Effect of adding Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and Ethylene Glycol (EG) to copidel extender on semen quality of Ross 308 strain roosters

تأثير اضافة ثنائي ميثيل سلفوكسيد Dimethyl Sulfoxide (DMSO) وإيثيلين كلايكول Ethylene Glycol (EG) الى مخفف كوبيدل في نوعية السائل المنوي المبرد لديكة هجين روز308

م.مكي خلف حسين الدليمي، م.محمد جرد كاظم
الكلية التقنية/ المسيب، جامعة الفرات الأوسط التقنية-51009 بابل، العراق

المستخلص

أجري هذه البحث بإضافة ثنائي ميثيل سلفوكسيد Dimethyl Sulfoxide (DMSO) وإيثيلين كلايكول Ethylene Glycol (EG) بهدف دراسة تأثيرها على الحفظ بالتبريد للقذفة لديكة روز وإيجاد درجة حرارة تخزين للسائل المنوي المخفف الأكثر ملاءمة على المدى القصير. تم جمع القذفة من ستة ديكة روز وقيِّم بصرياً لحجم القذفة ودرجة الحموضة والتركيز على النطف. وشملت خصائص النطف المجهرية فحص الحركة الكلية (سريعة ومتوسطة وبطيئة) الحركة التقدمية وغير التقدمية. أظهرت النتائج أن متوسط حجم القذفة كان 0.2 ± 0.1 مل ، ودرجة الحموضة 6.9 ± 0.2 وتركيز النطف (69.9 ± 6.5 × 10^9 / مل). كما تم تسجيل فرق كبير بين الحركة الكلية للحيوانات المنوية الأولية %(TM) من 79.0 ± 13.2عند درجة حرارة 5 درجة مئوية وخزن لمدة 4 ساعات، في حين عند 25 ولمدة 24 ساعة كانت 25.4 ± 7.8. كانت النسبة المئوية للحيوانات المنوية الحية والطبيعية الاكثر تركيز للمعاملة الثالثة T3 هي 88.3 % واقل تركيزا 80.1 % للمعاملة الثانية T2 (P <0.05) على التوالي. كانت الحركة الكلية للحيوانات المنوية المسجلة مختلفة بشكل كبير في العينات المكملة بـثنائي ميثيل سلفوكسيد بتركيز 7 % والتي هي 51.5 %، أما عند اضافة 7 % من كلايكول الإثيلين كانت النسبة 49.7 % بعد الاسالة. يمكن ان نستنتج انه القذفة لديكة روز يمتلك أعلى نسبة حركة كلية للحيوانات المنوية الاولية عند تخزينها في المختبر عند درجة حرارة 5 مئوية. كما أن ثنائي ميثيل سلفوكسيد وإيثيلين كلايكول مناسبة لحفظ للسائل المنوي لديكة روز بالتبريد.

الكلمات المفتاحية: السائل المنوي، ميثيل سلفوكسيد، وإيثيلين كلايكول

Abstract

This study was conducted with the addition of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) and Ethylene Glycol (EG) to study its effect on the cryopreservation of the Ross 308 semen and finding a suitable diluted and temperature storage for the short-term sperm. Semen was collected from six Ross roosters and evaluated macroscopically for semen volume, pH and sperm concentration. Microscopic sperm characteristics examined included were total motility (rapid, medium and slow) progressive and non-progressive motility. Results showed that the average semen volume was 0.2 ± 0.1 mL, the pH 6.9 ± 0.2 and the sperm concentration (69.9 ± 6.5 × 10^9/ml). Similarly a significant ($p \leq 0.05$) difference between the initial sperm total motility (TM)% of 79.0 ± 13.2 and samples stored for 4 h at 5 °C whereas, samples stored for 24 h at 25 °C (25.4 ± 7.8) was recorded. The percentage of live and normal sperm which content high concentration was 88.3% in T3 and less concentration was 80.1% in T2 (P<0.05) respectively. The TM% recorded was significantly different in samples supplemented with 7% dimethyl sulfoxide DMSO 51.5% and with 7% ethylene glycol EG 49.7% following thawing. It can be conclude that the Ross 308 rooster semen was subsequently found to have a higher TM% when stored in vitro at 5 °C. DMSO and EG were found to be suitable for the cryopreservation of Ross 308 rooster semen.

