

Effect of tris-based diluent on beta-carotene-enriched egg yolk on liquid storage of ram sperm

A Hashtroudi¹, Gh Moghaddam^{2*}, H Daghigh Kia² and B Qasemi Panahi³

Received: 25.2.2023

Accepted: 26.2.2024

¹ MSc 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: Email: ghmoghaddam@tabrizu.ac.ir

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research	Journal of Animal Science Research / vol.35 No.1/ 2025/pp 15-26 https://animalscience.tabrizu.ac.ir	OPEN ACCESS
© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2024.55526.1696		

Introduction: Sperm cooling is very important to preserve the genetic capacity of livestock and animals that have a high economic value and to preserve some species of rare animals or animals at risk of extinction, and the researchers of Royan Jihad University Research Institute have implemented this plan and its results were published in the journal Journal of Equine Veterinary Science have published. The cooling of sperm causes a disturbance in its qualitative traits. The use of egg yolk prevents metabolic changes and preserves the quality of sperm (Purdy 2006). In order to reduce the damage caused by sperm freezing, cryoprotectants are used in sperm diluents (Purdy 2006). Which is one of the most common components of egg yolk sperm diluents that protect sperm against cold shock (Aisen et al. 2000). Which consider lipoproteins and lecithin in egg yolk to be the most important protective factors for sperm. Semen diluents dilute the seminal plasma, control the pH and osmolarity and provide the necessary nutrients for the sperm and protect it against cold shock during the cooling and storage of the sperm. The properties of adding a diluent to the semen are increasing the length of the life period, protecting the motility and fertility, and keeping the sperm for a long time. The aim of this study was to determine the effect of using beta-carotene-enriched egg yolk on the quality of liquid sperm.

Material and methods: For this purpose, a total of 15 ejaculations from 3 rams were collected by artificial vagina. At first, sperm were collected for 3 weeks for habituation. After the habituation period of the rams, sperm samples were collected and evaluated. In the first group, a diluent containing ordinary egg yolk was used to cool the sperm, and in the second group, a diluent containing beta-carotene-enriched egg yolk was used. Sperm quality parameters were assessed on days 1, 5, 10, 15 and 20 after cooling. The samples were examined in two stages: A) examining the characteristics of fresh sperm: the characteristics include sample volume (using a special sperm collection tube with an accuracy of 0.1 ml), semen pH (using a paper pH meter from Merk, Germany), movement Wavy (by light microscope with $\times 100$ magnification), progressive, in situ and whole sperm movements (by diluting the fresh sample at a ratio of 1:100 with 2.9% sodium citrate and examining with a light microscope with $\times 400$ magnification), Viability and percentage of abnormal sperms (by diluting the fresh sample at a ratio of 1 to 100 with 2.9% sodium citrate and expanding with eosin-nigrosin and examining with a light microscope at 400x magnification), sperm concentration or density (dilution of the fresh sample with citrate Sodium 2.9% at a ratio of 1 to 300 + one drop of formalin 2% and

examination by hemocytometer slide) and sperm morphobiometry (a drop of diluted sperm solution with sodium citrate 2.9% at a ratio of 1 to 100 is expanded with eosin-nigrosin. The data were examined under a light microscope with 400× magnification in 5 different areas) and measured. B) Examining the characteristics of diluted sperm: After the cooling stage, progressive motility, in situ motility, total motility, sperm viability, sperm morphology or abnormality, and morph biometry were performed as the methods mentioned above. In addition to these traits, host tests or the health and integrity of the sperm membrane, the unhealthy acrosome membrane, morph biometry and MDA were measured in the following order. HOST (sperm membrane health and integrity): To evaluate the health and integrity of the sperm membrane, a hypoasmatic solution was used in such a way that 10 microliters of the chilled sample was diluted with 100 microliters of HOST solution and kept at 37°C for 30 minutes. They were incubated, then using a sampler, a drop of the incubated solution was placed on a slide at 37°C, and a spread was prepared with a drop of eosin-nigrosin dye, and after drying the prepared spread with a gentle blow of a hair dryer, the spread was prepared with magnification. 400x was checked and percentage in light microscope. Unhealthy acrosome membrane: To identify sperms with unhealthy acrosome membrane, put 10 microliters of a solution diluted 1:100 with 2.9% sodium citrate on a 37°C slide and add 10 microliters of eosin-nigrosin on it. Then, a spread was prepared with another slide, and after drying the prepared spread with a gentle blow of a hair dryer, 1 drop of cedar oil was placed on it, and under a light microscope with 1250x magnification, the number of sperms with an unhealthy acrosome membrane was determined and percentages were determined. MDA: To measure the amount of malondialdehyde in the beginning to precipitate proteins, 1 ml of the sample of each group was mixed with 2 ml of trichloroacetic acid in a sterile tube on the final day of the experiment, and then to prevent lipid peroxidation during the experiment, 1 ml of BHT solution along with 1 ml of EDTA were added to the desired solution and then the tubes were centrifuged for 15 minutes at ×1200 rotation. 1 ml of thiobar biothiouric acid 0.67% was mixed and placed in 95°C water for 20 minutes, and after cooling, the light intensity of the samples was measured at a wavelength of 532 nm by a spectrophotometer. Data were statistically analyzed by proc mixed procedure in SAS software.

