



"مقاله پژوهشی"

اثر شیر نارگیل در رقیق کننده بر ماندگاری اسپرم قوچ در شرایط سرد

سمیه میرزاپور^۱، سید مجتبی موسوی^۲ و مجید خالداری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، (نویسنده مسؤول: Mousavi.sym@lu.ac.ir)
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۳
صفحه: ۱۰۳ تا ۱۱۲

چکیده

ذخیره سازی طولانی مدت اسپرم مایع موجب تغییر در ساختارهای ریخت شناسی و عملکردی اسپرم می شود. این مطالعه جهت تعیین اثر سطوح مختلف شیر نارگیل در رقیق کننده اسپرم قوچ بر فراسنجه های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد انجام گرفت. از تعداد سه رأس قوچ نژاد لری، با واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم گیری شد. بعد از جمع آوری و ارزیابی اولیه نمونه ها، انزال های منتخب، با هم مخلوط شده و به شش قسمت مساوی تقسیم شدند و هر قسمت به نسبت یک به ۲۰، با رقیق کننده های مختلف، رقیق شدند. شش رقیق کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیر نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (حجم/حجم) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق کننده بر پایه تریس، آماده شدند. سپس نمونه ها، در دمای پنج درجه سانتی گراد برای مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نمونه ها در زمان های صفر، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از لحاظ فراسنجه های حرکتی (سامانه آنالیز کامپیوتری)، زنده مانی (رنگ آمیزی اتوزین نیگروزین)، ریخت شناسی (محلول هانکوک)، یکپارچگی غشا (روش هاس)، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نرخ قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و داده ها با استفاده از نرم افزار آمار SAS، آنالیز شدند. نتایج نشان داد که رقیق کننده های حاوی شیر نارگیل، از نظر برخی فراسنجه های حرکتی شامل VSL، VCL، VAP، ALH با رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ، تفاوت معنی داری نداشتند ($p \geq 0.05$). اما از نظر جنبایی کل و پیش رونده اسپرم، BCF و STR، نسبت به رقیق کننده حاوی زرده، به طور معنی داری، کمتر بودند ($p < 0.05$). فراسنجه های زنده مانی، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار در همه تیمارها مشابه بود ($p \geq 0.05$). همچنین، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و درصد اسپرم های با DNA آسیب دیده، تحت تأثیر نوع رقیق کننده قرار نگرفت. در کل، استفاده از شیر نارگیل در رقیق کننده اسپرم قوچ، نتوانست فراسنجه های حرکتی اسپرم را در حد زرده حفظ نماید و جایگزین مناسبی برای زرده در رقیق کننده اسپرم قوچ نبود.

واژه های کلیدی: اسپرم گیری، تلقیح مصنوعی، فراسنجه های حرکتی، نگهداری منی

مقدمه

تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش علمی برای پیشرفت اهداف تولیدمثل و افزایش راندمان ژنتیکی در گوسفند به کار می رود. تلقیح مصنوعی در گوسفند به چند طریق انجام می شود که شامل تلقیح به روش های واژینال، ترانس سرویکال، لاپاراسکوپ و تلقیح درون رحمی بدون انجام جراحی می باشد. نوع اسپرم استفاده شده بر بازده روش های تلقیح مصنوعی مؤثر می باشد. از اسپرم های قابل استفاده در تلقیح مصنوعی می توان به اسپرم منجمد، اسپرم تازه رقیق شده و اسپرم تازه بدون مواد افزودنی، اشاره کرد. تلقیح مصنوعی در گوسفند به طور معمول با اسپرم تازه و از راه واژن انجام می شود. درصد باروری در این روش حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است (۱۴). تلقیح مصنوعی با اسپرم تازه با محدودیت هایی از قبیل کمبود قوچ با ویژگی های برتر در گله، گرفتن همزمان اسپرم و تلقیح در گله، عدم امکان استفاده مفید از قوچ های برتر در سطح وسیع تر و محدودیت در وجود رقیق کننده مناسب برای نگهداری و حمل و نقل اسپرم، مواجه است.

هدف از اضافه کردن رقیق کننده ها، تأمین انرژی مورد نیاز سلول های اسپرم، حفاظت سلول ها از آسیب های دمای، کاهش تنش های فیزیکی و شیمیایی ناشی از سرد کردن و انجماد سلول های اسپرم و در نهایت ایجاد یک محیط مناسب برای زنده ماندن اسپرم ها است (۴). از زمانیکه فیلیپس و همکاران (۲۵) اثرات مثبت زرده تخم مرغ را برای ذخیره سازی منی پستانداران کشف نمودند، زرده به عنوان یکی از اجزای معمول در محیط انجماد اسپرم پستانداران مورد استفاده قرار گرفت.

زرده تخم مرغ، اسپرم را در برابر شوک سرمایی محافظت می کند (۱). علاوه بر اثرات مثبت زرده در طی فرآیند سردسازی از دمای اتاق به دمای صفر درجه سانتی گراد، در طی دوره انجماد نیز اسپرم از زرده برای محافظت از خود در برابر شوک سرمایی استفاده می کند. جنبایی، زنده مانی، سلامت آکروزوم و غشای میتوکندریایی اسپرم در طی تنش های فیزیکی و شیمیایی می تواند با حضور زرده در رقیق کننده تا حد قابل قبولی حفظ شود. زرده به عنوان یک بافر اسمزی با حضور در رقیق کننده قادر است تحمل اسپرم را

به هر دو نوع محیط هایپرتونیک و هایپوتونیک افزایش دهد (۲۸،۲۹).

اما به دلیل مشکلاتی که در زرده تخم مرغ وجود دارد، از جمله وجود پروژسترون که سبب ظرفیت دار شدن زود هنگام اسپرم در طی انجماد می شود و انتقال میکروارگانیسم های بیماری زای مختلف بین گله ها و حتی بین کشورها و ناشناخته بودن محیط آن، پژوهشگران درصدد جایگزینی آن با منابع دیگری از جمله منابع گیاهی بوده اند. مهم ترین بخش نگه دارنده ی زرده ی تخم مرغ، لیپوپروتئین های با چگالی پایین (LDL) است که از یکپارچگی غشاء در طی انجماد محافظت می کند (۳۵).

