Evaluation different levels of soy lecithin on in vitro preservation of turkey sperm

Abstract

This study was conducted in order to investigate different levels of soy lecithin in semen diluent on the qualitative characteristics of turkey sperm in in vitro storage conditions. Semen samples were collected from five heavy turkeys of the French bronze breed at the age of 36 weeks. After initial evaluations (more than 70% dilution), they were mixed together and divided into four equal parts, and each part was diluted with one of the following diluents: 1) Control medium (10% egg yolk), 2) medium containing 1% lecithin, 3) medium containing 2% lecithin, 4) medium containing 3% lecithin. Different sperm parameters including total and progressive motility, integrity and plasma membrane activity were evaluated 3 hours after storage at 4°C. According to the obtained results, egg yolk-based medium and medium containing 2% lecithin showed the highest percentage of total motility (77.5%). Egg yolk-based medium showed the highest percentage of progressive motility (61.5%). However, there was no significant difference with other treatments. The results of the membrane activity showed that the treatment containing 2% lecithin showed the highest percentage with a significant difference compared to other treatments (85%) ($P<0.05$). Also, the evaluation of sperm viability and morphology was not affected by the treatments. Therefore, it seems that the egg yolk-based medium and the medium containing 2% soy lecithin reduce the negative effects of *in vitro* storage of turkey sperm at 4°C.

Key words: *Turkey, Medium, Sperm, Soy lecithin, Egg yolk.*

ارزیابی سطوح مختلف لسیتین سویا بر نگهداری برون تنی اسپرم بوقلمون

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی سطوح مختلف لسیتین سویا در رقیق کننده منی بر ویژگی‌های کیفی اسپرم بوقلمون نژاد برنز فرانسه در شرایط نگهداری برون‌تنی انجام شد. نمونه‌های منی از پنج قطعه بوقلمون سنگین وزن نژاد برنز فرانسه در سن ۳۶ هفتگی جمع‌آوری شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه(جنبایی بالای ۷۰ درصد) با یکدیگر مخلوط و به چهار قسمت مساوی تقسیم شده و هر قسمت با یکی از رقیق‌کننده‌های زیر رقیق شد: ۱) رقیق‌کننده شاهد(۱۰٪ زرده تخم مرغ)، ۲) رقیق‌کننده حاوی ۱٪ لسیتین، ۳) رقیق کننده حاوی ۲٪ لسیتین، ۴) رقیق‌کننده حاوی ۳٪ لسیتین. فراسنجه‌های مختلف اسپرم شامل جنبایی کل و پیش‌رونده، یکپارچگی و فعالیت غشای پلاسمایی ۳ ساعت پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده حاوی ۲٪ لسیتین از نظر جنبایی کل بیشترین درصد را نشان دادند(۷۷/۵٪). رقیق کننده برپایه زرده تخم مرغ بالاترین درصد جنبایی پیشرونده را نداشت(۶۱/۵٪). اگرچه، تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان نداد. نتایج فعالیت غشاء نشان داد که تیمار حاوی ۲ درصد لسیتین بیشترین درصد را با اختلاف معنی‌داری نشان داد (۸۵٪)(P <۰/۰۵). همچنین، ارزیابی زنده‌مانی و ریخت شناختی اسپرم تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت.

بنابراین، به نظر می‌رسد رقیق کننده برپایه زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده حاوی۲ ٪ لسیتین سویا اثرات منفی نگهداری برون‌تنی اسپرم بوقلمون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد را کاهش می‌دهند.