Results and discussion: The results showed that beta-carotene treatment had a significant positive effects on progressive motility, total motility, viability, abnormal sperm, HOST, acrosome membrane integrity ($P<0.05$), and were decreased significant MDA and abnormal sperm ($P<0.05$). According to the results, beta-carotene-enriched egg yolk increases sperm quality parameters during storage. Because one of the most important protective factors for sperm is lipoprotein and lecithin in the egg yolk, and in addition, because the egg yolk is enriched with an antioxidant called beta-carotene, which is one of the types of pro-vitamins and a precursor for vitamin A, it prevents from the production and increase of free radicals and has a double positive effect on sperm quality, and in addition to protecting sperm from cold shock, it improves and preserves sperm fertility and also increases sperm quality characteristics (Shafiipour Fard et al. 2017). Antioxidants are expected to affect sperm production and quality by quenching excess reactive oxygen species (ROS) produced by rapidly dividing spermatogonia in the testis (Tomar et al. 2017). Accumulation of ROS causes oxidative stress and reduces the body's ability to detoxify or repair the resulting damage (Agarwal et al. 2004). Antioxidant beta-carotene neutralizes ROS and reduces oxidative stress. As more time passed, the quality of the samples decreased. For successful insemination in the cervix, 150 million live and motile sperm are required, and for successful insemination by laparoscopic method, 20 million live and motile sperm are required (Evans and Maxwell 1987) and according to the results obtained from this research, up to 20 days After freezing, the qualitative parameters of sperm have been checked, for successful insemination in the cervix, refrigerated samples must be used up to 10 days after refrigeration, and for successful insemination by laparoscopic method, refrigerated samples can be used up to 15 days after refrigeration.

Keywords: Sperm, Diluent, Ram, Beta-Carotene, Cooling

اثر رقیق‌کننده بر پایه تریس حاوی زرده تخم‌مرغ غنی شده با بتاکاروتن روی کیفیت اسپرم قوچ طی فرایند سردسازی

عسل هشت‌رودی^۱، غلامعلی مقدم^{۲*}، حسین دقیق‌کیا^۲، بابک قاسمی پناهی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۷

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

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

چکیده

زمینه مطالعاتی: عمل سردسازی اسپرم سبب به وجود آمدن اختلال در صفات کیفی آن می‌شود. بکارگیری از زرده تخم‌مرغ سبب جلوگیری از تغییرات متابولیکی و کاهش صفات کیفی اسپرم می‌شود. هدف: انجام این پژوهش تعیین اثر استفاده از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن روی کیفیت اسپرم سردسازی شده قوچ نژاد قزل بود. روش کار: برای این منظور در مجموع تعداد ۱۵ انزال از ۳ رأس قوچ بالغ ۳ الی ۴ ساله، توسط واژن مصنوعی جمع‌آوری گردید در گروه اول برای سردسازی اسپرم از رقیق‌کننده بر پایه تریس حاوی زرده تخم‌مرغ معمولی و در گروه دوم از رقیق‌کننده بر پایه تریس حاوی زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن استفاده شد. در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از سردسازی، پارامترهای کیفی اسپرم شامل pH، درصد تحرک پیش‌رونده، تحرک درجا، تحرک کل، زنده‌مانی، عدم سلامت غشای آکروزوم و سلامت غشای اسپرم بررسی گردید و اثرات بتاکاروتن روی پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در پلاسمای منی نیز اندازه‌گیری شد. داده‌ها توسط رویه proc mixed در SAS online مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج: نتایج نشان داد که تیمار بتاکاروتنی روی حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی، سلامت غشای اسپرم و MDA اثر معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) همچنین مدت زمان اسپرم‌گیری روی حرکت درجا، حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم اثر معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به نتایج بدست آمده، بکارگیری زرده تخم‌مرغ غنی شده با بتاکاروتن در رقیق‌کننده بر پایه تریس، بعنوان جایگزین برای زرده تخم‌مرغ معمولی، سبب افزایش حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم در اسپرم مایع می‌شود و همچنین سبب کاهش درصد اسپرم غیر طبیعی و MDA در اسپرم مایع می‌شود، در نتیجه سبب افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم در طول مدت نگهداری اسپرم می‌شود.

واژگان کلیدی: اسپرم، رقیق‌کننده، قوچ، بتاکاروتن، سردسازی

مقدمه

و بیوشیمیایی به اسپرماتوزوئیدها می‌شود و به دنبال این امر، نسبت اسپرماتوزوئیدهای متحرک و زنده و همچنین قدرت باروری اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (دهامی و

طی فرآیند سردسازی اسپرم تغییرات دمایی روی نمونه اسپرم تازه گرفته شده به وجود می‌آید که این تغییرات دمایی باعث وارد شدن آسیب‌های ساختاری، عملکردی