آب نارگیل، اندوسپرم مایع نارگیل های سبز، شیره نارگیل، عصاره مغز میوه نارگیل های بالغ حاوی اسیدهای چرب زیادی از جمله: اسیدهای چرب با چند پیوند غیراشباع (PUFAs)، اسیدهای آمینه، آنتی اکسیدان ها، ویتامین ها، مواد معدنی، نمک ها، پروتئین ها، قندها و الکترولیت های مختلف می باشند، که مواد مغذی لازم برای حفظ سلول ها را فراهم می کند و همچنین به عنوان رقیق کننده مایع منی و محیط کشت استفاده می شود (۳۹،۳۶،۳۷). مطالعات نشان داده اند که رقیق کننده مبتنی بر شیره نارگیل می تواند یک جایگزین مناسب برای نگهداری اسپرم باشد (۳۰). برخی مطالعات که بر روی آب پودر نارگیل انجام شده است، نشان داده اند که آب پودر نارگیل جایگزین مناسبی به عنوان محافظت کننده اسپرم بز (۲۴)، خوک (۶)، سگ (۸) و اسب (۳۱) است.

تحقیقات زیادی در رابطه با اثر شیره نارگیل بر اسپرم حیوانات مختلف صورت گرفته است اما بر اساس دانش ما، تاکنون تحقیقی در مورد اثر آن بر نگهداری اسپرم قوچ صورت نگرفته است، بنابراین با توجه به مقالات مطالعه شده در مورد شیره نارگیل به نظر می رسد استفاده از آن در رقیق کننده اسپرم قوچ، بتواند اثرات مفیدی بر زنده ماندن، تحرک، تحرک پیشرونده و سایر ویژگی های اسپرم قوچ پس از نگهداری در شرایط سرد، داشته باشد.

مواد و روش ها

حیوانات و جمع آوری نمونه منی

این پژوهش در دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. از تعداد سه رأس قوچ بالغ نژاد لری (۳ تا ۵ ساله) با استفاده از واژن مصنوعی، دو بار در هفته اسپرم گیری شد. نمونه های منی در درون لوله های مدرج ریخته شده و با کمک فلاسک حاوی آب ۳۵ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده کشاورزی منتقل شدند. نمونه ها بلافاصله در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. انزال هایی که معیارها و شرایط ذیل را داشتند برای انجام آزمایش انتخاب شدند: حجم ۲-۵/۰ میلی لیتر؛ غلظت بیشتر از $10^9 \times 3$ اسپرم در هر میلی لیتر؛ تحرک بالای ۸۰ درصد و کمتر از ۱۰ درصد اسپرم ناهنجار. بلافاصله بعد از جمع آوری و ارزیابی اولیه نمونه ها، به منظور جلوگیری از اثرات و پراکنش فردی قوچ ها، انزال های منتخب، با هم مخلوط شده و برای ادامه آزمایش استفاده شد. منی مخلوط شده به شش قسمت

مساوی تقسیم شده و هر قسمت به نسبت یک به ۲۰، با رقیق کننده های مختلف، رقیق شدند. شش رقیق کننده با اضافه کردن سطوح مختلف شیره نارگیل (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد (حجم/حجم)) و زرده تخم مرغ (۱۵ درصد (حجم/حجم)) به رقیق کننده پایه، آماده شد. سپس فالکون های حاوی نمونه های مایع منی رقیق شده، در ظرف حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته (برای سرد شدن تدریجی) و در یخچال با دمای ۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نمونه های هر تیمار در زمان های صفر، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از لحاظ فراسنجه های حرکتی و سرعتی اسپرم (سامانه آنالیز کامپیوتری)، زنده ماندن اسپرم (رنگ آمیزی اتوزین نیگروزین)، ریخت شناسی (محلول هانکوک)، یکپارچگی غشای اسپرم (روش هاس)، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و نرخ قطعه قطعه شدن DNA اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی های کیفیت اسپرم

ارزیابی فراسنجه های جنبایی اسپرم

در زمان های صفر، ۳، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری، از تیمارهای مختلف، با استفاده از سمپلر، سه قطره پنج میکرو لیتری از هر نمونه روی لام ریخته شده و روی هر کدام، یک لامل تمیز قرار گرفت. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ منتقل شده و با استفاده از سامانه آنالیز کامپیوتری (CASA)^۱، جنبایی اسپرم ارزیابی شد. فراسنجه هایی که توسط این نرم افزار آنالیز می شود شامل: جنبایی کل (TM، درصد)^۲، جنبایی پیش رونده (PM، درصد)^۳، میانگین سرعت در مسیر (VAP، میکرومتر در ثانیه)^۴، سرعت در مسیر مستقیم (VSL، میکرومتر در ثانیه)^۵، سرعت در مسیر منحنی (VCL، میکرومتر در ثانیه)^۶، جنبایی عرضی سر (ALH، میکرومتر)^۷، درصد خطی بودن جنبایی (LIN، درصد)^۸، تناوب عرضی ضربان سر (BCF، هرتز)^۹ و مستقیم بودن مسیر طی شده (STR، درصد)^{۱۰} است.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم (زنده ماندن اسپرم)

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ آمیزی اتوزین- نیگروزین استفاده شد. اساس این روش این گونه است که اسپرم های مرده، رنگ اتوزین را به خود جذب می کنند، ولی اسپرم های زنده رنگ نمی گیرند. برای آماده سازی رنگ ۱/۶۷ گرم اتوزین Y به همراه ۲/۹ گرم سترات سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر با حرارت ملایم حل می شود. سپس، ۱۰ گرم رنگ نیگروزین به محلول قبلی اضافه شده و جوشانده می شود. در مرحله پایانی، محلول رنگ تهیه شده در دمای اتاق سرد شده و برای جداسازی ذرات ژله ای، با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، فیلتر می شود. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ میکرو لیتر اسپرم به وسیله سمپلر بر روی یک لام گرم و تمیز قرار داده شد. پس از رنگ آمیزی، لام ها زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۴۰۰ ارزیابی شدند. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده)، محاسبه شد (۲۲).

