطوح بود.

مواد و روش کار

۸ انزال از ۴ قوچ نژاد تالشی با میانگین سن ۳/۵ سال گرفته شد. جمع آوری منی بوسیله واژن مصنوعی و با استفاده از یک میش فحل و آماده جفت گیری صورت گرفت. بلافاصله بعد از جمع آوری منی، آنرا به نسبت ۱:۱۰ (۱/۱۰ میلی لیتر منی + ۱۰ میلی لیتر رقیق کننده) با رقیق کننده بر

مقدمه

تلقیح مصنوعی با منی سرد (۵ درجه سانتیگراد) و یا منجمد (۱۹۶ درجه سانتیگراد) به یک روش معمول در اصلاح نژاد گوسفند تبدیل شده است (۲). بر اساس آزمایش های انجام شده اسپرم قوچ را می توان تا ۴۸ ساعت پس از رقیق سازی در دمای ۵ درجه سانتیگراد ذخیره سازی نمود بدون اینکه اثرات نامطلوبی بر روی قدرت تحرک و کیفیت غشای آن ایجاد شود (۱۳). با این حال به دلیل پایین بودن میزان رقت مایع منی قوچ، در زمان های طولانی تر (۷۲ ساعت) نمی توان منی قوچ ها را به خوبی نگهداری کرد و نگهداری قدرت تحرک و باروری اسپرم در زمان های طولانی تر و در دمای ۵ درجه سانتیگراد اهمیت قابل ملاحظه ای در استفاده از مایع منی دارد (۲). مشخص شده است که استفاده از بعضی مواد با خصوصیت آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز و تورولوکس باعث حفاظت از قدرت باروری اسپرم می شود (۵). در طول دوره ذخیره سازی آسیب در اثر اکسیداسیون مواد یکی از علل مهم کاهش قدرت تحرک و باروری اسپرم می باشد. به منظور نگهداری اسپرم برای مدت های طولانی تر، سرد کردن و محافظت از آن به یک محلول محافظت کننده نیاز است (۲). حفظ کیفیت اسپرم قوچ بیشتر مبتنی بر تغییر و جایگزین نمودن رقیق کننده ها و همچنین اضافه کردن ترکیبات ویژه می باشد (۱۶، ۱۹، ۲۰). ویتامین C (اسید اسکوربیک)



نتیجه

بین رقیق‌کننده‌ها با مقادیر متفاوت ویتامین‌های E و C آنتی‌اکسیدان) و همچنین گروه شاهد، در زمان شروع ذخیره‌سازی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، از نظر قدرت تحرک اسپرم بین سطوح ویتامین E با سایر تیمارها شامل سطوح ویتامین C و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p > 0.05$). ولی از این نظر بین سطوح ویتامین C و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). (جدول ۱).

۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، در قدرت زنده‌مانی اسپرم‌ها نسبت به زمان شروع ذخیره‌سازی کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p > 0.05$). قدرت زنده‌مانی اسپرم در E۴ و E۶ به طور معنی‌داری از بقیه سطوح و شاهد بالا تر بود ($p > 0.05$) ولی بین E۲ و E۴ از این نظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). از نظر قدرت زنده‌مانی اسپرم بین سطوح ویتامین C با یکدیگر و با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). (جدول ۱).

۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، غشای سیتوپلاسمی سالم در همه گروه‌ها نسبت به ساعت شروع ذخیره‌سازی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p > 0.05$). در ۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی، اسپرم‌های دارای غشای سیتوپلاسمی سالم در رقیق‌کننده‌های حاوی ویتامین E به طور معنی‌داری از بقیه تیمارها بالا تر بود ($p > 0.05$) اما بین سطوح مختلف ویتامین C با یکدیگر و همچنین با شاهد از این نظر اختلاف معنی‌داری نبود ($p > 0.05$). (جدول ۱).