کوداقالی (۱۹۹۰). در این صورت، به منظور کاهش آسیب‌های ناشی از سردسازی اسپرم، از محافظت‌کننده‌های انجمادی در رقیق‌کننده اسپرم استفاده می‌گردد (پاردی ۲۰۰۶). یکی از معمول‌ترین اجزای رقیق‌کننده‌های اسپرم زرده تخم‌مرغ است که از اسپرم در مقابل شوک سرمایی محافظت می‌نماید (آیسن و همکاران ۲۰۰۰). مهم‌ترین عامل محافظت‌کننده‌ی اسپرم را لیوپروتئین و لیسیستین موجود در زرده تخم‌مرغ می‌دانند (آمیرات و همکاران ۲۰۰۴، برگرون و مانجوناس ۲۰۰۶). ولی اینکه با چه مکانیسمی زرده تخم‌مرغ به زنده‌مانی اسپرم در طی فرآیندهای شوک سرمایی کمک می‌کند هنوز به طور دقیق شناخته نشده است ولی چند فرضیه در این مورد ارائه شده است که شامل ۱- لیوپروتئین‌های با چگالی کم (LDL) با استحکام بخشیدن به غشاء، اسپرم را در برابر سرما محافظت می‌کند (فولکس و همکاران ۱۹۸۰، مکدونالد و فولکس ۱۹۸۱) و فسفولیپیدهای موجود در LDL، لایه‌ی محافظتی بر سطح غشای اسپرم ایجاد می‌کنند (کوئین ۱۹۸۰). ۲- LDL با پپتیدهای کاتیونی که با غشای اسپرم باند می‌شوند و زیان‌بار نیز هستند رقابت می‌نمایند (ویشواناس و همکاران ۱۹۹۲). ۳- خانواده‌ای از پروتئین‌های باند شونده با لیپیدی به نام BSP^۱ یا همولوگ‌های آن با LDL اثر متقابل برقرار کرده و می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر روی یکپارچگی غشای اسپرم حفاظت شده داشته باشد (برگرون و مانجوناس ۲۰۰۶). و اگر زرده تخم‌مرغ با یک آنتی‌اکسیدانی مثل بتاکاروتن، که یکی از انواع پرو ویتامین و ماده پیش‌ساز برای ویتامین A است و سبب جلوگیری از تولید و افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود، غنی‌سازی شده باشد تأثیر مثبت دو چندانی روی کیفیت اسپرم می‌گذارد و علاوه بر محافظت از شوک سرمایی باعث بهبود و حفظ باروری اسپرم و همچنین باعث افزایش صفات کیفی اسپرم می‌شود (شفیعی پور فرد و همکاران ۱۳۹۷).

انتظار می‌رود که آنتی‌اکسیدان‌ها بر تولید و کیفیت اسپرم با خاموش کردن گونه‌های اکسیژن فعال اضافی (ROS) تولید شده توسط تقسیم سریع اسپرماتوگونی در بیضه‌ها تأثیر بگذارد (تومار و همکاران ۲۰۱۷). تجمع ROS باعث استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت بدن برای سم‌زدایی یا ترمیم آسیب ناشی از آن می‌شود (آگاروال و همکاران ۲۰۰۴). آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند بتاکاروتن می‌تواند ROS ها را خنثی کرده و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. تصور می‌شود که اسپرم به دلایل مختلفی در برابر آسیب اکسیداتیو آسیب پذیر است (آلمبرو ۲۰۱۱). پس از انزال اسپرم‌ها بسیار متحرک هستند و مقادیر زیادی ROS تولید می‌کنند و در عین حال حرکت تاژک‌ها را حفظ می‌کنند (استوس و همکاران ۱۹۸۳). اسپرم تقریباً هیچ آنتی‌اکسیدان آنزیمی برای سم‌زدایی ROS ندارد و در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت نمی‌شود (آگاروال و همکاران ۲۰۰۴). بنابراین توصیه می‌شود برای جلوگیری از آسیب‌های ذکر شده روی اسپرم، در رقیق‌کننده‌های اسپرم از یک نوع آنتی‌اکسیدان مانند بتاکاروتن استفاده شود. در نتیجه می‌توان با بکارگیری یک رقیق‌کننده‌ی مناسب با ترکیبات محافظت‌کننده بر مشکل کاهش صفات کیفی اسپرم در پی سردسازی اسپرم غلبه کرد و گام مؤثری در این عرصه برداشت. در نتیجه هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر رقیق‌کننده بر پایه تریس حاوی زرده تخم‌مرغ غنی شده با بتاکاروتن روی صفات حرکت پیش‌رونده، حرکت درجا، حرکت کل، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی، آکروزوم غیرطبیعی، سلامت غشای اسپرم و تست مالون دی آلدئید اسپرم مایع قوچ قزل بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز واقع در جاده باسمنج انجام شد. محل نگهداری قوچ‌ها و میش محرک، در تمام طول دوره ی طرح تحقیقاتی در یک سالن سرپوشیده بود.

¹ Bovine Seminal Plasma

دام‌های تحت آزمایش

قبل از شروع کار، قوچ‌ها به مدت ۲-۳ هفته به منظور عادت‌دهی، با واژن مصنوعی در حضور اپراتور (شخص اسپرم‌گیر) اسپرم‌گیری شدند، بعد از عادت‌دهی قوچ‌ها، نمونه‌گیری و آزمایشات شروع شد. در این تحقیق از ۳ رأس قوچ قزل بالغ (۳ الی ۴ ساله)، در فصل تولیدمثلی استفاده شد.

برای اسپرم‌گیری قوچ، از واژن مصنوعی استفاده شد که مخزن واژن مصنوعی ابتدا با آب ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد پر شد و یک میش سالم به عنوان تیزر در جایگاه اسپرم‌گیری قرار گرفت و به وسیله واژن مصنوعی مخصوص گوسفند و با رعایت اصول بهداشتی اسپرم‌گیری انجام گرفت و برای ممانعت از آسیب به اسپرم‌ها پس از نمونه‌گیری، باید اسپرم‌ها را دور از نور و سرما قرار داد، که برای این منظور با یک کاور واژن مصنوعی، نمونه‌های گرفته شده را پوشانده و در نهایت نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال و ارزیابی شدند.