1- Computer Assisted Sperm Analysis

2- Total Motility

3- Progressive Motility

4- Average Path Velocity

5- Straight Line Velocity

6- Curvi Linear Velocity

7- Lateral Head Displacement

8- Linearity coefficient

9- Beat Cross Frequency of the sperm head

10- Straightness Coefficient

ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم

فعالیت غشای پلاسمایی اسپرم، به وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک (HOS)^۱ بررسی شد (۲۷). برای ساخت محیط هاس، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/۴۹ گرم سدیم سترات در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. فشار اسمزی روی ۱۰۰ میلی اسمول و pH روی ۸/۰۲ تنظیم شد. به طور خلاصه، ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی با ۳۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم، مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد آنکوبه می شود. سپس، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام ریخته و گسترش تهیه شد. لام حاصل، زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰، ارزیابی شد. از هر لام، تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم های دارای دم گره خورده (اسپرم های دارای غشای فعال) محاسبه شد.

ارزیابی ریخت شناسی اسپرم

برای ارزیابی ریخت شناسی، از محلول هانکوک استفاده شد (۳۲). محیط هانکوک شامل ۶۲/۵ میلی لیتر فرمالین (۳۷ درصد)، ۱۵۰ میلی لیتر محلول سالین، ۱۵۰ میلی لیتر محلول بافر و ۵۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر است. محلول سالین شامل ۹/۰۱ گرم کلرید سدیم در ۵۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر می باشد. محلول بافر خود از دو محیط جداگانه تشکیل شده است. محیط نخست شامل ۲۱/۶۸۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبدار در ۵۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و محیط دوم، از ۲۲/۲۵۴ گرم فسفات پتاسیم در ۵۰۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، تشکیل شده است. با مخلوط کردن ۲۰۰ میلی لیتر از محیط نخست با ۸۰ میلی لیتر از محیط دوم، ۲۸۰ میلی لیتر محلول بافر تهیه می شود. برای ارزیابی ناهنجاری های اسپرم سه قطره از هر نمونه اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به میکروتیوپ حاوی یک میلی لیتر از محلول هانکوک افزوده می شود. سپس یک قطره از این محلول روی لام قرار گرفته و لامل گذاری شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ از بخش های مختلف آن عکس گرفته شد. برای محاسبه درصد کل اسپرم های غیرطبیعی (غیرطبیعی بودن آکروزوم، سرهای چسبیده، بخش میانی غیرطبیعی و آسیب های دم) تعداد ۲۰۰ اسپرم از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفته و شمارش شد.

تعیین میزان آسیب به DNA اسپرم

به منظور ارزیابی سلامت کروماتین و DNA اسپرم از کیت SDAF^۲ استفاده شد که روش آن به این صورت است که این آزمایش در یک بستر میکرو ژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین و DNA اسپرم دناتوره می شود. در مرحله بعد با حذف پروتئین های کروماتین، رشته های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می شوند که طی رنگ آمیزی به صورت هاله ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده هستند. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته های DNA و نیز عدم مشاهده هاله یا هاله های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می شود.

ارزیابی میزان تغییرات مالون دی آلدئید (MDA)^۳ حاصل

از پراکسیداسیون لیپیدهای منی به روش TBARS^۴ اندازه گیری غلظت MDA با تیوباربیتریک اسید (TBA) یکی از رایج ترین روش های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها است. یک مولکول MDA با دو مولکول TBA واکنش می دهد و فرآورده این واکنش، مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارد. یک میلی لیتر از هر نمونه منی با یک میلی لیتر EDTA^۵، یک میلی لیتر BHT^۶ و دو میلی لیتر TCA^۷، با هم مخلوط شده و به داخل لوله های مخروطی ریخته می شوند. لوله مخروطی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می شوند. پس از سانتریفیوژ شدن، یک میلی لیتر از محلول بالای لوله مخروطی با یک میلی لیتر TBA در میکروتیوب، آمیخته می شود. لوله مخروطی برای مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۹۵ درجه سانتی گراد قرار می گیرند. نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده سپس جذب نوری آن ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر (با اسپکتروفوتومتر) اندازه گیری می شود. جذب نوری نمونه های مختلف یادداشت شده و در پایان، غلظت MDA (نانومول در میلی لیتر) محاسبه می شود (۱۲).

آنالیز داده ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت اندازه گیری های مکرر^۸ انجام شد و بعد از تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS، میانگین تیمارها با آزمون LSMeans مقایسه شد. هر تیمار شش تکرار داشت. داده ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین حداقل مربعات بیان شدند و اختلافات در سطح $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شدند. مدل آماری به صورت زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (T \times P)_{ij} + e_{ijk}$$

که در این مدل Y_{ijk} : بیانگر مشاهده مربوط به اثر i امین تیمار و j امین زمان، μ : بیانگر میانگین جامعه برای صفت مورد نظر، T_i : اثر تیمار، P_j : اثر زمان و $(T \times P)_{ij}$: بیانگر برهمکنش اثر تیمار و زمان و e_{ijk} : اثر تصادفی باقیمانده است.

