نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۱، تابستان ۱۳۹۵
ص‌ص: ٦٥~٧٤

بررسی تأثیر زرده‌های تخم پرندگان مختلف در رقیق‌کننده تریس بر کیفیت منی قوچ عربی در شرایط مایع

• **شهرام شمسی گزافی*[1]، مرتضی مموئی[2]، صالح طباطبائی وکیلی[3]، خلیل میرزاده[3]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۴

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۸۵۷۴۸۸۶

Email: sh.shamsi1367@gmail.com

چکیده

این آزمایش به‌منظور مقایسه اثر محافظتی زرده تخم شش گونه پرنده [مرغ صنعتی (*Gallus Gallus*)، مرغ محلی (*Gallus domesticus*)، اردک (*Anatidae anas platyrhynchos*)، غاز (*Anatidae anser*)، بلدرچین (*Coturmix japonica*) و قرقاول (*Phasianus Colchicus*)] برای محافظت اسپرم قوچ عربی در چهار زمان (یک، شش، ۱۲ و ۲٤ ساعت) ذخیره‌سازی منی در شرایط مایع (۵°C)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار (زرده‌های تخم ٦ پرنده) و هشت تکرار انجام شد. نمونه‌های منی از ۱۰ رأس قوچ نژاد عربی با شرایط سنی دو تا سه سال به‌طور هفتگی به مدت هشت هفته در فصل تولیدمثلی با استفاده از دستگاه شوک الکتریکی جمع‌آوری شده و باهم مخلوط شدند. نمونه‌های منی با رقیق‌کننده تریس حاوی تیمارهای زرده‌تخم پرندگان مختلف (١٤ درصد) آمیخته، سپس درصد تحرک، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در چهار زمان پس از مخلوط کردن منی با رقیق‌کننده ارزیابی شدند. نتایج آزمایش نشان دادند که استفاده از زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز، اثر مثبتی بر کاهش درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم طی نگهداری در زمان چهارم (٢٤ ساعت) داشت (P<۰/۰۵). باگذشت زمان (شش ساعت پس از نگهداری)، زرده تخم اردک و بلدرچین بیشترین تأثیر را بر زنده‌مانی گذاشتند (P<۰/۰۵). درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی با گذشت زمان افزایش یافت و استفاده از منابع مختلف زرده نتوانست تفاوت معنی‌داری بر آن ایجاد کند. به‌طورکلی، نتایج نشان دادند که زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز، اثر محافظتی بهتری برای نگهداری اسپرم قوچ عربی در شرایط نگهداری مایع دارد.

واژه‌های کلیدی: زرده تخم، درصد تحرک، زنده‌مانی، کیفیت اسپرم، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 65-74

The effect of egg yolk from different birds in Tris diluent on the quality of Arabic ram semen in liquid condition

Shahram Shamsi Gazafi*[1], Morteza Mamouei[2], Saleh Tabatabaei Vakili[3], Khalil Mirzadeh[3]
1. Graduate student of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.
2. Associated Professors, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.
3. Assistant Professors Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan , Iran.

Received: June 2015 **Accepted: August 2015**

This experiment were conducted in order to compare the protective effect of egg yolk from 6 species of birds [industry chicken (*Gallus Gallus*), local chicken (*Gallus Gallus domesticus*), duck (*Anatidae anas platyrhynchos*), goose (*Anatidae anser*), quail (*Coturmix japonica*) and pheasant (*Phasianus Colchicus*)] to protect Arabian ram semen in four times (1, 6, 12 and 24 hours) of semen storage under liquid condition (5°C), was done in a completely randomized design with six treatments (Egg yolks of 6 birds) and eight replications. Semen samples from 10 Arabic rams with 2-3 years were collected weekly in breeding season for eight weeks with using electric shock and semen samples were mixed. Semen samples were mixed with Tris extender containing eggs yolks of different treatments (14%) and then the percentage of motility, viability and morphological abnormalities of spermatozoa in four times after dilution were evaluated. The result of this experiment showed that, use duck egg yolk, goose and local chicken, positive effect on the reduction in percentage of spermatozoa motility and viability during storage at quarter time (24 hours) ($P<0.05$). The passage of time (six hours of storage) duck egg yolk and quail have the maximum effects on the survival ($P<0.05$). The percentage of morphological abnormalities increased with the passage of time and the use of different sources egg yolks not to make a significant difference. In general, the results showed that the duck egg yolk, goose eggs and chicken local, have better protective effect for Arabian ram semen stored in liquid condition.

Key words: Egg yolk, Morphology abnormalities, Motility, Sperm quality, Viability

مقدمه

قوچ اگرچه می‌تواند در تمام طول سال فعالیت جنسی داشته و جفت‌گیری نماید ولی به نظر می‌رسد که پتانسیل بارورکنندگی و ویژگی‌های کمی و کیفی اسپرم آن همراه و همزمان با عملکرد تولیدمثل فصلی ماده‌ها تغییر می‌کند (ضمیری، ۱۳۸۵). پلاسمای منی با دارا بودن ترکیبات مختلف، محیط مناسبی برای فعالیت و تحرک اسپرم مهیا می‌سازد (Gundogan، ۲۰۰۷). پژوهشگران صنعت تلقیح مصنوعی متوجه شدند که اسپرم در منی رقیق نشده فقط برای مدت کوتاهی زنده مانده و از طرفی خنک کردن آهسته منی رقیق نشده تا پنج درجه سانتی‌گراد باعث مرگ تعداد زیادی از اسپرم‌ها می‌شود. روش‌های مختلفی جهت کاهش آسیب‌های ناشی از شوک سرما پیشنهادشده است. از جمله این روش‌هاکنترل سرعت سرد شدن و استفاده از زرده‌تخم‌مرغ می‌باشد (Manjunath and The´rien، ۲۰۰۲).