صفات کمی و کیفی مورد ارزیابی و روش کار انجام آزمایش‌ها

الف) بررسی صفات اسپرم تازه

بعد از اسپرم‌گیری، نمونه‌ها هر چه سریع‌تر به آزمایشگاه منتقل شدند و صفات شامل، حجم نمونه، pH منی، حرکت موجی، حرکت‌های پیش‌رونده، درجا و کل اسپرم، زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی، غلظت یا تراکم اسپرم و مورفوبیومتری اسپرم‌ها اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری حجم نمونه:

برای بررسی حجم اسپرم نمونه‌گیری شده از لوله‌های مدرج با دقت ۰/۱ میلی‌لیتر استفاده شد و حجم منی قوچ به عوامل مختلفی از جمله سن، شرایط نگهداری، بسامد اسپرم‌گیری، مهارت اپراتور و تغذیه قوچ بستگی دارد که حجم نمونه‌های منی گرفته شده بیش از ۱/۵ میلی‌لیتر بود. بعد از بررسی صفات اسپرم تازه و مورد تأیید واقع

شدن تمام آزمایشات و دارا بودن استانداردهای لازم نمونه‌های اسپرم (حجم حداقل ۱ میلی‌لیتر، تراکم بالای ۳ میلیارد اسپرم و حرکت پیش‌رونده بالای ۷۵ درصد)، به مرحله سردسازی رفتند.

اندازه‌گیری pH نمونه:

برای ارزیابی pH از استریپ‌های pH متر (نوارهای کاغذی pH متر شرکت MERCK آلمان) استفاده شد و با توجه به اینکه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای فعالیت متابولیکی بسیار بالایی است لذا ضرورت داشت که pH منی بلافاصله بعد از اسپرم‌گیری و قبل از تغییر دمای مناسب و pH انجام گیرد.

اندازه‌گیری حرکت موجی:

یکی از آزمایش‌هایی که سریعاً پس از اسپرم‌گیری باید انجام شود بررسی حرکت موجی اسپرم است که شاخص مناسبی برای دیگر صفات نمونه است. برای محاسبه حرکت موجی یک قطره از نمونه منی رقیق نشده و تازه را روی لام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰× بررسی کرده و از ۱ تا ۵ نمره داده شد.

اندازه‌گیری تحرک‌های پیش‌رونده و درجا:

برای بررسی درصد حرکت پیش‌رونده و حرکت درجا، نمونه منی تازه را با نسبت ۱ به ۱۰۰ با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد که قبلاً به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شده بود رقیق کرده و یک قطره از اسپرم رقیق شده را با سمپلر^۲ روی لام ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته و روی آن یک لامل ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× در ۷ الی ۸ ناحیه مختلف و تمام اسپرم‌های موجود در هر ناحیه را بررسی و از ۱ تا ۱۰۰، درصددهی برای اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده انجام شد.

اندازه‌گیری حرکت کل:

برای به‌دست آوردن تحرک کل اسپرماتوزوئید محاسبه مجموع حرکت پیش‌رونده و حرکت درجا است که حاصل آن حرکت کل اسپرم می‌شود که این عدد نیز برحسب درصد بیان می‌شود.

اندازه‌گیری زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی:

برای بدست آوردن درصد اسپرم‌های مرده و زنده و درصد اسپرم‌های غیر طبیعی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شده و برای این منظور با استفاده از سمپلر یک قطره از محلول رقیق‌شده اسپرم با سیترات سدیم ۲/۹ درصد که قبلاً به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شده، را با نسبت ۱ به ۱۰۰ روی لام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و روی آن یک قطره از رنگ ائوزین-نیگروزین که قبلاً به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، قرار داده شد و سپس با یک لام دیگری گسترش تهیه شد و با سشوار گسترش تهیه‌شده به سرعت خشک شد و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ در ۵ ناحیه مختلف تمامی اسپرم‌ها بررسی و با شمارش آن‌ها درصددهی انجام شد. تشخیص اسپرم‌های زنده و مرده به این صورت است که اسپرم‌های مرده به دلیل تغییر در ساختار غشاء رنگ ائوزین-نیگروزین را به خود جذب کرده و سر اسپرم‌ها رنگ بنفش یا قرمز به خود می‌گیرند در حالی‌که اسپرم‌های زنده چون دارای غشای سالمی هستند مانع ورود رنگ به غشاء می‌شوند و سر اسپرم‌های سالم بدون رنگ باقی می‌ماند.

اندازه‌گیری غلظت یا تراکم:

برای بررسی میزان غلظت اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی از لام توما استفاده شد که در ابتدا نمونه با نسبت ۱ به ۳۰۰ با محلول سیترات سدیم ۲/۹ درصد که قبلاً به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده شده بود، رقیق شد و سپس یک قطره از فرمالین ۲ درصد به محلول فوق اضافه شد تا اسپرم‌ها بمیرند و در زیر میکروسکوپ ثابت بمانند و حرکت نکنند تا عمل شمارش به راحتی انجام

شود سپس یک عدد لامل را بر روی لام توما گذاشته و ۱۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده با استفاده از سمپلر زیر لامل پخش شد و اسپرم‌های موجود در ۵ مربع بزرگ (۸۰ مربع کوچک) در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ شمارش شدند. در مورد اسپرم‌های موجود بر روی اضلاع ۵ مربع بزرگ، فقط اسپرم‌هایی شمارش شدند که روی دو ضلع قرار داشتند (احمدیان، ۱۳۹۳)، بنابراین با این روش تعداد اسپرماتوزوئید در یک میلی‌لیتر بدست آمد و این غلظت بدست آمده را در حجم انزال ضرب کرده و تعداد کل اسپرماتوزا در آن حجم از انزال بدست آمد.