نتایج و بحث

جنبایی اسپرم قوچ در رقیق کننده های مختلف

جدول ۱، مقادیر به دست آمده از فراسنجه های حرکتی و سرعت اسپرم قوچ، توسط نرم افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم پس از یخ گشایی در گروه های مختلف را نشان می دهد. نتایج نشان داد که رقیق کننده های حاوی شیر نارگیل، از نظر برخی فراسنجه های حرکتی شامل VSL، VCL، VAP، ALH با رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ، تفاوت معنی داری نداشتند ($p \geq 0/05$). اما از نظر جنبایی کل و پیش رونده اسپرم، Lin، STR و BCF، نسبت به رقیق کننده حاوی زرده تخم مرغ، به طور معنی داری، کمتر بودند ($p < 0/05$). در بین رقیق کننده های حاوی شیر نارگیل، رقیق کننده حاوی ۲۰ درصد شیر نارگیل در صفات LIN و STR از سایر رقیق کننده ها، بهتر بود.

1- Hypo Osmotic Swelling test
4- Thiobarbituric Acid Reactive Substances
7- Trichloroacetic Acid

2- Sperm DNA Fragmentation Assay
5- Ethylenediaminetetraacetic Acid
8- Repeated Measur

3- Malondialdehyde
6- Butylated hydroxytoluene

یکپارچگی غشاء، فعالیت غشایی سلول و ریخت‌شناسی

نتایج مربوط به یکپارچگی غشاء، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار در تیمارهای مختلف در جدول ۲ آورده شده است. نوع تیمار مورد استفاده، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و درصد اسپرم هنجار را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار نداد ($p \geq 0.05$). اما زمان نگهداری اسپرم‌ها در شرایط سرد، زنده‌مانی و فعالیت غشای سلول را به‌طور منفی، تحت تأثیر قرار داد ($p < 0.05$).

میزان آسیب به DNA اسپرم و پراکسیداسیون لیپیدها

میزان پراکسیداسیون لیپیدها و درصد اسپرم‌های با DNA سالم، تحت تأثیر نوع رقیق کننده قرار نگرفت (جدول ۳). در شکل ۱، نمونه‌ای از اسپرم‌های با DNA سالم و معیوب مشاهده می‌شود.

یکی از عوامل مؤثر در موفقیت تلقیح مصنوعی، داشتن اسپرم باکیفیت خوب است. استفاده از منی سرد شده هنگام عمل تلقیح مصنوعی در مزرعه، عملی‌تر است درحالی‌که استفاده از منی منجمد به ابزارهای گران و تهاجمی برای تلقیح لاپاراسکوپی و کارکنان آموزش دیده نیاز دارد. با این‌حال، گرچه دمای پایین مورد استفاده برای ذخیره اسپرم مایع، طول عمر اسپرم‌ها را افزایش می‌دهد و باعث کاهش متابولیسم سلول می‌شود، اما با افزایش مدت زمان ذخیره‌سازی، کیفیت اسپرم‌ها کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، ذخیره‌سازی طولانی مدت اسپرم باعث تغییرات شدید در ساختارهای مورفولوژیکی و عملکردی می‌شود که پتانسیل باروری را مختل می‌کند (۱۵). امروزه، استفاده از رقیق کننده‌های گیاهی به‌جای حیوانی در دهه اخیر گسترش زیادی پیدا کرده است. این مطالعه جهت تعیین اثر سطوح مختلف شیره نارگیل در رقیق کننده اسپرم قوچ بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد انجام گرفت.

یکی از مهم‌ترین عواملی که در مرحله نخست، نشان از نگهداری موفق اسپرم دارد، جنبایی آن است. در تحقیق حاضر، جایگزینی شیره نارگیل با زرده تخم‌مرغ، هرچند در فراسنجه‌های VSL, VCL, VAP, ALH، در حد رقیق کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بود ($p \geq 0.05$)، اما نتوانست اسپرم‌ها را از نظر جنبایی کل و پیش‌رونده، Lin، STR و BCF، در حد رقیق کننده حاوی زرده تخم‌مرغ در شرایط سرد طی ۷۲ ساعت، حفظ کند. این یافته‌ها برخلاف نتایج به دست آمده در زمان استفاده از روغن نارگیل (۳۴) و آب نارگیل (۷) بود. استفاده از هشت درصد روغن نارگیل همراه با ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ در رقیق کننده مبتنی بر تریس، توانسته است کیفیت اسپرم را طی نگهداری در شرایط سرد و ذوب شده پس از انجماد را بهتر حفظ کند (۳۴). همچنین مکمل کردن روغن نارگیل (دو درصد) همراه با غلظت ۱/۵ درصد لستین سوپا، تمام ویژگی‌های کیفی اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد را بهبود داده است (۳۳). علاوه بر این، استفاده از آب نارگیل همراه با ۲/۵ درصد زرده تخم‌مرغ به عنوان یک رقیق کننده برای نگهداری اسپرم اسب در شرایط سرد، نتایج خوبی داشته است (۷). اما در تحقیقی، استفاده از آب نارگیل (۲۰ درصد) و شیره نارگیل (۲۰ درصد) به عنوان جایگزینی برای زرده تخم‌مرغ در رقیق کننده انجمادی اسپرم کرگدن‌ها منجر به از دست دادن تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها شده است (۳۸).

الگوی حرکتی اسپرم، به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیطی که در آن قرار دارد بسیار حساس است. فرآورده‌های نارگیل در برخی گونه‌ها اثر مثبت و در تعدادی از آن‌ها، اثر منفی بر کیفیت اسپرم پس از نگهداری در شرایط سرد یا پس از انجماد داشته است. از طرفی سازوکار دقیق اثر فرآورده‌های نارگیل در رقیق کننده برای حفظ ویژگی‌های اسپرم مشخص نشده است. به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها در نتایج گزارش شده ناشی از ترکیبات متفاوت فرآورده‌ها و مقدار استفاده از آن‌ها، نوع رقیق کننده پایه و گونه حیوان باشد.