آگاهی از ترکیبات پلاسمای منی می‌تواند در طراحی رقیق‌کننده‌ها برای افزایش طول دوره نگهداری و فعالیت اسپرم مفید باشد (Secer و همکاران، ۲۰۰۴). از رقیق‌کننده‌ها به‌منظور حفاظت سلول‌های اسپرم در مراحل سرد شدن و انجماد استفاده می‌شود. رقیق‌کننده‌ها همچنین منبع مهمی از مواد مغذی برای متابولیسم اسپرم فراهم آورده و از تغییرات شدید pH جلوگیری می‌کنند (Leboeuf و همکاران، ۲۰۰۰). زرده‌تخم‌مرغ به‌واسطه لیپوپروتئین و لسیتین، اسپرم را از شوک سرمایی محافظت می‌کند و به‌عنوان ترکیب اصلی جهت تهیه رقیق‌کننده‌های منی مطرح

است (لطیفیان، ۱۳۷۶). رقیق‌کننده بر پایه تریس در مقایسه با سایر رقیق‌کننده‌ها می‌تواند شرایط بهتری برای اسپرم فراهم کند و از تغییرات فشار اسمزی که می‌تواند سبب کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم شود جلوگیری نماید (جعفری آهنگری، ۱۳۷۵). پژوهش‌های اندکی درباره اثر محافظتی زرده تخم پرندگان مختلف برای محافظت اسپرم قوچ نژاد عربی، طی ذخیره‌سازی در دمای پنج درجه سانتی‌گراد انجام‌گرفته است؛ بنابراین هدف از پژوهش کنونی مقایسه تأثیر زرده‌تخم‌مرغ محلی، صنعتی، اردک، غاز، بلدرچین و قرقاول بر ویژگی‌های اسپرم قوچ عربی طی کاهش دما تا پنج درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان واقع در شهر ملاثانی در ۳۶ کیلومتری شمال شرقی اهواز با استفاده از ۱۰ رأس قوچ نژاد عربی با شرایط سنی دو تا سه سال و با میانگین وزنی ۳/۷±۶۴ کیلوگرم انجام شد. جیره غذایی بر طبق جدول کمیته ملی تحقیقات (NRC، ۱۹۸۵) تنظیم و روزانه ۱۳۰۰ گرم یونجه خشک، ۵۹۰ گرم جو، ۶۲۰ گرم کاه گندم در دو وعده خوراک صبح و بعدازظهر در اختیار قوچ‌ها قرار داده شد. در طول آزمایش، نمک و آجر لیسیدنی (مکمل مواد معدنی) به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. عمل اسپرم گیری از قوچ‌ها با دستگاه شوک الکتریکی (الکترواجاکولاتور) به‌طور هفتگی به مدت هشت هفته در فصل تولیدمثلی (بهاره) انجام و پس از جمع‌آوری انزال‌ها، نمونه‌های منی با حداقل ۸۰ درصد جنبایی پیشرونده که توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد، باهم (به منظور کاهش خطای مربوط به اختلافات انفرادی دام‌ها) مخلوط شدند. برای جلوگیری از ایجاد شوک سرمایی نمونه‌های منی تا زمان انتقال به آزمایشگاه، درون حمام آب گرم ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای ساخت رقیق‌کننده از محیط پایه تریس استفاده گردید. محلول تریس شامل: تریس(ساخت شرکت مرک آلمان) ۳/۰۷ گرم، سیتریک اسید (مرک آلمان) ۱/۶۴ گرم و فروکتوز (مرک آلمان) ۱/۲۶ گرم که توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و pH آن روی ۷ تنظیم شد. در آزمایشگاه نمونه منی به شش بخش مساوی تقسیم شد و به هر بخش مایع رقیق‌کننده پایه تریس بعلاوه ۱۴ درصد زرده تخم پرنده (مرغ صنعتی (*Gallus gallus*)، مرغ محلی (*Gallus gallus domesticus*)، اردک (*Anatidae anas platyrhynchos*)، غاز (*Anatidae anser*) با نسبت رقیق‌سازی یک به ۱۰ افزوده شد و غلظت نهایی اسپرم به $۲/۹۳\times۱۰^{۹}$ میلی‌لیتر در هر منی رقیق‌شده رسید. ارزیابی فراسنجه‌های کیفی (درصد تحرک، زنده‌مانی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی) اسپرم در چهار زمان (یک ساعت پس از نگهداری در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از نگهداری نمونه‌ها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. پس از ارزیابی اسپرم در زمان اول (یک ساعت بعد از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده)، نمونه‌های رقیق‌شده از بن ماری (حمام آب گرم) به داخل یخچال انتقال داده شدند و دمای آن‌ها در عرض ۱/۵ ساعت به پنج درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. دمای اسپرم در این درجه حفظ گردید تا از نمونه‌ها در سه زمان باقی‌مانده (شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت) ارزیابی به عمل آید.