اندازه‌گیری مورفوبیومتری:

برای این منظور از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد یک قطره از محلول رقیق‌شده اسپرم با سیترات سدیم ۲/۹ درصد با نسبت ۱ به ۱۰۰ را روی لام ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و روی آن یک قطره رنگ ائوزین-نیگروزین گذاشته و با یک لام دیگر گسترش شد و بعد از خشک‌شدن گسترش داده شده با باد ملایم سشوار، گسترش تهیه‌شده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ در ۵ ناحیه مختلف بررسی شدند و بر این اساس طول سر اسپرم، طول دم اسپرم، طول کل اسپرم و عرض سر اسپرم در زیر میکروسکوپ اندازه‌گیری شدند.

- روش تهیه رقیق‌کننده بر پایه تریس

جهت تهیه رقیق‌کننده بر پایه تریس ۲/۷۱ گرم تریس، ۱ گرم اسید سیتریک، ۱/۴ گرم فروکتوز و ۱۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند.

- روش تهیه رقیق‌کننده نهایی برای سردسازی

نمونه‌های اسپرم

رقیق کننده ۱: ۷۳ میلی‌لیتر رقیق‌کننده بر پایه تریس، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول و ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ معمولی رقیق کننده ۲: ۷۳ میلی‌لیتر رقیق‌کننده بر پایه تریس، ۷ میلی‌لیتر گلیسرول و ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ غنی شده با بتاکاروتن

نتیجه دم اسپرم های دارای غشای پلاسمایی سالم متورم شده و پیچ می خورند و به این اسپرم ها HOST مثبت اطلاق می شود در حالی که دم اسپرم هایی که دارای غشای ناسالم هستند متورم نمی شود و دم آن ها حالت مستقیم دارد و به آن ها HOST منفی اطلاق می شود.

- **عدم سلامت غشای آکروزوم:** برای مشخص کردن اسپرم ها با عدم سلامت غشای آکروزوم ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ با سیترات سدیم ۲/۹ درصد را روی لام ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته و روی آن ۱۰ میکرولیتر ائوزین-نیگروزین اضافه کرده و سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه شد و بعد از خشک شدن گسترش تهیه شده با باد ملایم سشوار، ۱ قطره روغن سدر روی آن گذاشته و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۲۵۰× تعداد اسپرم ها با عدم سلامت غشای آکروزوم مشخص شد و درصدهای شدند.

- **MDA:** برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید در ابتدا برای رسوب پروتئین ها میزان ۱ میلی لیتر از نمونه ی هر گروه در روز نهایی آزمایش با ۲ میلی لیتر اسید تری کلرو استیک در یک لوله استریل مخلوط شد و سپس برای جلوگیری از وقوع پراکسیداسیون لیپیدی در طی زمان انجام آزمایش، مقدار ۱ میلی لیتر از محلول BHT به همراه ۱ میلی لیتر از EDTA به محلول مورد نظر افزوده شدند و سپس لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰× سانتیفریوژ شدند بعد از به اتمام رسیدن سانتیفریوژ، ۱ میلی لیتر از محلول شفاف بالایی هر لوله را برداشته و با ۱ میلی لیتر از تیوبار بیوتیوریک اسید ۰/۶۷ درصد مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در آب ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و پس از خنک شدن، میزان نور نمونه ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

تجزیه آماری

داده های حرکت پیش رونده، حرکت درجا، حرکت کل، زنده مان، غیر طبیعی بودن اسپرم، هاست (سلامت

سپس ۶ میلی لیتر از هر کدام از رقیق کننده های شماره ۱ و ۲ را با ۱ میلی لیتر از اسپرم تازه مخلوط کرده و از هر کدام ۵ میکروتیوب حاوی نیم میلی لیتر مخلوط رقیق کننده با اسپرم تهیه شد و سپس به مرحله سردسازی انتقال داده شدند.

مرحله سردسازی به این ترتیب است که میکروتیوب های آماده شده به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و نمونه های اسپرم در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بعد از سردسازی ارزیابی گردیدند.

ب) بررسی صفات اسپرم سردسازی شده

بعد از مرحله سرد سازی، حرکت پیش رونده، حرکت درجا، حرکت کل، زنده مان، اسپرم ها، مورفولوژی یا غیر طبیعی بودن اسپرم ها و مورفوبیومتری همانند روش های ذکر شده در بالا، انجام گرفت.

علاوه بر این صفات، آزمایش هاست یا سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم، عدم سلامت غشای آکروزوم، مورفوبیومتری و MDA به ترتیب زیر، اندازه گیری شدند.

- **هاست (سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم):** برای ارزیابی سلامت و یکپارچگی غشای اسپرم از محلول هیپواسمتیک استفاده شد به این صورت که ۱۰ میکرولیتر از نمونه سردسازی شده با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول هاست رقیق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند سپس به وسیله سمپلر یک قطره از محلول انکوبه شده بر روی لام ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد و با یک قطره از رنگ ائوزین-نیگروزین گسترش تهیه شد و پس از خشک کردن گسترش تهیه شده با باد ملایم سشوار، خشک شد و با بزرگنمایی ۴۰۰× در میکروسکوپ نوری بررسی و درصدهای شد و طرز تشخیص اسپرم های دارای غشاء سالم از نا سالم به این صورت است که وقتی محلول هیپواسمتیک وارد اسپرم می شود سلول اسپرم سعی می کند بین محیط بیرونی و درونی توازن برقرار کند در

غشای سیتوپلاسم)، عدم سلامت غشای آکروزوم، پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) و بیومتری اسپرم در قالب طرح اندازه‌گیری‌های مکرر با استفاده از رویه Proc Mixed به وسیله نرم افزار آماری SAS آنالیز و سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی انجام شدند.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج حاصل از جداول ۱ و ۲، در صورت استفاده از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن در

رقیق‌کننده بر پایه تریس به جای زرده تخم‌مرغ معمولی، برخی صفات مورد آزمایش مثل حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی و مقدار هاست افزایش پیدا کردند و مقادیر اسپرم‌های غیرطبیعی، عدم سلامت غشای آکروزوم و MDA کاهش پیدا کردند و به طور کلی کیفیت اسپرم‌ها با بکارگیری از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن در محیط رقیق‌کننده بر پایه تریس افزایش یافت.