واژگان کلیدی: بوقلمون، رقیق کننده، اسپرم، لسیتین سویا، زرده تخم مرغ

مقدمه

بهبود ژنتیکی گونه‌های مهم کشاورزی و کنترل بیماری‌ها، اهمیت اساسی در پایداری و پیشرفت صنعت غذا و کشاورزی دارند. در صنعت دامپروری، تلقیح مصنوعی مهمترین تکنیک کمک‌تولیدمثلی برای پیشرفت در تولید محصولات دامی است (Zhandi et al., 2017). پرورش بوقلمون‌های صنعتی سنگین وزن در سال‌های اخیر سبب شده است که به صنعتی بزرگ و فعال از نظر تامین بخش قابل توجهی از منابع پروتئینی مورد نیاز کشور تبدیل شود. پیشرفت‌های علمی در زمینه علوم زیست شناسی، فیزیولوژی تولید مثل و ژنتیک تغییرات ژنتیکی لازم را از نظر افزایش ظرفیت تولید مثل در گروه وسیعی از دام‌ها از جمله بوقلمون ایجاد نموده و سطح تولیدات دامی مورد نظر را بهبود بخشده است. انتخاب تک صفتی دراز مدت(برای افزایش وزن) در بوقلمون‌ها و بویژه اینکه وزن بلوغ جنس نر این پرنده، تقریباً دو برابر جنس ماده است، باعث بروز مشکلاتی در جفت‌گیری طبیعی و کاهش تولید تخم در بوقلمون شده است (Nestor, 1984). امروزه این مشکل در بوقلمون‌های اصلاح شده نیز وجود دارد و آنها از تکنیک تلقیح مصنوعی برای بارورکردن جنس مادهٔ گلهٔ خود استفاده می‌کنند(Nestor, 1984). اسپرم پرندگان به آسیب‌های ناشی از انجماد بسیار حساس می‌باشد و تلاش‌های تحقیقاتی قابل توجهی برای ایجاد پروتکل‌های مناسب برای انجماد اسپرم پرندگان انجام شده است. با این حال، مانند ذخیره سازی مایعات، صنعت طیور نتوانسته است از مزیت انجماد استفاده کند(Long, 2006). در مطالعه‌ای سطوح مختلف نانولیپوزوم لسیتین سویا بر انجمادپذیری اسپرم خروس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که دوز بهینه برای انجماد و یخ گشایی اسپرم خروس ۱٫۱٪ نانولیپوزوم لسیتین سویا است (Imani et al., 2023). در کشور ما برای رقیق‌سازی منی و تلقیح مصنوعی بوقلمون سالانه هزینه‌های هنگفتی صرف واردات این رقیق‌کننده‌ها از کشورهای فرانسه و آلمان می‌شود که افزون بر خروج ارز از کشور، هزینه تلقیح مصنوعی را افزایش داده است. بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی سطوح مختلف لسیتین سویا بر نگهداری برون تنی اسپرم بوقلمون است.

پیشینه پژوهش

مطالعات محدودی در زمینه سردسازی و انجماد اسپرم بوقلمون وجود دارد و بیشتر گزارش‌ها در رابطه با سردسازی و مدت زمان‌های مختلف انجام شده است. در مطالعه‌ای گزارش شده است که درصد جوجه‌درآوری و نرخ باروری اسپرم خروس در مایع منی حاوی ۱٪

لسیتین سویا و ۲۰٪ پلاسمای زرده تخم مرغ بالاتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که مکمل کردن رقیق کننده اسپرم خروس با ۱٪ لسیتین سویا و ۲۰٪ پلاسمای زرده تخم مرغ منجر به کیفیت بالاتر اسپرم منجمد–ذوب شده شد(Mehdipour et al., 2018). در تحقیقی استفاده از رقیق‌کننده‌های دارای ۱٪ لسیتین سویا و یا ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ برای اسپرم قوچ توان حرکت اسپرم، زنده‌مانی و نرخ تسهیم بالاتری نسبت به ۲٪ لسیتین سویا نشان داد(Aires et al., 2003). در مطالعه‌ای دیگر مقایسه اثر رقیق‌کننده‌های مختلف بر جنبایی اسپرم قوچ نشان داد که شیر پس چرخ نسبت به سدیم سیترات، تریس و بیوکسل تأثیر بهتری دارد(Bailey et al., 2000) . گزارش شده است که لسیتین سویا در سطح ۱ و ۱/۵ درصد جایگزین مناسبی برای زرده تخم مرغ در رقیق‌کننده اسپرم می‌باشد (Salmani et al., 2013). در این مطالعه، سطوح مختلف لسیتین سویا در سردسازی اسپرم بوقلمون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش شناسی پژوهش

لسیتین سویا احیا از شرکت سیگما آلدریچ(St. Louis, MO, USA) و دیگر مواد شیمیایی موجود در بافر از مرک(Darmstadt, Germany) خریداری شد. در این پژوهش، از منی پنج قطعه بوقلمون سنگین وزن نژاد برنز فرانسه با میانگین وزنی۳۰۰ ± ۱۱/۵ کیلوگرم در سن ۳۶ هفتگی(شرایط نگهداری و تغذیه‌ای یکسان) استفاده شد. این آزمایش به صورت دو بار در هفته و به مدت سه هفته تکرار شد. نمونه‌های منی با جنبایی ≤ ۷۰٪، غلظت ≤ ۹۰۰×۱۰^۶ اسپرم/میلی‌لیتر و ریخت‌شناختی غیرطبیعی ≥ ۱۵٪ استفاده شد.