ارزیابی تحرک اسپرم

اولین فراسنجه‌ی مورد ارزیابی در این تحقیق، بررسی تحرک بود. ارزیابی تحرک نمونه‌ها به روش چشمی با استفاده از میکروسکوپ نوری (با مقیاس صفرتا ۱۰۰) و با قرار دادن ۵ میکرولیتر از منی روی لام گرم شده با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط صفحه گرم‌کننده (هات پلیت) و گذاشتن یک لام تمیز بر روی آن انجام شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X۴۰۰ تحرک اسپرم، در سه میدان دید تخمین زده و در انتها میانگین حاصل از این سه تخمین به‌عنوان درصد تحرک ثبت شد (Bucak و همکاران، ۲۰۰۹).

ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

برای ارزیابی میزان اسپرم‌های زنده و مرده از رنگ‌آمیزی حیاتی ائوزین- نیگروزین استفاده گردید. مواد تشکیل‌دهنده این محیط شامل رنگ ائوزین (۱/۶۷ گرم در لیتر)، رنگ نیگروزین (۱۰۰

گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۲۹ گرم در لیتر) می‌باشد. اساس رنگ‌آمیزی بدین‌صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند درحالی‌که اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای انجام این رنگ‌آمیزی ۲۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم را برداشته و روی لام گذاشتیم. ۲۰ میکرولیتر از رنگ آماده‌شده ائوزین- نیگروزین برداشته و روی نمونه ریخته و با سمپلر به‌آرامی نمونه را به هم زده تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی لام به‌آرامی گسترش تهیه گردید. پس از خشک شدن، لام را زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی X۴۰۰ قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از بخش‌های مختلف آن عکس گرفته شد. از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. اسپرم‌هایی که رنگ صورتی کم‌رنگ به خود گرفته یا تنها بخشی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند (Evans and Maxwell، ۱۹۸۷).

ارزیابی ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم

برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با ائوزین- نیگروزین تحت بزرگ‌نمایی بالای میکروسکوپی نوری (X۱۰۰۰) استفاده شد. حداقل تعداد ۲۰۰ اسپرم زنده در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه مورد ارزیابی قرارگرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده‌شده برحسب درصد بیان گردید. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جداشده، قطره سیتوپلاسمی دور، دم پیچ‌خورده، سر باریک و سربزرگ مدنظر قرار گرفت (Blom، ۱۹۸۳).

تحلیل آماری

این آزمایش در هشت تکرارانجام شد. داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (۱۹۹۶) و با رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد و به دلیل درصدی بودن داده‌ها در این آزمایش از تست نرمالیته استفاده شد و چون دارای توزیع نرمال بودند از تبدیل زاویه‌ای استفاده نشد(SAS Institute، ۱۹۹۶).

$$y_{ij}= \mu_{+} a_{i +} e_{ij}$$

Y: خصوصیات اسپرم شامل: درصد تحرک، درصد زنده‌مانی و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم

μ:میانگین جامعه a_i: اثر رقیق‌کننده حاوی زرده‌های تخم پرندگان e_{ij}:اثر باقی‌مانده

نتایج و بحث

نتایج آزمایش حاکی از آن بودند که درصد تحرک اسپرم در تخم‌مرغ صنعتی، در زمان چهارم نسبت به زمان اول ۴۷/۶۶ درصد کاهش پیدا کرد که این کاهش در تیمارهای تخم‌مرغ محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین در مقایسه با تخم‌مرغ صنعتی به ترتیب، ۲۸/۱۳، ۲۶/۲۵، ۳۱/۸۷، ۳۶/۲۵ و ۳۳/۷۵ درصد بود. مقایسه میانگین‌ها در جدول ۱ نشان دادند که باگذشت یک، شش و ۱۲ ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده حاوی زرده‌های تخم پرندگان (مرغ صنعتی، محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین) اختلاف معنی‌داری ازنظر درصد تحرک اسپرم مشاهده نشد؛ اما در زمان چهارم (۲۴ ساعت پس از نگهداری) تفاوت میان زرده تخم پرندگان بر درصد تحرک اسپرم معنی‌دار بود ($P<0/05$). رقیق‌کننده تریس حاوی زرده‌تخم‌مرغ صنعتی (۲۸/۶۷ درصد) دارای کمترین درصد تحرک اسپرم بود درحالی‌که بیشترین درصد تحرک اسپرم در رقیق‌کننده حاوی زرده تخم اردک (۵۵/۰۰ درصد)، مرغ محلی (۵۳/۷۵ درصد) و غاز (۴۹/۳۸ درصد) مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین رقیق‌کننده حاوی زرده تخم غاز (۴۹/۳۸ درصد)، قرقاول (۴۳/۷۵ درصد) و بلدرچین (۴۵/۰۰ درصد) ازنظر درصد تحرک اسپرم وجود نداشت ($P>0/05$) (جدول ۱).

لازمه تحرک اسپرم، سلامت ساختار و عملکرد اجزای سلول ازجمله غشای پلاسمایی است. غشای پلاسمایی علاوه بر این‌که به‌عنوان لایه‌ای، محیط داخل سلول را از محیط خارج آن جدا می‌کند دارای فعالیت‌های فیزیولوژیک مهمی مانند کنترل انتقال مواد و حفظ محیط الکتروشیمیایی داخل سلول نیز هست

(Cunningham، ۲۰۰۲). اسپرم قوچ پس از بروز شوک سرما به دلیل تخریب غشای پلاسمایی و خروج ترکیبات داخل سلولی توانایی بازیافت کامل فعالیت متابولیکی و تحرک را از دست می‌دهد(Quinn و همکاران، ۱۹۶۹). وجود زرده‌تخم‌مرغ در رقیق‌کننده منجر به افزایش تحرک اسپرم انزالی قوچ می‌شود (Watson and Martin، ۱۹۷۵).