بحث

ویتامین C (اسید اسکوربیک) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در مایع اپیدیدیم و پلاسمای منی چند گونه حیوانی و از جمله قوچ وجود دارد و یک نقش محافظتی در برابر آدیکال‌های آزاد داشته و باعث نگهداری غشای اسپرماتوزوئید در مقابل اکسید شدن می‌شود (۱۳). تنش‌های ناشی از اکسیداسیون سبب آسیب به اسپرماتوزوئیدها شده و باروری را کاهش می‌دهند (۶، ۱۷). در تحقیق حاضر، اضافه نمودن مقادیر مختلف ویتامین C به اسپرم رقیق شده تأثیری روی صفات کیفی اسپرم نداشته است و بین سطوح مختلف ویتامین C و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است نتایجی مشابه توسط Ball و همکاران در سال ۲۰۰۱ در اسب مشاهده شد آنها با اضافه نمودن ویتامین C به مایع منی اسب و در طی ۹۶ ساعت ذخیره‌سازی، تأثیر معنی‌داری روی قدرت تحرک اسپرم مشاهده نکردند. Aurich و همکاران در سال ۱۹۹۷ نیز نتایج مشابهی در رابطه با عدم تأثیر ویتامین C بر روی کیفیت اسپرم اسب بدست آوردند. سانچز پارتید و همکاران با مکمل نمودن ویتامین C به مایع منی قوچ اثر مثبتی در کیفیت

پایه تریس (آمینومتیل) که محتوی ۲/۲۷ گرم تریس، ۵ گرم گلوکز، ۷۵ میلی لیتر آب مقطر، ۲۰ میلی لیتر زرده تخم مرغ و ۵ میلی لیتر کلسترول بود رقیق شد که هم اسپرم و هم رقیق‌کننده در دمای ۳۷ درجه با هم مخلوط شده و بعد در دمای ۵ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شد. قبل از ذخیره‌سازی، اسپرم‌های رقیق شده ابتدا به ۴ قسمت، و هر قسمت به ۷ نمونه تقسیم شدند به نحوی که ۷ نمونه شامل ۳ سطح ویتامین E (۲E، ۴E، ۶E)، در هر ۱۰ میلی لیتر اسپرم رقیق شده و (۳C، ۴C، ۶C mg/ml)، (۰/۳، ۰/۴، ۰/۶ C mg/ml)، (۰/۹، ۰/۱۲، ۰/۱۵ C mg/ml) پس از تقسیم بندی فوق در زمان‌های صفر (۰) و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی صفات مربوط به اسپرم شامل اسپرم‌های متحرک، سلامتی غشای اسپرم و درصد بقای اسپرم‌های زنده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۰).

میزان اسپرم‌های متحرک با استفاده از روش کرایدر مبتنی بر تخمین درصد اسپرم‌های متحرک در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ تعیین شد، که برای این منظور یک قطره از محلول رقیق‌کننده روی اسلاید ۳۷ درجه قرار گرفت و اسپرم‌های متحرک شمارش شدند (۹، ۱۰).

برای تعیین درصد اسپرم‌های زنده از روش کرایدر استفاده شد که برای این منظور یک قطره منی با یک قطره محلول رنگ‌آمیزی ائوزین، نگروزین (۰/۶ گرم ائوزین ۷، ۱۰ گرم نگروزین و ۰/۹ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه، یک قطره کوچک از مخلوط روی اسلاید گذاشته شد و از آن گسترش تهیه گردید، پس از خشک شدن، گسترش مورد ارزیابی قرار گرفت به طوری که اسپرماتوزوئیدهایی که سفید بودند (بدون رنگ) به عنوان اسپرم‌های زنده و آن‌هایی که رنگ قرمز یا صورتی داشتند بعنوان اسپرم‌های مرده تعیین شدند. برای اطمینان بیشتر تعداد ۲۰۰ اسپرماتوزوئید از ۴ ناحیه مختلف هر اسلاید شمارش گردید (۹، ۱۰).