به منظور آماده‌سازی محیط‌های حاوی لسیتین، لسیتین سویا به مقدار لازم برای هر یک از تیمارهای مختلف ۲،۱ و ۳ درصد(وزنی– حجمی) به بافر بر پایه تریس در دمای ۲۵ °C اضافه شد. تیمار ها شامل: رقیق کننده بر پایه ۱۰ درصد زرده تخم مرغ (EY) رقیق کننده حاوی ۱٪ لیستسن سویا در بافر تریس (L1) ، رقیق کننده حاوی ۲٪ لیستسن سویا در بافر تریس، رقیق کننده حاوی ۳٪ لسیتین در بافر تریس. تیمارهای حاوی لسیتین سویا پس از اضافه شدن لسیتین به آن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از شیکر نمونه‌ها به خوبی مخلوط و یکنواخت شدند. برای ساخت رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم مرغ، مقدار مشخص از رقیق کننده با زرده تخم مرغ۱۰٪ (حجمی–حجمی) به بافر تریس افزوده و با آرامی با هم مخلوط شدند.

ارزیابی جنبایی کل، جنبایی پیشرونده و الگوهای حرکتی اسپرم با استفاده از سامانه کامپیوتری ارزیابی اسپرم (CASA,Video TesT Sperm 2.1 Russia) ارزیابی شد. زنده‌مانی اسپرم با روش رنگ‌آمیزی ائوزین– نیگروزین ارزیابی شد(Bucak et al., 2007). به منظور بررسی فعالیت غشای اسپرم از آزمون هاست استفاده شد. این تست بر اساس وجود اسپرم‌های با دم گره خورده پس از درمان با

محلول هایپواسموتیک است(Schäfer & Holzmann,2000). به منظور بررسی ریخت‌شناختی اسپرم از محلول هانکوک استفاده شد(Najafi et al., 2013).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزارSAS(نسخه ۹/۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. ارزیابی نرمال بودن داده‌ها با رویهٔ univariate نرم افزار SAS انجام شد. تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی بررسی شد. مدل آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت $Yij= \mu + Ti + eij$ بود، که در آن Yij: مقدار هر مشاهده، μ: اثر میانگین، Ti: اثر تیمارهای آزمایشی، eij: اثرات باقیمانده.

یافته‌های پژوهش

در این آزمایش، کیفیت اسپرم بوقلمون با رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا و زرده تخم مرغ مقایسه شد. ارزیابی‌های انجام شده شامل، جنبایی و ویژگی‌های حرکتی اسپرم، یکپارچگی غشاء، فعالیت غشاء و ریخت‌شناختی اسپرم پس از گذشت ۳ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اسپرم بود. هر یک از نتایج به دست آمده در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

نتایج جنبایی کل و پارامترهای سرعت اسپرم در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج این ارزیابی‌ها نشان داد که جنبایی کل در رقیق‌کننده ۲٪ لسیتین و رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند(۹/۸ ± ۷۷/۵). همچنین، جنبایی پیشرونده در رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ بالاتر بود(۱۲/۳± ۶۱/۵) اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت($P <۰/۰۵$). از نظر پارمترهای سرعت، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد.

جدول شماره ۱– نتایج جنبایی کل و جنبایی پیشرونده و فراسنجه‌های سرعت اسپرم بوقلمون در رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا و زرده تخم مرغ(شاهد) پس از گذشت ۳ ساعت سردسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

	رقیق‌کننده				
	EY[1]	L۱[2]	L۲[3]	L۳[4]	SEM
جنبایی کل	۷۷/۵	۶۲/۵	۷۷/۵	۶۲/۵	۹/۸
جنبایی پیشرونده	۶۱/۵	۴۵	۵۵/۷	۴۰	۱۲/۳
VSL (میکرومتر بر ثانیه)	۲۶/۷	۲۶/۰	۲۶/۵	۲۵/۷	۰/۹
VCL (میکرومتر بر ثانیه)	۱۱۰/۰	۱۰۷/۷	۱۰۹/۵	۱۱۱/۵	۲/۰
VAP (میکرومتر بر ثانیه)	۲۸/۷	۳۰/۲	۳۰/۱	۲۶/۲	۱/۷

پیش‌نویس ویراستاری نشده

STR (درصد)	۵۲/۰	۵۳/۰	۵۳/۲	۵۱/۲	۳/۵
LIN (درصد)	۲۶/۷	۲۶	۲۶/۴	۲۵/۷	۰/۱
ALH (میکرومتر)	۲/۷	۲/۲	۲/۲	۲/۵	۰/۲