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های حرکتی و سرعت اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف طی نگهداری در شرایط سرد

Table 1. Comparison of motility and velocity parameters of ram sperm in different treatments during cool storage

فراسنجه									
BCF (Hz)	ALH (μm)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	STR (%)	VSL (μm/s)	Lin (%)	TM (%)	PM (%)	
۱۱/۸۳ ^a	۸/۴۱	۱۰۵/۵۲	۱۲۷/۴۱	۱۰۰/۶۷ ^a	۸۱/۵۲	۳۷/۷۹ ^a	۹۴/۴۴ ^a	۵۵/۸۱ ^a	Yolk
۵/۷۰ ^b	۶/۳۶	۷۹/۷۱	۹۶/۷۶	۶۷/۷۵ ^b	۶۱/۵۹	۲۵/۸۱ ^b	۷۷/۲۵ ^{bc}	۳۰/۰۳ ^b	Nar-5
۵/۷۵ ^b	۶/۲۱	۷۶/۶۷	۹۶/۶۵	۷۱/۰۷ ^b	۵۹/۲۴	۲۷/۰۵ ^b	۷۵/۰۰ ^{bc}	۳۳/۱۹ ^b	Nar-10
۵/۹۰ ^b	۶/۷۵	۸۵/۳۱	۱۰۶/۴۳	۷۳/۷۵ ^{ab}	۶۵/۹۱	۲۷/۹۶ ^b	۷۶/۳۶ ^{bc}	۳۵/۵۴ ^b	Nar-15
۶/۲۴ ^b	۷/۰۹	۹۵/۰۷	۱۱۳/۸۷	۷۹/۱۴ ^{ab}	۷۳/۴۵	۳۰/۰۳ ^{ab}	۷۹/۰۹ ^{bc}	۳۵/۷۹ ^b	Nar-20
۵/۶۳ ^b	۶/۰۵	۸۶/۹۲	۹۴/۳۰	۷۱/۰۱ ^{ab}	۵۹/۲۴	۲۱/۱۶ ^b	۶۲/۷۳ ^c	۳۳/۹۶ ^b	Nar-25
۰/۷۴	۰/۷۷	۱۱/۰۲	۱۲/۸۷	۶/۸۹	۸/۱۶	۲/۱۲	۴/۹۳	۲/۸۲	SEM
۶/۱۵ ^b	۷/۰۵	۹۷/۶۸ ^a	۱۲۳/۸۶ ^{ab}	۸۰/۴۶	۷۵/۱۹ ^a	۳۲/۶۷ ^a	۸۱/۸۴ ^a	۴۲/۱۰ ^a	۰/۵
۵/۷۰ ^b	۶/۳۶	۸۶/۰۰ ^{ab}	۱۰۸/۲۲ ^{ab}	۷۰/۳۲	۶۶/۲۰ ^{ab}	۲۷/۲۶ ^{abc}	۷۷/۰۵ ^{ab}	۴۱/۲۵ ^a	۳
۶/۷۹ ^{ab}	۷/۳۶	۱۰۰/۱۰ ^a	۱۲۶/۶۵ ^a	۸۱/۷۴	۷۷/۰۵ ^a	۳۰/۹۶ ^{ab}	۸۰/۲۱ ^a	۴۱/۹۷ ^a	۶
۷/۰۴ ^{ab}	۶/۴۳	۷۸/۲۰ ^{ab}	۱۰۲/۱۸ ^{ab}	۷۴/۶۶	۶۵/۷۳ ^{ab}	۲۶/۹۳ ^{bc}	۷۶/۷۸ ^{ab}	۳۷/۰۷ ^{ab}	۲۴
۸/۶۰ ^a	۷/۴۷	۸۵/۳۹ ^{ab}	۱۱۴/۹۷ ^{ab}	۸۲/۲۳	۶۰/۲۰ ^{ab}	۲۷/۱۲ ^{abc}	۸۰/۵۹ ^a	۳۲/۸۱ ^{bc}	۴۸
۶/۷۷ ^{ab}	۶/۱۹	۷۴/۱۳ ^b	۹۷/۸۴ ^b	۷۳/۹۷	۵۷/۰۶ ^b	۲۴/۸۷ ^c	۶۹/۵۰ ^b	۳۰/۶۷ ^d	۷۲
۰/۵۲	۰/۴۸	۷/۴۳	۸/۹۶	۴/۷۵	۵/۷۲	۱/۵۴	۳/۱۴	۱/۶۷	SEM
p-value									
۰/۰۰۰۰۱	۰/۲۷۵۷	۰/۳۷۷۶	۰/۴۱۳۷	۰/۰۱۴۰	۰/۳۷۷	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱	تیمار
۰/۰۰۰۴۷	۰/۱۱۱۹	۰/۰۲۱۰	۰/۰۳۳۷	۰/۲۲۶۱	۰/۰۲۱۰	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۰۰۱	زمان
۰/۶۳۷۴	۰/۳۵۱۴	۰/۷۲۵۴	۰/۴۶۷۵	۰/۳۰۴۷	۰/۷۲۵۴	۰/۵۲۷۰	۰/۲۶۳۹	۰/۶۳۱۴	تیمار × زمان

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیر نارگیل در رقیق‌کننده است. در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های بدون حرف، معنی‌دار نبوده است ($p \geq 0.05$).