پلاسمای منی دارای پروتئین‌هایی بنام BSP[1] است که سبب خارج شدن فسفولیپیدها و کلسترول از غشای اسپرم شده درنتیجه باعث افزایش حساسیت اسپرم به شوک سرمایی می‌شود (Bergeron and Manjunath، ۲۰۰۶). تحقیقات نشان داده لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده‌تخم‌مرغ (LDL-EY)[2] مهم‌ترین فاکتور محافظت‌کننده برای اسپرم‌ها می‌باشد. LDL حاوی اسیدهای چرب، فسفولیپید و کلسترول است. لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده‌تخم‌مرغ به‌عنوان یک عامل مداخله‌گر (Vishwanath و همکاران، ۱۹۹۲)، با پروتئین‌های مایع منی ترکیب‌شده و یا مانع اتصال آن‌ها به غشای پلاسمایی اسپرم خواهند شد (Bergeron و همکاران، ۲۰۰۵). کلسترول نفوذپذیری غشاء اسپرم به مواد محافظ در برابر سرما را افزایش و آسیب‌های ناشی از تغییرات اسمزی را کاهش می‌دهد (Glazar و همکاران، ۲۰۰۹). مقادیر کم کلسترول در غشاء پلاسمایی اسپرم قوچ (۳۰۰ میکروگرم کلسترول در 10^9 اسپرماتوزوآ) احتمالاً دلیل حساسیت این سلول به کاهش ناگهانی دما است (Darin-Bennett and White، ۱۹۷۷).

حضور زرده‌تخم‌مرغ طی ذخیره‌سازی در سرما مانع از خروج کلسترول از غشا اسپرم می‌شود (Bergeron و همکاران، ۲۰۰۴) و از طریق جایگزینی فسفاتیدیل کولین به‌جای فسفولیپیدهای خارج‌شده از غشاء موجب پایداری غشای پلاسمایی اسپرم در طی مدت‌زمان ذخیره‌سازی آن می‌شود (Witte and Schafer-Somi، ۲۰۰۷). گزارش‌شده است که رقیق‌کننده تریس حاوی تخم اردک و غاز، اسپرم قوچ را در مقایسه با مرغ صنعتی بهبود بخشید (Maurice و همکاران، ۱۹۹۴)

در این آزمایش بیشترین مقدار تحرک در زمان یک، ۱۲ و ۲۴ مربوط به زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز بود. افزایش درصد تحرک ممکن است در اثر سطوح بالایی از پروتئین، لیپید و کلسترول در زرده باشد. این ترکیبات به‌طور فعال اسپرم را در مراحل مختلف سردسازی محافظت می‌کنند (Prasard و همکاران، ۱۹۸۸). سطوح بالای این ترکیبات در زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز ممکن است درصد تحرک اسپرم را باگذشت زمان طی فرآیند نگهداری در دمای پائین محافظت کند. تحرک اسپرم تحت تأثیر کاهش دما قرار گرفت و در طی آخرین زمان نگهداری (۲۴ ساعت) تقریباً به نصف کاهش یافت و با توجه به این‌که مهم‌ترین احتیاج سلول اسپرم به انرژی، برای قدرت تحرک است و اضافه نمودن منابع انرژی‌زایی نظیر قندها علاوه بر تأمین این احتیاج سلول می‌تواند باعث تمدید حیات اسپرم گردد و همچنین، زرده‌تخم‌مرغ نیز حاوی مقداری گلوکز و برخی دیگر قندها و ترکیبات قابل سوخت‌وساز برای اسپرم است (لطفیان، ۱۳۷۶)، منابع مختلف زرده ازجمله زرده‌تخم‌مرغ محلی، اردک و غاز دارای انرژی و کربوهیدرات بیشتری نسبت به زرده‌تخم‌مرغ صنعتی باشند و در طی زمان نگهداری از کاهش شدید تحرک جلوگیری می‌کنند. البته در زرده تخم قرقاول و بلدرچین هم انرژی و کربوهیدرات بیشتری نسبت به مرغ صنعتی وجود دارد اما نسبت به تخم اردک، غاز و مرغ محلی این مقادیر کمتر است (Prasard و همکاران، ۱۹۸۸).

1. Bovine seminal plasma

2. Low Density lipoprotein- Egg yolk

جدول ۱- تأثیر زرده‌های تخم پرندگان در رقیق‌کننده تریس بر درصد تحرک اسپرم (میانگین ± خطای معیار) قوچ عربی طی زمان‌های مختلف* نگهداری (۵°c)