۱: EY^{1} = رقیق کننده بر پایه زرده تخم مرغ، ۲: L^{1} = رقیق کننده بر پایه۱٪ لیستسن ، ۳ : L^{2} = رقیق کننده بر پایه۲٪ لیستسن ، ۴: L^{3} = رقیق کننده بر پایه۳٪ لیستسن

VSL: سرعت اسپرم در خط مستقیم، VCL : سرعت واقعی اسپرم در مسیر طی شده، VAP: میانگین سرعت در مسیر مستقیم LIN: معیار خطی بودن حرکت اسپرم که برحسب درصد، STR: معیار مستقیم بودن حرکت اسپرم برحسب درصد ALH: بیشترین دامنه حرکت‌های جانبی بر حسب میکرومتر،

نتایج حاصل از آزمون زنده‌مانی سلول در جدول۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که طی نگهداری اسپرم در درمای ۴ درجه سانتی‌گراد، رقیق‌کننده‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. نتایج ارزیابی فعالیت غشاء نشان داد که بالاترین درصد سلامت غشاء(۱/۷ ± ۸۵/۰ ٪) را داشت که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد($P < ۰/۰۵$). نتایج آزمون ریخت‌شناختی اسپرم نیز نشان داد که تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند(جدول شماره ۲).

جدول ۲. نتایج زنده‌مانی، فعالیت غشاء و ریخت شناختی اسپرم بوقلمون در رقیق‌کننده حاوی سطوح مختلف لسیتین سویا و زرده تخم مرغ(شاهد) پس از گذشت ۳ ساعت سردسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

	رقیق کننده				
	EY^{1}	**$L1^{2}$**	**$L2^{3}$**	**$L3^{4}$**	**SEM**
زنده‌مانی سلول	۸۴/۷	۶۸/۵	۸۲/۵	۷۲/۲	۶/۰
سلامت غشاء	۷۸/ ۷ ^{b}	۷۳/۲ ^{bc}	۸۵/۰ ^{a}	۷۰/۷ ^{c}	۱/۷
ریخت شناختی	۸۳/۲	۸۸/۵	۸۸/۲	۸۳/۲	۲/۱

۱: EY۱ = رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم مرغ، ۲: L^{1} = رقیق‌کننده بر پایه۱٪ لیستسن، ۳ : L^{2} = رقیق کننده بر پایه۲٪ لیستسن، ۴: L^{3} = رقیق کننده بر پایه۳٪ لیستسن

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی سطوح مختلف لسیتین در رقیق‌کننده و مقایسه آن با رقیق کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ بود. نتایج فراسنجه-های جنبایی نشان داد که رقیق کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده حاوی ۲٪ لسیتین بیشترین درصد جنبایی را نشان دادند. همچنین رقیق‌کننده برپایه زرده تخم‌مرغ بالاترین درصد جنبایی پیشرونده را داشت. گزارش شده است که درصد جوجه‌درآوری و نرخ