اثر شیر نارگیل در رقیق کننده بر ماندگاری اسپرم قوچ در شرایط سرد ۱۰۸

جدول ۲- مقایسه فراسنجه‌های زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و ریخت‌شناسی اسپرم قوچ در تیمارهای مختلف
Table 2. Comparison of viability, membrane integrity and morphology parameters of ram sperm in different treatments

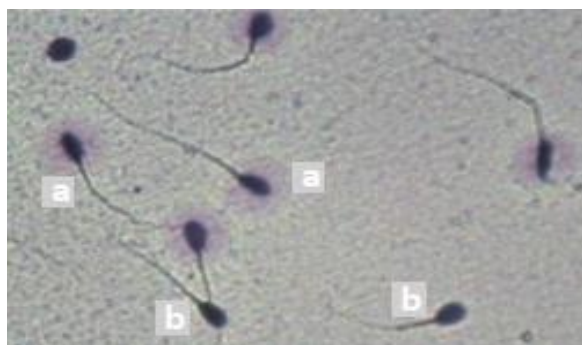
فراسنجه			
Live (%)	Host (%)	Hanck (%)	
۸۹/۰۷	۷۲/۳۸	۸۷/۱۶	Yolk
۸۴/۸۲	۷۱/۶۳	۹۳/۳۷	Nar-5
۸۴/۴۳	۶۸/۸۶	۹۳/۸۰	Nar-10
۸۶/۱۲	۶۸/۰۴	۹۰/۳۸	Nar-15
۸۸/۶۵	۶۴/۲۹	۸۳/۳۶	Nar-20
۸۶/۹۴	۶۴/۱۲	۸۸/۸۷	Nar-25
۱/۶۶	۳/۰۰	۳/۴۱	SEM
۹۲/۶۶ ^a	۷۳/۳۰ ^a	۹۱/۹۲	۰/۵
۹۰/۴۱ ^a	۷۱/۸۵ ^a	۹۱/۱۲	۳
۸۷/۳۹ ^b	۷۰/۲۲ ^a	۸۸/۹۸	۶
۸۳/۲۹ ^c	۶۸/۱۹ ^{ab}	۸۷/۸۸	۲۴
۸۳/۶۸ ^c	۶۴/۷۳ ^{bc}	۹۱/۳۰	۴۸
۸۲/۶۱ ^c	۶۱/۰۴ ^c	۸۵/۷۳	۷۲
۰/۹۵	۱/۳۶	۱/۹۷	SEM
p-value			
۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۲۸	تیمار
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۵۵	زمان
۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۵۳	تیمار × زمان

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیر نارگیل در رقیق کننده است. در هر ردیف، تفاوت میانگین‌های بدون حرف، معنی‌دار نبوده است ($p \geq 0.05$).

جدول ۳- مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپید و وضعیت DNA در تیمارهای مختلف طی نگهداری در شرایط سرد
Table 3. Comparison of lipid peroxidation and DNA characteristic in different treatments during cool storage

SEM	فراسنجه						تیمار
	Nar-25	Nar-20	Nar-15	Nar-10	Nar-5	Yolk	
۰/۴۲	۲/۰۴	۲/۹۲	۲/۰۳	۱/۹۳	۲/۱۰	۲/۷۹	(nMol/ml) MDA
۴/۶۵	۸۸/۰۴	۹۴/۵۱	۹۲/۶۵	۸۳/۵۲	۹۱/۷۸	۸۶/۲۷	اسپرم با DNA سالم (%)

Yolk: زرده تخم‌مرغ، Nar-5، Nar-10، Nar-15، Nar-20 و Nar-25: به ترتیب، مقدار پنج، ده، پانزده، بیست و بیست‌وپنج درصد شیر نارگیل در رقیق کننده است.



شکل ۱- نمونه‌ای از اسپرم‌های با DNA سالم (a) و معیوب (b) در تحقیق حاضر را نشان می‌دهد.
Figure 1. Examples of sperm with healthy (a) and fragmented (b) DNA in the current study

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر به ضعف فراسنجه‌های حرکتی اسپرم می‌شود (۱۸). همچنین تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد باعث عملکرد معیوب اسپرم مانند تخریب یکپارچگی DNA اسپرم (۲)، پتانسیل غشای میتوکندری، واکنش آکروزوم و توانایی ضعیف در نفوذ به تخمک می‌شود (۴۰). آسیب DNA اسپرم، بر کیفیت رویان و در نتیجه بر نرخ آبستنی تأثیر منفی دارد (۱۳). همچنین غلظت‌های بالاتر MDA، میزان بیشتری از آسیب اکسیداتیو به اسپرم را منعکس می‌کند (۱۱). در این آزمایش، میزان تولید MDA و نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم‌ها، تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفت. این نشان‌دهنده توان یکسان این شش رقیق‌کننده در حفظ سلامت DNA اسپرم طی نگهداری در شرایط سرد است. این نتایج در توافق با تحقیقات قبلی روی اسپرم قوچ (۱۵,۲۰) است که گزارش کرده‌اند که طی نگهداری اسپرم، برخلاف جنبایی اسپرم، یکنواختی DNA اسپرم تحت تأثیر نوع رقیق‌کننده قرار نگرفته است. برعکس، افزایش تدریجی و قابل توجهی در شاخص قطعه‌قطعه شدن DNA (DFI%) هنگامی که اسپرم قوچ در ۴ درجه سانتی‌گراد در رقیق‌کننده مبتنی بر لسیتین سویا (۱۹) یا در زرده تخم‌مرغ (۱۶) ذخیره شده، گزارش شده است.

در تحقیق حاضر با توجه به اینکه میزان تولید MDA و نرخ قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم‌ها، در رقیق‌کننده‌های حاوی شیر نارگیل مشابه رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ بود و از طرفی رقیق‌کننده‌های حاوی شیر نارگیل نتوانستند اسپرم‌ها را از نظر جنبایی کل و پیش‌رونده، STR، Lin و BCF، در حد رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ در شرایط سرد طی ۷۲ ساعت، حفظ کنند، این مؤید آن است که افت فراسنجه‌های حرکتی در رقیق‌کننده‌های حاوی شیر نارگیل، نمی‌تواند به دلیل تنش اکسیداتیو باشد. سازوکارهایی که منجر به افت کیفیت منی مایع ذخیره شده می‌شوند نمی‌توانند فقط به تنش اکسیداتیو مرتبط باشند بلکه عوامل دیگر باید در نظر گرفته و بررسی شوند. شناخت بهتر این سازوکارها به طراحی استراتژی‌های تولیدمثل برای حفظ توانایی باروری منی ذخیره شده، کمک زیادی می‌کند (۱۵).