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم	زمان چهارم
تخم‌مرغ صنعتی	۷۶/ ۳۳ ± ۱/۵۶	۶۵/۰۰ ± ۳/۵۰	۵۶/۶۸ ± ۲/۷۹	۲۸/۶۷ ± ۱/۵۶ c
تخم‌مرغ محلی	۸۱/ ۸۸ ± ۱/۸۷	۶۸/ ۷۵ ± ۲/۸۳	۶۱/۲۵ ± ۳/۰۴	۵۳/۷۵ ± ۲/۶۲ a
تخم اردک	۸۱/۲۵ ± ۱/۸۱	۷۲/۱۳ ± ۳/۲۵	۶۴/۷۵ ± ۳/۲۹	۵۵/۰۰ ± ۲/۸۹ a
تخم غاز	۸۱/۲۵ ± ۱/۸۶	۷۰/۶۳ ± ۲/۳۰	۶۲/۸۸ ±۳/۲۱	۴۹/۳۸ ± ۲/۳۰ ab
تخم قرقاول	۸۰/۰۰ ± ۲/۱۸	۶۴/۳۸ ± ۳/۶۹	۵۶/۰۰ ± ۵/۳۰	۴۳/ ۷۵ ± ۳/۴۱ b
تخم بلدرچین	۷۸/۷۵ ± ۱/۸۱	۶۸/۱۳ ± ۳/۱۸	۶۰/۶۳ ± ۲/۸۴	۴۵/ ۰۰ ± ۲/۸۹ b
سطح احتمال	۰/۲۴۸۶	۰/۳۳۳۵	۰/۳۳۹۰	۰/۰۰۰۱
SEM	۱/۶۲	۲/۷۲	۳/۰۸	۲/۳۵

a, b- میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM خطای استاندارد میانگین‌ها

*زمان‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار است

مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم پرندگان طی زمان‌های موردبررسی در جدول ۲ ارائه‌شده است. در زمان نخست (یک ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای زرده مشاهده نشد و به‌طور متوسط درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی در آن‌ها در حدود ۸۵/۰۸ درصد بود. درصد زنده‌مانی اسپرم باگذشت شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری در رقیق‌کننده حاوی تیمارهای مختلف زرده متفاوت بود (P<۰/۰۵). در زمان دوم (شش ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق-کننده) کمترین درصد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی زرده‌تخم‌مرغ صنعتی (۷۰/۰۰ درصد) مشاهده شد. همچنین درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ عربی در سایر تیمارهای زرده ازنظر آماری متفاوت نبود (P>۰/۰۵). باگذشت ۱۲ ساعت پس از نگهداری، بیشترین درصد زنده‌مانی مربوط به تخم اردک (۷۱/۸۸ درصد) بود که به‌طور معنی‌داری درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در این رقیق‌کننده بیشتر از تخم‌مرغ صنعتی (۶۱/۶۷ درصد) و تخم قرقاول (۶۵/۰۰ درصد) بود. بین تیمارهای تخم‌مرغ محلی (۶۹/۳۸ درصد)، غاز (۷۰/۰۰ درصد) و بلدرچین (۶۷/۰۰ درصد) اختلاف معنی‌داری ازنظر درصد زنده‌مانی اسپرم با تیمار تخم اردک (۷۱/۸۸ درصد) وجود نداشت (P>۰/۰۵). در زمان چهارم (۲۴ ساعت پس از نگهداری) بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم مربوط به زرده تخم اردک (۶۱/۸۸ درصد)، مرغ محلی (۵۹/۳۸ درصد) و غاز (۵۷/۵۰ درصد) و کمترین درصد زنده‌مانی مربوط به مرغ صنعتی (۳۹/۱۷ درصد) و قرقاول (۵۰/۶۳ درصد) بود. درصد زنده‌مانی در تیمار مرغ صنعتی از زمان اول تا زمان چهارم ۴۱/۶۶ درصد کاهش پیدا کرد. این کاهش درصد زنده‌مانی در سایر تیمارها به ترتیب ۲۷/۵ درصد (محلی)، ۲۶/۵ درصد (اردک)، ۲۸/۱۳ درصد (غاز)، ۳۱/۸۷ درصد (قرقاول) و ۳۰/۶۲ درصد (بلدرچین) بود (جدول ۲).

افزودن زرده‌تخم‌مرغ به منی قوچ در زمان کاهش دما تا پنج درجه سانتی‌گراد سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم شد (Fiser and Fairfull، ۱۹۸۶). از عوامل عمده کاهش کیفیت اسپرم نگهداری شده جهت تلقیح مصنوعی، انواع اکسیژن‌های واکنش‌پذیر (ROS)[2] می‌باشند که از عمده‌ترین آن‌ها می‌توان به رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید آنیون اشاره کرد (Funahashi and Sano، ۲۰۰۵). از طرفی مشخص‌شده است که نگهداری اسپرم در دماهای پایین تولید این ترکیبات را افزایش می‌دهد (Massaeli، ۱۹۹۹). تولید بیش‌ازحد ROS موجب آسیب ساختاری به غشاء و کاهش زنده‌مانی اسپرم می‌شود (Franco و همکاران، ۲۰۱۳)، تنش اکسیداتیو با کاهش سطح ATP درون‌سلولی، جنبایی اسپرم را