ویراستاری نشاط

باروری اسپرم خروس در مایع منی حاوی ۱٪ لسیتین سویا و ۲۰٪ پلاسمای زرده تخم مرغ بالاتر بود. همچنین، مکمل کردن رقیق کننده اسپرم خروس با ۱٪ لسیتین سویا و ۲۰٪ پلاسمای زرده تخم مرغ منجر به کیفیت بالاتر اسپرم منجمد–ذوب شده شد(Mehdipour et al., 2018). گزارش شده است که انکوباسیون طولانی مدت اسپرم در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند اثرات مضری بر توانایی باروری و یکپارچگی DNA آن توسط رادیکال‌های اکسیژن تولید شده از گلبول‌های سفید، باکتری‌ها و اسپرم‌های مرده موجود در منی داشته باشد(Ostadian et al., 2022). از طرفی حفظ کیفیت مایع منی بوقلمون پس از ذخیره‌سازی در شرایط آزمایشگاهی دشوار است و این مشکل با پیری حیوانات بدتر می‌شود(Iaffaldano et al., 2008). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از رقیق کننده بر پایه ۲ درصد نانوذره لسیتین سویا می‌تواند جایگزین مناسب برای رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ در انجماد اسپرم بز است Nadri .) (et al., 2019. در مطالعه‌ای منی سویه‌های بیوتی(BUT) و هیبرید با رقیق‌کننده منی (BPSE) Beltsville Poultry رقیق شد و تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم در ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که در زمان ۳ ساعت نگهداری جنبایی و زنده‌مانی سویه هیبرید بالاتر بود اما در ۴۸ ساعت بعد از نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد، تفاوت معنی‌داری بین سویه‌های مختلف از نظر زنده‌مانی و جنبایی مشاهده نشد(Iaffaldano et al., 2008). نشان داده شده است که نگهداری اسپرم در رقیق کننده بلتسویل در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت سبب کاهش باروری اسپرم بوقلمون شد(Sexton & Giesen, 2008). اسیدهای چرب غیر اشباع می‌توانند به صورت خود به خود بین ذرات لسیتین و غشای سلول انتقال یابند(Slanina et al., 1982) . به نظر می‌رسد لسیتین و رقیق‌کننده‌های حاوی نانوذرات لسیتین (Khalifa et al., 2014; Nadri et al.,2020; Raheja., 2018; Quinn., 1980) و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در لسیتین از طریق جایگزینی و انتقال فسفولیپیدها سبب محافظت اسپرم طی فرایند تنش سرمایی و در نتیجه سبب افزایش زنده‌مانی و یکپارچگی غشای سلول شوند (Slanina et al., 2012). در مطالعه حاضر اسپرم به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گزارش شده است که پس از انکوباسیون اسپرم انسان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت، هیچ تغییری در پارامترهای اسپرم مشاهده نشد. با این حال، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، کاهش قابل توجهی در تحرک و زنده ماندن اسپرم مشاهده شد، اگرچه، این تغییرات با افزایش بروز نشانگرهای فرآیندهای آپوپتوز فعال همراه نبود(Lachaud et al., 2004). رقیق‌کننده‌های بر پایه زرده تخم‌مرغ و لسیتین سویا از جمله اولین رقیق‌کننده‌هایی هستند که به عنوان یک رقیق‌کننده انجمادی برای انجماد اسپرم تکامل یافتند(Gil et al., 2000). در مطالعه حاضر زنده‌مانی و ریخت شناختی اسپرم تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت. اخیراً گزارش شده است که درون پوشانی کردن ۲/۵ میلی‌مول گلوتاتیون در نانوذرات لسیتین سویا سبب حفظ زنده‌مانی و یکپارچگی بالاتری در غشای اسپرم گاو شد(Nadri et al., 2022). فسفاتیدیل کولین موجود در این ترکیبات با بازیابی فسفولیپیدهای از دست رفته حین تنش سرمایی به زنده‌مانی اسپرم کمک می‌کند (Khalifa et