در کل، نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از شیر نارگیل به جای زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده اسپرم قوچ، جهت نگهداری اسپرم در شرایط سرد، نتوانست فراسنجه‌های حرکتی اسپرم را در حد زرده حفظ نماید و جایگزین مناسبی برای زرده در رقیق‌کننده اسپرم قوچ نبود.

ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی سلول مهم است زیرا تبادلات متابولیکی با محیط اطراف را کنترل می‌کند. همچنین، فعال بودن غشای پلاسمایی در فرآیندهای ظرفیت‌دار شدن، واکنش آکروزومی و نفوذ به اووسیت، نیاز است (۱۷). در تحقیق حاضر، نوع رقیق‌کننده مورد استفاده، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و ریخت‌شناسی اسپرم را تحت تأثیر قرار نداد ($p \geq 0.05$) که نشان‌دهنده آن است که رقیق‌کننده‌های حاوی شیر نارگیل توانسته‌اند همانند زرده تخم‌مرغ، زنده‌مانی، فعالیت غشای سلول و ریخت‌شناسی اسپرم را طی نگهداری در شرایط سرد، حفظ کنند. شیر نارگیل حاوی مواد تشکیل‌دهنده اساسی مورد نیاز برای زنده ماندن اسپرم در طی نگهداری است. شیر نارگیل حاوی کربوهیدرات به عنوان منبع قند است (۲۳). مشخص شده است که قند پتانسیل اسمزی سلول‌ها را افزایش می‌دهد و از غشا در برابر آسیب ناشی از سرما محافظت می‌کند (۲۶). شیر نارگیل حاوی مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) شناخته شده است که به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشا کمک می‌کند (۳۷). اثر محافظتی شیر نارگیل همچنین می‌تواند به پروتئین‌های اصلی آن از جمله اسیدهای آمینه ضروری مربوط شود که نقش مهمی در یکپارچگی غشای سلول دارند (۳۹).

در مطالعه‌ای، اثر شیر نارگیل (۱۵ و ۲۰ درصد) به‌تنهایی یا همراه با پیریدوکسین (۸ میلی‌مول) در رقیق‌کننده تریس بر اسپرم بز طی انجماد موجب افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم، کاهش در اسپرم‌های غیرطبیعی و همچنین کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدید در رقیق‌کننده نسبت به گروه شاهد شد (۱۰). استفاده از رقیق‌کننده حاوی آب پودر نارگیل، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تحرک اسپرم را پس از انجماد، به نحو مطلوبی حفظ کرده است (۸). ولی استفاده از رقیق‌کننده حاوی شیر نارگیل و آب نارگیل نسبت به لسیتین سویا (یک و دو درصد)، پتانسیل کمتری را به عنوان جایگزین زرده تخم‌مرغ برای زنده‌مانی اسپرم، مورفولوژی و سلامت آکروزوم نشان داده‌اند (۳۸). ترکیب غشای اسپرم در گونه‌های مختلف متفاوت است که تا حدی، تحمل اسپرم به سرما را دیکته می‌کند و ممکن است بر پاسخ سلول به رقیق‌کننده‌ها تأثیر بگذارد (۲۱).

سامانه محدود محافظت آنتی‌اکسیدانی ذاتی منی، پس از رقیق‌سازی و سردسازی، تضعیف می‌شود (۵). اسپرم‌ها، به‌ویژه اسپرم قوچ، به دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب اشباع‌نشده با چند پیوند دوگانه در غشای پلاسمای، در برابر تنش اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر هستند (۳) و عدم تعادل بین تولید و حذف

منابع

- Ahmadi Hamedani, M., Y. Jafari Ahangari and S. Zerehdaran. 2015. The effect of various levels of egg yolk on quality of Zel ram spermatozoa in cooling and freezing conditions. *Research On Animal Production*, 5: 122-134 (In Persian).
- Aitken, R.J., G.N. De Iuliis, J.M. Finnie, A. Hedges and R.I. McLachlan. 2010. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25: 2415-24.
- Allai, L., X. Druart, M. Öztürk, A. BenMoula, B. Nasser and B. El Amiri. 2016. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 175: 1-9.
- Barbas, J. and R. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10: 49-62.
- Bilodeau, J.F., S. Chatterjee, M.A. Sirard and C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 55: 282-288.
- Bottini-Luzardo, M., F. Centurión-Castro, M. Alfaro-Gamboa, R. Aké-López and J. Herrera-Camacho. 2012. Effect of addition of coconut water (*Cocos nucifera*) to the freezing media on post-thaw viability of boar sperm. *Tropical animal health and production*, 45: 101-106.
- Brasileiro, L.S., L.G.T.M. Segabinazzi, E. Menezes, C.C. Salgueiro, G. Novello, V.F. da Cunha Scheeren, M., A. Alvarenga and J.F. Nunes. 2019. Coconut water as an extender component for cooled equine sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78: 69-73.
- Cardoso, R., A. Silva and L. Silva. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Anim Reprod*, 2: 257-262.
- Cordeiro, M., E. Silva, M. Miranda, F. Biondi, S. Santos and O. Ohashi. 2006. The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 3: 376-379.
- Daramola, J., E. Adekunle, O. Iyasere, O. Oke, T. Sorongbe, O. Iyanda, A. Kehinde, S. Aluko, I. Olaoye and O. Gbadebo. 2016. Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Ruminant Research*, 136: 208-213.
- Das, P., A. Choudhari, A. Singh and R. Singh. 2009. Correlation among routine semen parameters, sperm viability and malondialdehyde levels in human subjects with different fertility potential. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 53: 253-258.
- Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407-421.
- Evenson, D.P. 2016. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169: 56-75.
- Fair, S., J. Hanrahan, A. Donovan, P. Duffy, C. O'Meara, P. Lonergan and A. Evans. 2007. Hormonal relationships during the periovulatory period among ewe breeds known to differ in fertility after cervical artificial insemination with frozen thawed semen. *Animal Reproduction Science*, 97: 284-294.
- Falchi, L., G. Galleri, M. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu and S. Ledda. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207: 1-6.
- Gundogan, M., D. Yeni, F. Avdatek and A. Fidan. 2010. Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122: 200-207.
- Jeyendran, R., H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. Crabo and L. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70: 219-228.
- Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, C. Thatcher, R. Nebel and B. Cassell. 2007. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, 67: 1004-1012.
- Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, A. Tibary and K. Pelzer. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 C. *Small Ruminant Research*, 99: 208-213.
- Khalifa, T. and A. Lymberopoulos. 2013. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk-and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell and Tissue Banking*, 14: 687-698.
- Layek, S., T. Mohanty, A. Kumaresan and J. Parks. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172: 1-9.