1. Reactive Oxygen Species
2. Hyper activation

کاهش می‌دهد و با آغاز پراکسیداسیون لیپید، موجب از دست رفتن سیالیت غشاء و توانایی باروری اسپرم می‌شود (Ball، ۲۰۰۸). ROS در مقادیر فیزیولوژیکی، مسئول حفظ فرآیندهای گوناگونی در اسپرم چون ظرفیت دار شدن، واکنش آکروزوم، هایپراکتیویشن[۲] و ادغام اسپرم با تخمک است (Almeida and Ball، ۲۰۰۵). خروج لیپیدها از غشاء سبب افزایش حساسیت اسپرم در برابر تغییرات القاشده در زمان سردسازی می‌شود(Witte and Schafer-Somi، ۲۰۰۷). به‌طورکلی یک رابطه بین مقدار اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای غشای اسپرم و حفاظت اسپرم در برابر شوک سرما وجود دارد (Poulos و همکاران، ۱۹۷۳). مشخص‌شده است که فسفولیپیدها و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده‌تخم‌مرغ (LDL-EY) می‌توانند اثر حفاظتی خود را به‌صورت مستقیم از طریق جایگزین شدن در غشاء (Trimeche و همکاران، ۱۹۹۶) و یا با ایجاد لایه‌ای در سطح غشاء (Quinn و همکاران، ۱۹۸۰) اعمال کنند؛ بنابراین بهبود زنده‌مانی اسپرم در حضور زرده‌تخم‌مرغ طی ذخیره‌سازی در دمای پائین احتمالاً به دلیل آثار حفاظتی LDL-EY و فسفولیپیدهای موجود در آن است. بعلاوه، کاروتن موجود در زرده‌تخم‌مرغ اثر مطلوبی بر فعالیت متابولیکی اسپرم دارد (Smith و همکاران، ۱۹۵۴) و سبب حفاظت از غشاء اسپرم در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و شوک سرمایی می‌شود (Purdi، ۲۰۰۶). نتایج بررسی حاضر نشان داد افزودن زرده‌های تخم پرندگان مختلف (مرغ محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین) طی زمان نگهداری در حالت مایع (دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) اثر مفیدی بر زنده‌مانی اسپرم نسبت به مرغ صنعتی داشت؛ که این افزایش اثر ممکن است به دلیل بیشتر بودن مقدار کاروتن و چربی این زرده‌ها باشد (Smith و همکاران، ۱۹۵۴).

جدول ۲- تأثیر زرده‌های تخم پرندگان در رقیق‌کننده تریس بر درصد زنده‌مانی اسپرم (میانگین ± خطای معیار) قوچ عربی طی زمان‌های مختلف* نگهداری (۵°c)

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم	زمان چهارم
تخم‌مرغ صنعتی	۸۰/۸۳ ± ۰/۸۳	۷۰/۰۰ ± ۲/۵۸ c	۶۱/۶۷ ± ۲/۴۷ c	۳۹/۱۷ ± ۲/۳۹ d
تخم‌مرغ محلی	۸۶/۸۸ ± ۱/۸۷	۷۸/۱۳ ± ۱/۵۲ ab	۶۹/۳۸ ± ۲/۳۰ ab	۵۹/۳۸ ± ۲/۵۴ ab
تخم اردک	۸۸/۳۸ ± ۱/۶۰	۸۲/۵۰ ± ۱/۵۴ a	۷۱/۸۸ ± ۱/۸۷ a	۶۱/۸۸ ± ۱/۵۲ a
تخم غاز	۸۵/۶۳ ± ۲/۷۷	۷۸/۳۸ ±۲/۷۹ ab	۷۰/۰۰ ±۲/۴۴ ab	۵۷/۵۰ ±۱/۵۴ ab
تخم قرقاول	۸۲/۵۰ ± ۲/۴۴	۷۵/۰۰ ± ۲/۴۴ ab	۶۵/۰۰ ± ۲/۸۹ bc	۵۰/۶۳ ± ۲/۰۲ c
تخم بلدرچین	۸۶/۲۵ ± ۲/۳۸	۷۶/۲۵ ± ۲/۳۸ a	۶۷/۰۰ ± ۲/۴۴ abc	۵۵/۶۳ ± ۲/۳۰ bc
سطح احتمال	۰/۰۸۴۳	۰/۰۰۵۳	۰/۰۳۲۰	۰/۰۰۰۱
SEM	۱/۸۴	۱/۹۵	۲/۰۹	۱/۸۰

a, b - میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM خطای استاندارد میانگین‌ها

* زمان‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار است

درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در هیچ‌یک از زمان‌های مورد ارزیابی تحت تأثیر رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم پرندگان مختلف قرار نگرفت. درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم باگذشت زمان (شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت) روندی صعودی را نشان داد و به‌طور متوسط از ۵/۱۴ درصد در زمان اول (یک ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده)، به ۶/۵۷ درصد در زمان دوم (شش ساعت پس از نگهداری) رسید. متوسط درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم قوچ عربی در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم پرندگان در زمان سوم به‌طور متوسط در حدود ۷/۷۳ درصد و در زمان چهارم در حدود ۸/۴۵ درصد بود (P>۰/۰۵)، درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در تیمار زرده‌تخم‌مرغ صنعتی از زمان اول تا زمان چهارم ۳/۱۶ درصد افزایش یافت که این افزایش در سایر تیمارها به میزان ۲/۸۸، ۳/۵، ۳/۳۸، ۳/۳۷ و ۳/۶۲ درصد به ترتیب در تیمار مرغ محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین بود (جدول ۳).