(al., 2014; Nadri et al.,2020. در مطالعه دیگر نشان داده شده است که در دمای سردسازی بیشترین تغییرات غشایی مشاهده می شود و وجود نانوذرات لیپوزوم می‌توانند روند تغییرات غشایی اسپرم را از طریق محافظت و پوشش غشاء سلول در برابر تنش سرمایی کاهش دهد (Nadri et al., 2022). تغییرات شدید دمایی در فرآیند سردسازی اسپرم خروس موجب ایجاد یک شوک سرمایی می‌شود که آسیب‌های زیادی به همراه دارد، بطوری که با پیشرفت روند سرد سازی از طرفی آب محیط اطراف و درون اسپرم سرد، شروع به انجماد و تشکیل کریستالهای یخ می‌کند و از سوی دیگر تغلیظ یون‌ها در دوسوی غشاء اسپرم خروس یک فشار فزاینده بر آن وارد می‌کند(Tabatabaei Vakili et al., 2020). در پژوهشی، تأثیر استفاده از مقادیر مختلف لسیتین سویا به جای زرده تخم‌مرغ برای محافظت از اسپرم قوچ یک ساعت پس از اسپرم‌گیری و نیز ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ذخیره کردن منی در پنج درجه سانتی‌گراد بررسی شد. نتایج نشان داد که لسیتین سویا یک جایگزین مناسب برای زرده تخم مرغ بوده و موجب بهبود کیفیت مایع منی در زمان‌های مورد مطالعه می‌شود(Zhang et al., 2023). در مطالعه حاضر نتایج ارزیابی‌های جنبایی و سلامت و فعالیت غشا نشان داده که با استفاده از رقیق‌کننده‌های مختلف زرده تخم‌مرغ و لسیتین سبب حفظ کیفیت اسپرم بوقلمون پس از گذشت ۳ ساعت از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شد. گزارش شده است که ذخیره مایع منی در مدیریت بوقلمون‌های نر ضروری است. با این حال، حتی در شرایط نگهداری بهینه، عملکرد اسپرم و زنده‌ماندن کاهش می‌یابد و منی رقیق شده را نمی‌توان بیش از ۶ ساعت پس از جمع آوری منی ذخیره کرد(Sexton & Giesen, 1983). از طرفی، برخی مطالعات گزارش کرده اند که مواد حاوی بخش‌های لیپیدی و لیپوپروتئینی از اسپرم در طول سردسازی محافظت می‌کنند. ساختار غشاهای اسپرم در دماهای مختلف مشخص نشده است، اما عملکرد غشاء می تواند تحت تأثیر لیپیدهای غشایی قرار گیرد که بسته به دما در حالت "مایع" یا "ژل" یا "حالت کریستالی" هستند. دمای فاز انتقال، دمایی که در آن لیپیدها از حالت سیال به حالت کریستالی تغییر می کنند، برای هر لیپید خاص است و به ترکیب شیمیایی مولکول لیپید بستگی دارد. دمای انتقال فاز برای لیپیدهای حاوی زنجیره‌های آسیلی چرب پایین تر از لیپیدهایی با زنجیره‌های آسیلی چرب طولانی است. (De Leeuw et al., 2023). باتوجه به محدودیت‌های موجود در استفاده از زرده تخم مرغ به عنوان یک منبع حیوانی در رقیق کننده اسپرم، مطالعات مختلف گزارش کرده‌اند که استفاده از لسیتین سویا می‌تواند به عنوان یک منبع گیاهی پیشنهاد شود. که حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع از جمله فسفاتیدیل کولین است. انتخاب روش ذخیره و نگهداری اسپرم فاکتورهایی چون میزان باروری، استفاده از کمترین میزان اسپرم همراه با بیشترین مدت باروری(تولیدمقدار بیشتر تخم بارور پس از یک تلقیح)، افزایش توانایی هچ تخم‌های بارور و استفاده از حداقل تعداد نر مورد توجه می‌باشد. استفاده از اسپرم تازه بیشترین باروری و هچ را به همراه دارد. ولی با توجه به مشکلات مربوط به نمونه‌گیری مستمر و عدم دسترسی همیشگی به لاین های ویژه(نرهای برتر) و افزایش هزینه نگهداری نمی‌توان به استفاده دائم از آن تکیه کرد (Kamar, 1960) . در روش نگهداری اسپرم بصورت مایع، اسپرم‌های جمع‌آوری شده به نسبت‌های مشخص با رقیق‌کننده مناسب رقیق می‌شوند. در

رقیق سازی اسپرم برای نگهداری بصورت مایع با افزایش زمان ذخیره سازی، تحرک و باروری کاهش می‌یابد. نوع متابولیسم غالب در هنگام ذخیره‌سازی بصورت مایع هوازی می‌باشد و نیاز به اکسیژن و تهویه کافی وجود دارد(Słowińska et al., 2012).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه نگهداری اسپرم پرندگان به در شرایط برون‌تنی و به صورت مایع به مدت طولانی امکانپذیر نیست، لازم است مطالعات گسترده‌ای در زمینه نگهداری اسپرم پرندگان به صورت مایع ومنجمد صورت پذیرد. نتایج حاصل از ارزیابی‌ها در این پژوهش نشان داد که رقیق‌کننده بر پایه زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده حاوی ۲٪ لسیتین توانستند کیفیت اسپرم بوقلمون را پس از فرایند نگهداری برون تنی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت حفظ نمایند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد. مقاله حاضر با حمایت پارک علم و فناوری دانشگاه تهران انجام شده است.

منابع

1. Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, *60*(2), 269-279.

2. Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. A. T. H. A. L. Y. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, *21*(1), 1-7.

3. Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, *67*(5), 1060-1067.

4. De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. Cryobiology, 30(1), 32-44.

5. Gil, J., Januskauskas, A., Håård, M., Håård, M. G. M., Johanisson, A., Söderquist, L., & Rodriguez- Mártinez, H. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos- Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*, *35*(2), 69-77.

6. Iaffaldano, N., Manchisi, A., & Rosato, M. P. (2008). The preservability of turkey semen quality during liquid storage in relation to strain and age of males. *Animal reproduction science*, *109*(1-4), 266-273.

7. Imani, S., Zhandi, M., Towhidi, A., Zaghari, M., Yousefi, A. R., Sharafi, M., & Nadri, T. (2023). Determining the Optimal Dosage of Lecithin Nanoliposome in Rooster Semen Freezing Medium and Fertility Potential. *Biopreservation and Biobanking*, *21*(2), 191-199.