برای اندازه‌گیری اسپرم‌های با غشای سیتوپلاسمی سالم از روش کرایدر استفاده شد که برای این منظور یک قطره منی به ۸ قطره محلول هیپوسموتیک (۱۳/۵ گرم فروکتوز، ۷/۳۵ گرم تری سترات سدیم، آب مقطر خالص برای رساندن حجم به یک لیتر، ائوزین ۰/۵، درصد) اضافه شد و بعد از قراردادن در گرم‌خانه (به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۸ درجه سانتیگراد) یک قطره از مخلوط روی اسلاید گذاشته شد و روی آن لامل قرار گرفت و گسترش تهیه شده از نظر آماس دم مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های با دم آماسی به عنوان اسپرم با غشای سیتوپلاسمی سالم و اسپرم‌های با دم‌های غیر آماسی به عنوان اسپرم با غشای آسیب دیده در نظر گرفته شد (۱۰).

این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۷ در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. جهت تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SAS با استفاده از رویه ANOVA و جهت مقایسه میانگین‌ها از روش توکی استفاده گردید.



جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف در زمان شروع و ۷۲ ساعت بعد از ذخیره سازی. *ستون ها با حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد می باشد.

غشای سیتوپلاسمی سالم		درصد زنده مانی اسپرم		درصد تحرک اسپرم		صفت اندازه گیری شده
۷۲	.	۷۲	.	۷۲	.	ساعت
						تیمار
۴۷/۱۲a*	۸۴/۷۵a	۵۱/۵a	۹۱/۵a	۴۴/۸۷a	۸۵a	E _p
۴۵/۳۷ab	۸۳/۵a	۴۹/۵ab	۸۹/۵a	۴۳/۵ab	۸۴/۵a	E _q
۴۵/۶۲a	۸۴/۷۵a	۴۸/۷۵b	۸۸/۵a	۴۴/۱۲۵a	۸۵/۵a	E _p
۴۳/۳۷bc	۸۶/۷۵a	۴۴/۱۲c	۸۸/۲۵a	۴۲/۱۲۵b	۸۴/۲۵a	C _{۰/۱۹}
۴۲/۰۰c	۸۴a	۴۴/۸۷c	۸۹/۷۵a	۴۲/۰۰b	۸۴a	C _{۰/۱۶}
۴۲/۰۰c	۸۴a	۴۴/۳۷c	۸۸/۷۵a	۴۲/۲۵b	۸۴/۵a	C _{۰/۱۳}
۴۲/۰۰c	۸۴a	۴۳/۷۵c	۸۷/۵a	۴۲/۰۰b	۸۴a	شاهد
۴/۰۳	۴/۰۸	۵/۰۸	۷/۰۸	۲/۰۳	۶/۰۷a	SEM

دلیل تفاوت احتمالی بین تحقیق حاضر و Uperti و همکاران در سال ۱۹۹۷ این است که در تحقیق یوپرتی و همکاران در سال ۱۹۹۷، ذخیره سازی منی در ۱۵ درجه سانتیگراد انجام شده که این امر باعث حفظ متابولیسم اسپرم به میزان بالا و در نتیجه کاهش کیفیت آن می گردد. از طرف دیگر در تحقیق انجام شده توسط Fernandezsantos و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی اسپرم رقیق شده گوزن مشخص شد که مکمل کردن آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی مانند ویتامین E دارای اثرات مثبتی بر اسپرم هنگام انجماد و ذوب مجدد نبوده است بلکه مقادیر بیش از ۶/۴ میلی گرم در هر دسی لیتر باعث تاثیر منفی بر کیفیت اسپرم خواهد شد. آنها نتیجه گیری نمودند که مقادیر بیش از حد ویتامین E موجب تحریک اکسیداسیون نیز می شود. در تحقیق Maxwell و Stojanovo در سال ۱۹۹۶ آنتی اکسیدان های سوپراکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، سیتوفورم و گلو تاتیون پراکسیداز (GP) با غلظت های گوناگون به رقیق کننده تریس و زرده تخم مرغ اضافه شدند و تاثیرات آن ها بر قدرت تحرک، میزان سلامت آکروزوم و باروری اسپرماتوزوای قوچ پس از رقیق شدن و ذخیره سازی مایع منی مورد ارزیابی قرار گرفت. همه آنتی اکسیدان ها قدرت تحرک و میزان سلامت آکروزوم اسپرماتوزوا را بهبود بخشیدند. اگرچه نرخ حاملگی به دست آمده در آزمایش تلقیح مصنوعی می تواند شاخص مطلوبی برای تعیین کیفیت منی باشد، اما ارزیابی قدرت تحرک اسپرم و میزان غشای سیتوپلاسمی سالم امکان برآوردهای مناسبتری از ظرفیت باروری را فراهم می نماید که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، و آنچه که از مقایسه این نتایج با کارهای انجام شده روی سایر دام ها بدست آمده می توان چنین نتیجه گرفت که هنگام ذخیره سازی در ۵ درجه سانتیگراد اضافه نمودن ویتامین E (به میزان ۶ میلی گرم در هر ۱۰ میلی لیتر) به منی قوچ در حفظ و نگهداری قدرت تحرک و غشای سیتوپلاسمی سالم و زنده مانی سلول اسپرم بیشتری اثر داشته است.