سردسازی و انجماد تغییر فازهای لیپیدی اسپرم را تحریک می‌کنند و به تغییر پایداری و ساختار غشاء می‌انجامند که با صدمه به اسپرم و

کاهش توانایی باروری همراه است (Wilhelm و همکاران، ۱۹۹۶). تولید بیش‌ازاندازه رادیکال‌های آزاد به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم می‌انجامد (Sarlos و همکاران، ۲۰۰۲). ازجمله خسارات پراکسیداسیون لیپید بر اسپرم را می‌توان به نقص‌های مورفولوژیکی، کاهش تحرک، کاهش باروری، کاهش سیالیت غشاء، کاهش عملکرد آکروزوم، تخریب کروماتین اسپرم و کاهش هم‌جوشی اسپرم با اووسیت اشاره کرد (Sonmez and Demirci، ۲۰۰۴). از دست دادن یکپارچگی غشاء باعث افزایش نفوذپذیری غشاء و توانایی نداشتن در تنظیم غلظت‌های درون‌سلولی یون‌های درگیر در کنترل حرکات اسپرم می‌شود (Baumber و همکاران، ۲۰۰۰). ترکیبات حاوی کیلات (مانند فسوتین، سرولوپلاسمین، اووآلبومین و اووترنسفرین) موجود در زرده‌تخم‌مرغ بااتصال به یون‌های فلزی آزاد مانع تولید ROS می‌شوند. همچنین پروتئینی شبیه به سوپر اکسید دیسموتاز خارج سلولی و پروتئین دیگری شبیه به گلوتاتیون پراکسیداز پلاسمایی در زرده‌تخم‌مرغ شناسایی‌شده است (Mann and Mann، ۲۰۰۸).

نتایج نشان دادند که زرده‌های تخم پرندگان مختلف (تخم‌مرغ صنعتی، محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین)، نتوانست اثر مثبتی بر ناهنجاری‌های مورفولوژیکی مورد ارزیابی در زمان‌های نگهداری ایجاد کنند که شاید به این دلیل باشد که آسیب‌های حاصل از کاهش دما و نگهداری اسپرم طی زمان (شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت)، بر میتوکندری، DNA و یا ساختار داخلی غشاء اسپرماتوزوآ ایجادشده باشد که با میکروسکوپ نوری و با روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین قابل‌رؤیت نباشد و این محافظت‌کننده تأثیری بر آسیب ظاهری سلول اسپرم نداشته باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که این ناهنجاری‌ها در طی اخذ اسپرم با شوک الکتریکی یا قبل از افزودن زرده‌های تخم پرندگان (تخم‌مرغ صنعتی، محلی، اردک، غاز، قرقاول و بلدرچین)، در طی فرایند رقیق‌سازی یا تهیه گستره ایجادشده باشند و دیگر به‌کارگیری زرده‌ها نتوانند در جهت رفع نقایص طی گذشت زمان برآیند (Kulaksız و همکاران، ۲۰۱۰).

به‌طورکلی بر اساس نتایج این مطالعه زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز در رقیق‌کننده تریس، ۲۴ ساعت پس از نگهداری اسپرم در محیط مایع (پنج درجه سانتی‌گراد)، منجر به بهبود درصد تحرک اسپرم قوچ عربی نسبت به سایر زرده‌ها شد. شش ساعت پس از اختلاط اسپرم با رقیق‌کننده، زرده تخم اردک، بلدرچین، مرغ محلی، غاز و قرقاول بیشترین اثر مثبت را بر درصد زنده‌مانی اسپرم قوچ نسبت به زرده‌تخم‌مرغ صنعتی داشتند. در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت نیز بیشترین درصد زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده تریس حاوی زرده تخم اردک و غاز و مرغ محلی مشاهده شد. ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با افزایش زمان نگهداری بیشتر شدند و استفاده منابع مختلف زرده نتوانست اثر معناداری بر آن ایجاد کند؛ بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از زرده تخم اردک، مرغ محلی و غاز نسبت به سایر زرده‌ها (مرغ صنعتی، قرقاول و بلدرچین) باعث بهبود کیفیت منی قوچ عربی در شرایط نگهداری مایع شود.

جدول ۳- تأثیر زرده‌های تخم پرندگان در رقیق‌کننده تریس بر درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم (میانگین ± خطای معیار) قوچ عربی طی زمان‌های مختلف* نگهداری (۵°c)

تیمار	زمان اول	زمان دوم	زمان سوم	زمان چهارم
تخم‌مرغ صنعتی	۵/۱۷ ± ۰/۵۳	۶/۱۷ ± ۰/۴۱	۷/۵۰ ± ۰/۳۳	۸/۳۳ ± ۰/۵۳
تخم‌مرغ محلی	۵/۵۰ ± ۰/۶۸	۷/۱۳ ± ۰/۲۹	۸/۱۳ ± ۰/۵۷	۸/۳۸ ± ۲/۳۸
تخم اردک	۴/۶۳ ± ۰/۵۶	۶/۰۰ ± ۰/۱۹	۷/۳۸ ± ۰/۷۸	۸/۱۳ ± ۲/۳۸
تخم غاز	۵/۲۵ ± ۰/۶۶	۶/۷۵ ± ۰/۵۳	۷/۸۸ ± ۰/۸۷	۸/۶۳ ± ۲/۳۴
تخم قرقاول	۵/۶۳ ± ۰/۷۳	۷/۲۵ ± ۰/۴۳	۸/۲۵ ± ۰/۶۵	۹/۰۰ ± ۲/۲۱
تخم بلدرچین	۴/۶۳ ± ۰/۵۴	۶/۱۳ ± ۰/۴۲	۷/۲۵ ± ۰/۸۴	۸/۲۵ ± ۲/۳۳
سطح احتمال	۰/۰۶۹۲	۰/۱۸۰۳	۰/۴۹۲۲	۰/۷۲۲۱
SEM	۰/۳۲	۰/۴۲	۰/۴۳	۰/۴۲

a, b- میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

SEM خطای استاندارد میانگین‌ها

* زمان‌های اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک، شش، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار است

منابع

جعفری آهنگری، ی. (۱۳۷۵). ارزیابی بافرهای سیترات، تریس و شیر نیمه پس چرخ گاو به‌منظور تعیین مناسب‌ترین آن‌ها جهت رقیق‌سازی و نگهداری اسپرم قوچ در شرایط مایع. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. ص. ۳۷.