8. Kamar, G. A. (1960). The influence of semen characteristics on hatching results of chicken eggs. *Poultry Science*, *39*(1), 188-192.

9. Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M. L., & Mendoza, C. (2004). Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Human reproduction*, *19*(3), 607-610.

10. Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges?. *Poultry science*, *85*(2), 232-236.

11. Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Martínez-Pastor, F., Mousavi, M., Noei, R., ... & Sangcheshmeh, A. M. (2019). Lecithin nanoparticles enhance the cryosurvival of caprine sperm. *Theriogenology*, *133*, 38-44.

12. Nadri, T., Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Riazi, G., Sharafi, M., Zhandi, M., ... & Gholami, D. (2022). Supplementation of freezing medium with encapsulated or free glutathione during cryopreservation of bull sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, *57*(5), 515-523.

13. Najafi, A., Zhandi, M., Towhidi, A., Sharafi, M., Sharif, A. A., Motlagh, M. K., & Martinez-Pastor, F. (2013). Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, *66*(3), 275-282.

14. Nestor, K. E. (1984). Genetics of growth and reproduction in the turkey: 9. Long-term selection for increased 16-week body weight. *Poultry Science*, *63*(11), 2114-2122.

15. Ostadian, C., Mehrafza, M., Eftekhari, A., Aghajani, S., Vahabzadeh, H., Gholami, M., ... & Hosseini, A. (2022). The effect of prolonged incubation of sperm at testis temperature versus room temperature on semen parameters-an experimental study. *Journal of Obstetrics, Gynecology and Cancer Research*, *7*(4), 323-328.

16. Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *J. Entomol. Zool. Stud*, *6*(3), 239-245.

17. Quinn, P. J., Chow, P. Y. W., & White, I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Reproduction*, *60*(2), 403-407.

18. Zhang, L., Wang, Y., Sun, X., Kang, Y., Sohail, T., Wang, J., & Li, Y. (2023). Effects of Different Diluents on Semen Quality of Hu Ram Stored at 4° C. *Animals*, *13*(18), 2823.

19.Khalifa, E. I., & Abdel-Hafez, M. A. M. (2014). Effect of soybean lecithin-based semen extender on freezability and fertility of Rahmani ram spermatozoa. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences*, *9*(1), 59-66.

20. Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., ... & Zhandi, M. (2013). Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small ruminant research*, *112*(1-3), 123-127.

21- Schäfer, S., & Holzmann, A. (2000). The use of transmigration and Spermac™ stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal reproduction science*, *59*(3-4), 201-211.

22. Zhandi, M., Ansari, M., Roknabadi, P., Zare Shahneh, A., & Sharafi, M. (2017). Orally administered Chrysin improves post- thawed sperm quality and fertility of rooster. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(6), 1004-1010.

23. Sexton, T. J., & Giesen, A. F. (1982). Beltsville poultry semen extender: 6. Holding turkey semen for six hours at 15 C. *Poultry Science*, *61*(6), 1202-1208.

24. Sexton, T. J., & Giesen, A. F. (1983). Beltsville poultry semen extender. 8. Factors affecting turkey semen held six hours at 15 C. *Poultry Science*, *62*(6), 1063-1068.

25. Slanina, T., Miskeje, M., Knízat, L., Mirda, J., & Massányi, P. (2012). The effect of different concentration of trehalose on turkey spermatozoa motility in vitro. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *1*(4), 573.

26. Słowińska, M., Liszewska, E., Dietrich, G. J., & Ciereszko, A. (2012). Characterization of proacrosin/acrosin system after liquid storage and cryopreservation of turkey semen (Meleagris gallopavo). *Theriogenology*, *78*(5), 1065-1077.

27. Tabatabaei Vakili, S., Aghaei, A., & Kazemizadeh, A. (2020). Effect of different concentrations of Lavandula angustifolia extract on semen quality of rooster during storage in liquid condition. *Research On Animal Production*, *11*(27), 74-81.

28. Mehdipour, M., Kia, H. D., Moghaddam, G., & Hamishehkar, H. (2018). Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, *116*, 89-94.