Table 1- Descriptive statistics of semen qualitative traits before dilution.

Variation	Number	Mean	Std Dev.	Minimum	Maximum
Volume (ml)	15	1.64	0.25	1.5	2
pH	15	7.5	0.5	6.5	8
Density ($\times 10^9$)	15	5.8	1.42	4	8
Wave Motion (1-5)	15	4.9	0.20	4.5	5
Progressive Motion (%)	15	92.2	4.36	80	98
Place Motion (%)	15	0.66	1.75	0	5
Total Motion (%)	15	92.86	4.35	80	98
Survival (%)	15	92.66	3.19	85	95
Abnormal Sperm (%)	15	5	4.22	0.5	15
Head Length (%)	15	3.26	0.45	3	15
Tail Length (%)	15	11	1.46	9	15
Total Length (%)	15	14.2	1.82	11	15
Head Width (%)	15	2.53	0.51	2	15

آمار توصیفی صفات کیفی منی قبل از رقیق‌سازی، در جدول ۱ آورده شده است، در آزمایش حاضر در کل ۱۵ انزال از ۳ قوچ جمع‌آوری شده و از نظر صفات حجم، pH، غلظت، حرکت موجی، حرکت پیش‌رونده، حرکت درجا، حرکت کل، زنده‌مانی (درصد اسپرم‌های زنده)، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (مورفولوژی) و صفات بیومتری اسپرم بررسی شدند. داده‌های موجود در منی تازه در دامنه‌ی نرمال بوده و چون استانداردهای لازم را داشتند وارد مرحله سردسازی شدند، که این نتایج با داده‌های گزارش شده توسط رنگرز توکلی و همکاران (۱۳۹۵)، ناطق کندرود و همکاران (۱۴۰۰)، لسا و همکاران (۲۰۱۸)، تیزکار و همکاران (۲۰۱۵)، جامه و همکاران

(۲۰۲۳)، هودا و همکاران (۲۰۲۰) و دانجکیو و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت. تنوع موجود در صفات کمی و کیفی اسپرم قوچ تازه و سردسازی شده، می‌تواند بازتاب تاثیر طیف گسترده‌ای از عوامل فیزیولوژیکی، ژنتیکی، محیطی و تغذیه‌ای باشد که ممکن است روی تولید اسپرم اثرگذار باشند. از عوامل مؤثر بر ویژگی‌های بیولوژیکی منی (حجم، غلظت، تحرک، اسپرم‌های غیرطبیعی و طبیعی و ...) فصل، سن، نژاد، قوچ تکرار انزال و فاصله‌ی بین انزال‌های جمع‌آوری شده، محیط (طول روز، دما و رطوبت) و مدیریت می‌باشد (دولتی دورباش و همکاران، ۱۳۹۵).

Table 2- Descriptive statistics of seminal quality parameters after dilution.

Variation	Number	Mean	Std Dev.	Minimum	Maximum
pH	145	46.48	29.85	20	95
Density ($\times 10^9$)	145	4.51	4.01	1	8
Wave Motion (1-5)	145	51	28.65	5	95
Progressive Motion (%)	145	59.96	24.87	15	95
Place Motion (%)	145	3.96	4.52	0	20
Total Motion (%)	145	26.48	14.22	5	70
Survival (%)	145	5.34	5.38	0	25
Abnormal Sperm (%)	145	2.90	1.02	0.59	6.06
Head Length (%)	145	2	5	3.84	0.73
Tail Length (%)	145	5	22	10.92	3.39
Total Length (%)	145	8	26	14.68	3.64
Head Width (%)	145	1	3	2.19	0.62

Table 3- Effects of Treatment, Time and interaction effects of Treatment $\times$ Time on sperm qualitative parameters

Effect	Progressive Motion (%)	Place Motion (%)	Total Motion (%)	Survival (%)	Abnormal Sperm (%)	HOST (%)	MDA (μ m)
Treatment	*	NS	*	*	*	*	*
Time	*	*	*	*	NS	*	NS
Treatment $\times$ Time	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

*Significance at the 0.05 level ($P < 0.05$), NS= Non-significant

افزایش فراسنجه‌های کیفی اسپرم در طول مدت نگهداری اسپرم مایع می‌شود.

اثرات تیمار، زمان و اثرات متقابل تیمار $\times$ زمان، روی صفات بیومتریکی اسپرم در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود. اثرات متقابل تیمار $\times$ زمان روی صفات بررسی شده در این مطالعه در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود.