ضمیری، م. ج. (۱۳۸۵). فیزیولوژی تولیدمثل(چاپ اول)، انتشارات دانشگاه شیراز.ص ص: ۱۲۰ – ۴۴۸.

لطیفیان، ف. (۱۳۷۶). انجماد اسپرم گاو در رقیق‌کننده شیر نیمه پس چرخ. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان اصفهان. ص. ۱۶۳.

Almeida, J. and Ball, B.A. (2005). Effect of α-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation inequene spermatozoa. *Animal reproduction science*. 87:321-377.

Ball, B.A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 107:257-267.

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.

Bergeron, A. and Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*. 73:1338–1344.

Bergeron, A. Villemure, M. Lazure, C. and Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction Development*. 71:461-470.

Bergeron, A. Crete, M. Brindle, Y. and Manjunath, P. (2004). Low-density lipoprotein fraction from hen's EY decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70:708–717.

Blom, E. (1983). Pathological conditions in the genital organs and in the semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. *Nordisk Veterinary Medicine*. 45:105-130.

Bucak, M.N.S. Sariozkan, P.B. Tuncer, P. Ulutas, A. and Akcadag, H.I. (2009). Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation, and antioxidant activities in angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 81:90-95.

Cunningham, J.G. (2002). Textbook of Veterinary Physiology. 3rd edition. Saunders Company WB, New York, USA.pp:1-10.

Darin-Bennett, A. and White, I.G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*. 14:466-70.

Evans, G. and Maxwell, W.M.C. (1987). Handling and examination semen. In: Maxwell, W.M.C, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney, Butter Worths. pp:93-106.

Fiser, P.S. and Fairfull, R.W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryiobiology*. 23:518-524.

Franco, J.S.V. Chaveiro, A. Góis, A. and Da Silva, F.M. (2013). Effects of α-tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33:787-793.

Funahashi, H. and Sano, T. (2005). Selected antioxidants improve the function of extender boar semen stored at 10 degr, C. *Theriogenology* 63:1605-1616.

Glazar, A.I. Mullen, S.F. Liu, J. Benson, J.D. Critser, J.K. Squires, E.L. and Graham, J.K. (2009). Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*. 59:201-206.

Gundogan, M. (2007) Seasonal variation in serum testosterone T3 and androgical parameters of Turkish sheep breeds. *Small Ruminants research*. 67:312-316.

Kulaksız, R. Cebi, C. Akcay, E. Das kın, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research.* 88:12–15.

Leboeuf, B. Restall, B. and Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62:113–141.

Mann, K. and Mann, M. (2008). The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. Proteomics. 8:178-191.

Massaeli, H. Sobrattee, S. and Pieree, G.N. (1999). The importance of lipid solubility in antioxidants and free radical.generating systems for determining lipoprotein peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine.* 26:1524-1530.

Manjunath, P. and I. The´rien. 2002. Role of seminal plasma phospholipid binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal Reproduction Immunology*. 53:109–119.

Maurice, D.V. Lightsey, S.F. Hsu, K.T. Gaylord, T.G. Reedy, R.V. 1994. Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chemistry*. 50:367–372.

Poulos, A. Darrin-Bennet, A. and White, I.G. (1973). The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 46:41–549.

Prasard, R.V. Sreenivas Reedy, M. Dhananjaya Reedy, B. and Rao, P.V.A. (1988). A comparative study on the quality of fresh chicken and duck eggs. *Indian Journal Animal Science*. 8:978–981.

Purdi, P.H. (2006). A review on goat cryopreservation. *Small Ruminant Research.* 63:215-225.

Quinn, P.J. Chow, P.Y. and White, I.J. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal Reproduction Fertility.* 60:403–407.

Quinn, P.J. White, I.J. and Cleland, K.W. (1969). Chemical and ultra structural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal Reproduction Fertility*. 18:209-220.

Sarlos, P. Molnar, A. and Kokai, M. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica.* 50:235-245.

SAS, Institute. (1996). SAS/STAT User's Guide. Release 9.1. SAS Inst, Inc, Cary, NC.

Secer, S. Tekin, N. Bozkurt, Y. Bukan, N. and Akcay, E. (2004). Corrlation between biochemical and spermatological parameter in Rainbow trout semen. *Aquaculture.* 56:274–280.

Smith, J.T. Mayer, D.T. and Herman, H.A. (1954). A comparison of the ability of certain egg yolk diluents to maintain optimum osmotic conations during the storage of bull semen. *Journal of Dairy Science.* 37:684-690.

Sonmez, M. and Demirci, E. (2004). The effect of ascorbic acid on the freeze ability of ram semen diluted with extenders. Containing different proportions of glycerol. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science.* 28:893-899.

Trimeche, A. Anton, A.M. Renard, P. Gandemer, G. and Tainturie, D. (1996). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology.* 34:385–393.

Vishwanath, R. Shannon, P. and Curson, B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Animal Reproduction Science.* 29:185-194.

Watson, P.F. and Martin, I.C.A. (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5C. *Australian Journal of Biological Sciences*. 28:145-52.

Wilhelm, K. Graham, J. and Squires, E. (1996). Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology.* 46:559-578.

Witte, T.S. and Schafer-Somi, S. (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 102:181–193.