Evaluation different levels of soy lecithin on in vitro preservation of turkey sperm

Abstract

This study was conducted in order to investigate different levels of soy lecithin in semen diluent on the qualitative characteristics of turkey sperm in in vitro storage conditions. Semen samples were collected from five heavy turkeys of the French bronze breed at the age of 36 weeks. After initial evaluations (more than 70% dilution), they were mixed together and divided into four equal parts, and each part was diluted with one of the following diluents: 1) Control medium (10% egg yolk), 2) medium containing 1% lecithin, 3) medium containing 2% lecithin, 4) medium containing 3% lecithin. Different sperm parameters including total and progressive motility, integrity and plasma membrane activity were evaluated 3 hours after storage at 4°C. According to the obtained results, egg yolk-based medium and medium containing 2% lecithin showed the highest percentage of total motility (77.5%). Egg yolk-based medium showed the highest percentage of progressive motility (61.5%). However, there was no significant difference with other treatments. The results of the membrane activity showed that the treatment containing 2% lecithin showed the highest percentage with a significant difference compared to other treatments (85%) ($P<0.05$). Also, the evaluation of sperm viability and morphology was not affected by the treatments. Therefore, it seems that the egg yolk-based medium and the medium containing 2% soy lecithin reduce the negative effects of *in vitro* storage of turkey sperm at 4°C.

Introduction

Genetic improvement of important agricultural species and disease control are of fundamental importance in the sustainability and progress of the food and agriculture industry. In the animal industry, artificial insemination is the most important assisted reproduction technique to improve the production of livestock products. The breeding of industrial turkeys in recent years has caused it to become a large and active industry in terms of providing a significant part of the protein resources needed by the country. In our country, for the dilution of semen and artificial insemination of turkeys, huge costs are spent annually on importing these extenders from France and Germany, which has increased the cost of artificial insemination in addition to foreign currency outflow from the country. Therefore, the aim of this study is to investigate different levels of soy lecithin on the in vitro storage of turkey sperm.

Materials and methods

In order to prepare media containing lecithin, soybean lecithin was added to the Tris-based buffer at a temperature of 25 °C. Then, for 30 minutes, using a shaker, the samples were well mixed and uniform. To make the diluent based on egg yolk, the individual amount of the diluent with 10% egg yolk was added to Tris buffer and mixed gently. Evaluation of total motility, progressive motility and sperm motility patterns were evaluated using a computerized sperm evaluation system (CASA, Video Test Sperm 2.1 Russia). Sperm viability was evaluated by eosin-nigrosin staining method.

Results and Discussion

ویراستاری نشده

In this experiment, the quality of turkey sperm was compared with a diluent containing different levels of soy lecithin and egg yolk. The evaluations included sperm motility and movement characteristics, membrane integrity, membrane activity and sperm morphology after 3 hours of sperm storage at 4°C. Each of the obtained results will be examined below. The overall results and sperm speed parameters are shown in Table No. 1. The results of these evaluations showed that the total viscosity in 2% lecithin diluent and egg yolk based diluent had no significant difference (77.5 ± 9.8). Also, the progressive side was higher in the diluent based on egg yolk (61.5±12.3), but it was not significantly different from other treatments ($P<0.05$). In terms of speed parameters, no significant difference was observed between different treatments.

The aim of this study was to evaluate different levels of lecithin in the diluent and compare it with the diluent based on egg yolk. The results of gel parameters showed that egg yolk-based diluent and diluent containing 2% lecithin showed the highest gel percentage. Also, the diluent based on egg yolk had the highest percentage of progressive laterality. It has been reported that the percentage of chicks and the fertility rate of rooster sperm were higher in semen containing 1% soy lecithin and 20% egg yolk plasma. Also, supplementation of rooster sperm diluent with 1% soy lecithin and 20% egg yolk plasma resulted in higher frozen-thawed sperm quality. It has been reported that long-term incubation of sperm in laboratory conditions can have harmful effects on fertility and DNA integrity by oxygen radicals produced by white blood cells, bacteria and dead sperm in semen. On the other hand, it is difficult to maintain the quality of turkey semen after storage in laboratory conditions, and this problem worsens with the aging of the animals. Studies have shown that the use of a diluent based on 2% soy lecithin nanoparticles can be a suitable alternative to the diluent based on egg yolk in goat sperm freezing. In a study, the sperm of BUT and hybrid strains were diluted with Beltsville Poultry Semen Diluent (BPSE) and the motility, viability and integrity of the sperm membrane were evaluated in 3, 24 and 48 hours of storage at 5°C. The results of this study showed that during 3 hours of storage, the hybrid strain was higher in quality and survival, but in 48 hours after storage at 5°C, there was a significant difference between different strains in terms of survival and Side effects were not observed.

Conclusion

The results of the evaluations in this research showed that the diluent based on egg yolk and the extender containing 2% lecithin were able to maintain the quality of turkey sperm after the in vitro storage process at 4°C for 3 hours.

ویراستاری نشده

ویراستاری نشده