اسپرم مشاهده نکردند و حتی نتیجه گرفتند که مقادیر بیش از ۵۰ میکرومولار اسید اسکوربیک در مایع منی باعث کاهش خصوصیات کیفی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد می شود و در تحقیق دیگری که توسط خردمند و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام شد آنها با اضافه نمودن ویتامین C به منی قوچ و در ذخیره سازی ۵ درجه سانتیگراد، تاثیر معنی داری بر کیفیت اسپرم مشاهده نکردند. با توجه به نتایج این آزمایش و مطالب فوق می توان نتیجه گرفت که ویتامین C اگر چه آنتی اکسیدانی محلول در آب است با این حال مکمل نمودن آن در مایع منی نمی تواند اثر محافظتی بر اسپرم داشته باشد شاید یکی از دلایل این امر خاصیت اسیدی این ویتامین و کاهش pH مایع منی بعد از مکمل نمودن آن باشد (۱۳). عملکرد ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان درون سلولی بیشتر مربوط به جذب اکسیژن آزاد و اکنشی و هیدروپروکسیدازهای چربی و تبدیل آن ها به اشکال غیرواکنشی می باشد (۱۸). بنابراین فسفولیپیدهای غشاء را در برابر آسیب های ناشی از اکسیده شدن دوام می بخشد (۱۷). در این بررسی اضافه نمودن ویتامین E به منی ذخیره شده اثرات نگهدارنده ای را در کیفیت اسپرم داشت و سطوح ویتامین E روی کیفیت اسپرم دارای تاثیر معنی دار بود، که با نتایج بدست آمده توسط برخی از محققان قابل تطبیق است ولی با نتایج برخی دیگر مغایرت دارد. طبق پژوهش Ball و همکاران در سال ۲۰۰۱ ویتامین E به میزان معنی داری موجب تغییر قدرت تحرک در طول دوره ذخیره سازی اسپرم نریان در ۷۲ یا ۹۶ ساعت نشد. Agüero و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش دادند که اضافه نمودن ویتامین E به منی اسب سانان میزان حفظ قدرت تحرک اسپرم را در طول ۲۴ ساعت ذخیره سازی در دمای سرد بهبود می بخشد، و در تحقیق دیگر که توسط Uperti و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام شد آنها نشان دادند که در قوچ ها اضافه نمودن ویتامین E به میزان حفظ قدرت تحرک اسپرم در منی ذخیره شده در ۱۵ درجه سانتیگراد آسیب زد. هم چنین در تحقیقی که توسط خردمند و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت، ویتامین E تاثیر نگهدارنده در میزان قدرت تحرک و سلامتی غشاء داشت. به نظر می رسد