با توجه به نتایج جدول ۳، تیمار بتاکاروتن روی حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی، هاست و MDA اثر معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) همچنین با توجه به جدول ۳ مدت زمان نگهداری اسپرم روی حرکت درجا، حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی و هاست اثر معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). با توجه به نتایج به‌دست آمده، زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن سبب

Table 4- The effect of treatments on the qualitative characteristics of cooled sperm

Treatment	Progressive Motion (%)	Total Motion (%)	Survival (%)	Abnormal Sperm (%)	HOST (%)	MDA (μ m)
Normal egg yolk	40.30 $\pm$ 1.96 ^b	45.20 $\pm$ 1.48 ^b	55.89 $\pm$ 1.58 ^b	5.07 $\pm$ 0.60 ^a	22.71 $\pm$ 1.58 ^b	3.32 $\pm$ 0.11 ^a
Beta-carotene-enriched egg yolk	52.75 $\pm$ 1.95 ^a	57.11 $\pm$ 1.82 ^a	64.99 $\pm$ 1.56 ^a	3.55 $\pm$ 0.60 ^b	30.32 $\pm$ 1.55 ^a	2.45 $\pm$ 0.11 ^b

Different letters in each column indicate a significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$)

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود تفاوت بین میانگین درصد حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی، اسپرم غیرطبیعی، HOST و MDA اسپرم‌ها در بین گروه حاوی زرده تخم‌مرغ معمولی با گروه حاوی زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

به دلیل اینکه که در رقیق‌کننده بر پایه تریس از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن به جای زرده تخم‌مرغ معمولی استفاده شده است، مقادیر و درصد حرکت پیش‌رونده، حرکت کل، زنده‌مانی و HOST اسپرم افزایش و درصد اسپرم غیرطبیعی و MDA در نمونه‌ها

کاهش یافته است و به طور کلی صفات کیفی اسپرم با استفاده از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن در رقیق‌کننده بر پایه تریس به جای زرده تخم‌مرغ معمولی افزایش یافته است. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش با نتایج حاصل از گزارشات آختر و همکاران (۲۰۱۶)، ویرا و همکاران (۲۰۱۷)، آل‌مبرو و همکاران (۲۰۱۱)، سیتی و همکاران (۲۰۲۴)، لسا و همکاران (۲۰۱۸)، جامه و همکاران (۲۰۲۳) و دانجکیو و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت. ولی اینکه با چه مکانیسمی زرده تخم‌مرغ به زنده‌مانی اسپرم در طی فرآیندهای شوک سرمایی کمک می‌کند هنوز به طور دقیق شناخته نشده است.

Table 5- The effect of times on the qualitative characteristics of cooled sperm

Time (Day)	Progressive Motion (%)	Place Motion (%)	Total Motion (%)	Survival (%)	HOST (%)
1	80.42±2.97 ^a	2.75±0.80 ^b	82.87±2.84 ^a	86.02±2.40 ^a	35.79±2.47 ^a
5	69.23±2.91 ^b	3.89±0.78 ^{ab}	73.16±2.77 ^a	79.61±2.35 ^a	31.72±2.41 ^{ab}
10	49.15±2.81 ^c	4.79±0.76 ^a	54.87±2.70 ^b	66.04±2.28 ^b	25.29±2.37 ^b
15	27.20±2.82 ^d	5.70±0.77 ^{ab}	32.24±2.71 ^c	46.90±2.28 ^c	25.09±2.37 ^b
20	6.63±2.96 ^e	5.88±0.80 ^{ab}	12.66±2.82 ^d	23.64±2.39 ^d	14.70±2.45 ^c

Different letters in each column indicate a significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$)

همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود تفاوت بین میانگین درصد حرکت پیش‌رونده اسپرم در بین زمان‌های ۱ تا ۲۰ روز بعد از سردسازی نمونه‌ها نسبت به یکدیگر در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

تفاوت بین میانگین درصد حرکت درجای اسپرم در زمان‌های ۱ و ۱۰ روز پس از سردسازی نمونه‌ها نسبت به یکدیگر معنی‌دار بود ($P < 0.05$) ولی در سایر زمان‌ها، نسبت به یکدیگر در این صفت در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبودند.

تفاوت بین میانگین درصد حرکت کل اسپرم در زمان‌های ۱ و ۵ روز پس از سردسازی نمونه‌ها نسبت به یکدیگر در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود ولی در زمان‌های ۱ و ۵ روز پس از سردسازی با همه‌ی زمان‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

تفاوت بین میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های ۱ و ۵ روز پس از سردسازی نمونه‌ها با یکدیگر در سطح ۰/۰۵ دارای تفاوت معنی‌داری نبود ولی این دو زمان با بقیه‌ی زمان‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود و همچنین زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از سردسازی نمونه‌ها نسبت به یکدیگر دارای تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بودند ($P < 0.05$).

تفاوت بین میانگین درصد تست HOST اسپرم در زمان ۱ روز پس از سردسازی نمونه‌ها به جز در زمان ۵ روز پس از سردسازی، با تمام زمان‌ها در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

با توجه به نتایج جدول ۵، حرکت پیش‌رونده، حرکت کل و زنده‌مانی اسپرم با گذشت زمان کاهش پیدا کرده است و بیشترین مقدار آن‌ها مربوط به زمان ۱ روز پس از

سردسازی نمونه‌ها و کمترین مقدار آن‌ها مربوط به زمان ۲۰ روز پس از سردسازی نمونه‌ها بود و درصد اعداد به‌دست آمده از حرکت درجا و تست HOST نمونه‌ها نشان می‌دهد که با گذشت زمان از میزان این اعداد کاسته شده است و با توجه به نتایج حاصل از جدول ۵ مدت زمان با کیفیت اسپرم دارای رابطه عکس هستند یعنی با گذشت هر چه بیشتر مدت زمان نگهداری نمونه‌ها از کیفیت اسپرم‌ها کاسته می‌شود البته افزودن بتاکاروتن سبب افزایش مدت زمان ماندگاری اسپرم می‌شود ولی هر چه زمان نگهداری افزایش می‌یابد از کیفیت صفات مورد بررسی کاسته شده است.