22. Mohammadi, P., S. Tabatabaei Vakili, M. Mamouei, J. Fayazi and M. Zarei. 2016. Evaluation of the effect of different concentrations of vitamin E and Selenium in Tris extender e on sperm quality of Arabic ram. *Research on Animal Production*, 7: 99-93 (In Persian).
23. Okolie, P., C. Obi and P. Uaboi-Egbenni. 2011. Fungal spoilage of coconut (*Cocos nucifera* L.) fruits during storage and the growth differential of isolates on selected amino acids and carbohydrates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10: 965-973.
24. Oliveira, R., J. Nunes, C. Salgueiro, J. Cavalcante, O. Brasil and A. Moura. 2011. Evaluation of goat spermatozoa frozen in media based on powder coconut water media based (ACP-101®) or TRIS. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63: 1295-1302.
25. Phillips, P.H. 1939. Preservation of bull semen. *Journal of biological chemistry*, 130: 415-415.
26. Purdy, P. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63: 215-225.
27. Revell, S. and R. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.
28. Salamon, S. and W. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37: 185-249.
29. Salamon, S. and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.
30. Salgueiro, C., J. Nunes, K. Oliveira, V. Vieira, J. Gondim and E. Mateos-Rex. 2002. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó, na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 1: 96-98.
31. Sampaio Neto, J., C. Salgueiro, E. Mateos-Rex and J. Nunes. 2002. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5: 137-139.
32. Schäfer, S. and A. Holzmann. 2000. The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 59: 201-211.
33. Tarig, A., H. Wahid, Y. Rosnina, N. Yimer, Y. Goh, F. Baiee, A. Khumran, H. Salman, M. Assi and M. Ebrahimi. 2017. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen, *Veterinary World*, 10(6): 672-678. Abstract.
34. Tarig, A., H. Wahid, Y. Rosnina, N. Yimer, Y. Goh, F. Baiee, A. Khumran, H. Salman and M. Ebrahimi. 2017. Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182: 21-27.
35. Tonieto, R., K. Goularte, G.D.A. Gastal, R.S. Schiavon, J.C. Deschamps and T. Lucia. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Ruminant Research*, 93: 206-209.
36. Vasconcelos, A.B., A.M.C. Santos, J.S. Oliveira, M. de Albuquerque Lagares and M.M. Santoro. 2009. Purification and partial characterization of proteinase inhibitors of equine seminal plasma. *Reproductive Biology*, 9: 151-160.
37. Wassall, S.R. and W. Stillwell. 2009. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788: 24-32.
38. Wojtusik, J., M. A. Stoops and T.L. Roth. 2018. Comparison of soy lecithin, coconut water, and coconut milk as substitutes for egg-yolk in semen cryodiluent for black rhinoceros (*Diceros bicornis*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*). *Theriogenology*, 121: 72-77.
39. Yong, J.W., L. Ge, Y.F. Ng and S.N. Tan. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14: 5144-5164.
40. Zabludovsky, N., F. Eltes, E. Geva, E. Berkovitz, A. Amit, Y. Barak, D. Har-Even and B. Bartoov. 1999. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrologia*, 31: 91-98.

The Effect of Coconut Milk in Extender on the Durability of Ram Sperm in Cool Conditions

Somayeh Mirzapour¹, Seyed Mojtaba Mousavi² and Majid Khaldari³

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University,
(Corresponding author: mousavi.sym@lu.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University

Received: February 24, 2021 Accepted: August 14, 2021

Abstract

Long-term storage of liquid sperm causes changes in the morphological structures and sperm function. This study was performed to determine the effect of different levels of coconut milk in ram sperm extender on sperm quality parameters after storage in cool conditions. Sperm were collected twice a week from three adult Lori rams using an artificial vagina. After collection and initial evaluation of the samples, the selected ejaculates were mixed and the mixed semen was divided into six equal parts and each part was diluted in a ratio of one to 20, with different diluents. Six extenders were prepared by adding different levels of coconut milk (5, 10, 15 and 20% (volume/volume) and egg yolk (15% (volume/volume)) to the Tris base extender. Diluted semen was stored at 5 ° C for 72 h. The samples at 0, 3, 6, 24, 48, and 72 h were evaluated for sperm motility parameters (computer analysis system) viability (Eosin nigrosin staining), morphology (Hancock), membrane integrity (HOST), lipid peroxidation rate, and sperm DNA fragmentation rate. The experiment was performed in a completely randomized design and the data analysis was performed using SAS statistical software. The results showed that extenders containing coconut milk in terms of some motility parameters including VSL, ALH, VAP, VCL were not significantly different from extender containing egg yolk ($p \geq 0.05$). But in terms of total and progressive sperm, Lin, STR, and BCF were significantly lower than extender containing egg yolk ($p < 0.05$). Survival, cell membrane activity, and normal sperm percentage were similar in all treatments ($p \geq 0.05$). Also, the rate of lipid peroxidation and the percentage of sperm with damaged DNA were not affected by the type of extender. In general, the results of this study showed that the use of coconut milk in ram sperm extender to preserve sperm in cold conditions, could not maintain sperm motility parameters as much as the yolk and it was not a suitable substitute for yolk in ram sperm extender.

Keywords: Artificial insemination, Motility parameters, Semen preservation, Sperm collection