References

1. Agüero, A., Miragaya, M.H., Mora, N.G., Chaves, M.G., Neild, D.M., Beconi, M.T. (1995) Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. *Comm. Biol.* 13: 343-356.
2. Arthur, G. H., Noakes, D.E., Pearson, H., Parkinson, T.J. (1996). *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. (7thed.). W. B. Saunders Co. London. UK.
3. Aurich, J.E., Schonherr, U., Hoppe, H., Aurich, C. (1997) Effects of antioxidants on and membrane integrity of chilled stored stallion semen. *Theriogenology*. 48: 185-192.
4. Ball, B.A., Medina, V., Gravance, C.G., Baumber, J. (2001) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*. 56: 577-589.
5. daSilvaMaia, M., Bicudo, S. D., Azevedo, H. C., Sicherle, C. C., Bartoli-de-Sousa, D., Rodello, L. (2009) Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rum. Res.* 85:85-90.
6. De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon C. (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Review Reproduction*. 2:48-54.
7. Fernandezsantos, M. R., Martinezpastor, F., Garciamacias, V., Estes, M. C., Soler, A. J., Pas, P., Anel, L., Grade, J. J. (2007) Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. *J. Androl.* 28:294-305.
8. Kheradmand, A., Babaei, H., Abshenas, J. (2006) Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. *Iranian J. Vet. Res.* 7:40-45.
9. Kreider, J.L., Tindall, W.C., Potter, G. D. (1985) Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. *Theriogenology*. 23:399-408.
10. Manual on Basic Semen analysis. (2002) NAFA and ESHRE-SIGA. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
11. Marti, J.I., Marti, E., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T. (2003) Survival rate of antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. *Theriogenology*. 60: 1025-1037.
12. Maxwell, W.M., Stojanov, T. (1996) Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1013-1020.
13. Mustafa, S., Esref, D. (2004) The effect of Ascorbic Acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turk Journal. Vet. Anim. Sci.* 28: 893-899.
14. Purdy, H. (2006) The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. *Anim. Rep. Sci.* 93:114-123.
15. Sarlos, P., Molnar, A., Kokai, M., Gabor, G., Ratky, J. (2002) Evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta. Vet. Hung.* 50: 235-245.
16. Sanchez-Partida, L.G., Setchell, B.P., Maxwell, W.M. (1997) Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Vet.* 9: 689-696.
17. Sharma, R.K., Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*;48:835-50.
18. Smith, O. B., Akinbamijo, O. O. (2000) Micronutrients and reproduction in farm animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 549-560.
19. Uperti, G.C., Jensen, K., Oliver, J.E., Duganzich, D.M., Munday, R., Smith, J.F. (1997) Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 269-278.
20. Watson, P.F., Anderson, W.J. (1983) Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.* 69: 229-235.

EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF VITAMINS E AND C ON QUALITY OF DILUTED SPERM OF TALESHI RAM DURING STORAGE AT 5°C

Mohit, A. *, Mohammadi, M., Shahbazi, M.

¹Department of Animal Science, College of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht- Iran.

(Received 23 August 2010 , Accepted 24 November 2010)

Abstract:

During sperm storage, Oxidative damage is one of the major causes for the reduction of sperm motility and fertility. This experiment was conducted to compare the effects of different levels of vitamin E and C, as antioxidants on diluted sperm and their protective effects were compared on traits related to the quality of sperm. A two-variable factorial experiment in a completely randomized design (CRD) including seven levels of vitamins C, E and control group along with two levels of storage time was used in this study. The levels of vitamin E, were included E2 (2 mg), E4 (4 mg) and E6 (6 mg) per 10 ml diluted sperm and the levels of vitamin C, were included C0.3(0.3mg), C0.6 (0.6mg) and C0.9(0.9 mg) per 1 ml diluted sperm. At initiation of storage there was no significant difference between levels of vitamins E, C and control group ($p > 0.5$). After 72 hours of storage there was a significant difference between percentage of motile spermatozoa in different levels of vitamin E, with other treatments ($p < 0.05$). The viability levels of E4 and E6 were significantly higher ($p < 0.05$) however no significant difference was seen between viability of E2 and E4 ($p > 0.05$). The levels of membrane integrity in E2 and E6 were higher significantly than other groups ($p < 0.05$). According to the results of the present study, supplemented of vitamin E with 6 mg in 10 ml of the diluted sperm based on Tris has the best effect in the quality of sperm of Taleshi ram at 5°C.

Key words: Taleshi ram, Quality of sperm, Antioxidant, Vitamin E and Vitamin C.

*Corresponding author's email: ar_mohit@guilan.ac.ir, Tel: 0131-6690274, Fax: 0131-6690274