برای تلقیح موفق در سرویکس ۱۵۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک لازم است و برلی تلقیح موفق به روش لاپاراسکوپی ۲۰ میلیون اسپرم زنده و متحرک لازم است (ایوانس و مکسول ۱۹۸۷) و با توجه به نتایج به دست

منابع

- Agarwal A and Tamer M, 2004. Carnitines and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 8(4) 376-384.
- Akhter S, Rakha BA, Ansari MS, Husna AU, Iqbal S and Khalid M, 2016. Evaluation of Quail and Turkey Egg Yolk for Cryopreservation of Nili-Ravi Buffalo Bull Semen. *Theriogenology* 87: 259-265.
- Almbro M, Dowling DK and Simmons LW, 2011. Effects of vitamin E and beta-carotene on sperm competitiveness. *Ecology Letters* 14(9) 891-5.
- Dongxue M, Pengfei H, Mingji S, Hongfu Zh, Wei Sh, Guian H, Minghui Zh, Qingyuan S, Yong Zh, and Lingjiang M. 2021. β -carotene Rescues Busulfan Disrupted Spermatogenesis Through Elevation in Testicular Antioxidant Capability. *National Center for Biotechnology Information*. 12: 593953.
- Houda A, Nyaz Sh, Massooma M, Peter MJ and Mohamad EH. 2020. Role of Antioxidants Supplementation in the Treatment of Male Infertility. Chapter metrics overview DOI:10.5772/intechopen. 95891.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A and Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL and Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenolog*, 61: 895-907.
- 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.
- Dhami AJ and Kodagali SB. 1990. Freezability enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. *Theriogenology*, 34: 853-863.
- Eriani K, Azhar A, Ihdina M, Rosadi B, Rizal M and Boediono A. 2018. Quality Enhancement of Aceh Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Frozen Semen by Supplementing β -Carotene. *Tropical Animal Science Journal* 41(1):1-7.
- Evans G and Maxwell WMC. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. P 114-117.

آمده حاصل از این پژوهش که تا ۲۰ روز پس از سردسازی فراسنجه‌های کیفی اسپرم بررسی شده‌اند، برای داشتن تلقیح موفق در سرویکس از نمونه‌های سردسازی شده تا ۱۰ روز پس از سردسازی باید استفاده شود و برای تلقیح موفق به روش لاپاراسکوپی می‌توان از نمونه‌های سردسازی شده تا ۱۵ روز پس از سردسازی استفاده نمود.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش توصیه می‌شود در نگهداری اسپرم مایع در یخچال، به جای زرده تخم‌مرغ معمولی از زرده تخم‌مرغ غنی‌شده با بتاکاروتن در رقیق‌کننده بر پایه تریس استفاده شود تا فراسنجه‌های کیفیت اسپرم حفظ شود و صفات مورد بررسی در صورت استفاده از تخم‌مرغ غنی شده با بتاکاروتن نسبت به زرده تخم‌مرغ معمولی بهبود یافته است.

- Foulkes JA, Sweasey D and Goodey RG. 1980. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *Journal of Reproduction Fertility* 60:165-169.
- Jaume G, Mateo RC, Anna P, Sergi OM, Laura GC, Manel LB, Felipe MP and Manuel AR. 2023. Effect of Honey, Coenzyme Q10, and β -Carotene/ α -Tocopherol as Novel Additives in Rabbit-Sperm Cryopreservation Extender. *Animals* 13(14), 2392.
- Leesa M, Phillip G and Aimee J. 2018. Effect of long-term dietary beta-carotene supplementation on sperm concentration and motility in an endangered amphibian. *Animal Reproduction Science* 195:259-265.
- MacDonald BJ and Foulkes JA. 1981. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilinonaphthalen-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction Fertility* 63:407-414.
- Purdy P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 6: 215-225.
- Quinn PJ, Chow PY and White IG. 1980. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction Fertility* 60: 403-407.
- Ranghraz Tavakoli H, Moghaddam Gh, Daghighkia H, Rafat SA. 2016. The effect of hCG injection on serum and seminal plasma testosterone in Ghezel ram. *Journal of Animal Science Research* 26(2) 133 - 141.
- Siti Maulida AC, Kartini Eriani B, Nur Fadli C, Mohd N, Siti-Azizah D, Filiz K, Kocabas E, Mehmet Kocabas F, Martin Wilkes G, Luvi S, Handayani A, Sri R, Rahayu A, Zainal A and Muchlisin C. 2024. Effect of type and concentration of antioxidant on sperm motility, viability, and DNA integrity of climbing perch *Anabas testudineus* Bloch, 1792 (Pisces: Anabantidae) post-cryopreservation. *Cryobiology* 114 (104851).
- Stoss J and Refstie T. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30 (1-4) 229-236.
- Tizkar B, Kazemi R, Alipour A, Seidavi A, Naseralavi G and Ponce-Palafox JT. 2015. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). *National Center for Biotechnology Information* 84(7):1111-7.
- Tomar G, Joshi T, Varghes A, Sasidharan S, and Kural M R. 2017. Relationship of Antioxidant System and Reactive Oxygen Species with Clinical Semen Parameters in Infertile Men. *Journal of Family Medicine and Primary Care* 6(3) 574-577.
- Vieira N, Losano J, Angrimani D, Kawai G, Bicudo L, Rui B, Silva B, Assumpcao M and Nichi M. 2017. Induced Sperm Oxidative Stress in Dogs: Susceptibility Against Different Reactive Oxygen Species and Protective Role of Seminal Plasma. *Theriogenology* 108 (39-45).
- 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.