Key words: semen, Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol

المقدمة

توفر عمليات حفظ النطف طريقة فعالة ممكنة للحفاظ على المواد الجينية الذكرية المتفوقة. ومع ذلك ، فإن القذفة المحفوظة بالتبريد يكون استخدامه محدود في المزرعة، بسبب قدرته على الحركة المنخفضة للحيوانات المنوية مقارنتا مع القذفة الطازج الذي له الدور الأساسي في تخصيب البويضة [1]. لذلك من الضروري استخدام طريقة فعالة لتخزين نطف الدجاج للاستخدام المستقبلي. عموما ، يتم استخدام تخزين القذفة البارد للحد من عملية التمثيل الغذائي لخلية النطف والحفاظ على حيوية النطف على مدى فترة طويلة من الزمن [2]. يلعب تخفيف القذفة ودرجة الحرارة دورًا مهمًا في الحفاظ على حركة النطف في الديك [3]. لذا وجد أنه على النقيض من عينات القذفة المخزنة في درجة حرارة 5 و 15 أو 25 درجة مئوية [4] ، أظهرت النطف المخزنة عند 41 درجة مئوية نسبة هلاك أكبر [5]. حافظ القذفة المخفف المخزون في 2-5 درجة مئوية على قدرته في التخصيب حتى بعد 24 ساعة [6]. ومع ذلك ، فإن معدل الخصوبة بعد التلقيح الاصطناعي من النطف المجمدة منخفض مما هو عليه في القذفة الطازج. لذلك على سبيل المثال ، كانت الدجاجات الملقحة بالنطف المجمدة تنتج بيضًا خصبًا أقل من تلك التي تم التلقيح بها بالمني الطازج [7و 8]. ومن ثم فإن هناك حاجة إلى طرائق لتحسين تخزين وأسالة القذفة في المختبر. في الوقت الحاضر لا يمكن الحفاظ على الصفات الوراثية للدجاج إلا عن طريق الحفاظ على قطيع حي وقد يكون مكلفًا [9]. نتيجة لذلك يمكن للحفظ بالتبريد للسائل المنوي الديكة أن يلعب دورا هاما في تربية الدجاج والحفاظ على الصفات الجينية. استخدم الكلسرول مبدئياً للحماية من أجل الحفاظ على النطف في معظم الحيوانات، بما في ذلك الحصان [10] والكبش [11] والطيور [12]. ومع ذلك وجد أن الحفظ بالتبريد يقلل الإخصاب في الطيور الداجنة [13]. لم يتم تحديد سبب هذه الخصوبة المنخفضة في النطف باستخدام الكلسرول كحافظ، ولكن ربما تكون ذات صلة بالصدمة التناضحية بعد الفقدان السريع للكليسرول من خلية النطف في الجهاز التناسلي للدجاجة [14]. تحليل القذفة الأساسي لدراسة خصوبة الديك يشمل عموما تقييم تركيز النطف، والحركة، والشكل وحجم القذفة[15]. إن تحليل حركة النطف مهم ويمكن ربطه بعد ذلك بالخصوبة [16]. يستفيد هذا التحليل عمومًا من التقنيات اليدوية والمجهرية. بدلا من ذلك ، يقوم نظام تحليل النطف computer-aided sperm analyser (CASA) بمساعدة الكمبيوتر بتحليل خصائص النطف ، مما يوفر للعلماء والمربيين تنبؤ الخصوبة للديكة الفردية [17]. في الدراسة الحالية تم اضافة نسبة 7% من ثنائي مثيل سلفوكسيد واثيلين كلايكول الى مخفف كوبيدل لدراسة تأثيرها على صفات النطف، وهي مواد كيمياوية لها تأثيرات معنوية عند اضافتها الى مخففات النطف.

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة صفات القذفة لديكة روز وإيجاد درجة حرارة تخزين للسائل المنوي المخفف الأكثر ملاءمة على المدى القصير وإيجاد حفظ مناسب بعد إضافة ثنائي ميثيل سلفوكسيد Dimethyl Sulfoxide (DMSO) وإيثيلين كلايكول Ethylene Glycol (EG) .

المواد وطرائق العمل

1- طيور التجربة

حيوانات التجربة تألفت من ديكة ذات هجين روز 308 النقية التي فقست وربيت في حقل دواجن الجفلاوي في قضاء المحاويل محافظة بابل. اجريت الدراسة للمدة من 2017/4/7 الى 2018/6/1 كان عدد الافراخ 25 فرخ جنست عن طريق معرفة ريش القوادم والخوافي الموجودة في جناح الفرخ منذ اليوم الاول، كان متوسط وزنها عند الفقس 47 ± 5 غم. تم تطعيم الديكة باللقاحات الحية ضد مرض ماريك Merck disease والتهاب الشعب الهوائية المعدي infectious bronchitis disease ومرض نيوكاسل عند الفقس. في الأسبوع 24 من العمر، تم نقل الديكة إلى أقفاص فردية وغذيت على عليقة تجارية تحتوي على 17 % بروتين وطاقة 2850 كيلو سعرة /كجم عليقة بصوره حرة، حتى بلغ وزن الجسم الحي 4.5 كجم عند عمر 50 أسبوع. تعرضت جميع الديكة إلى 16 ساعة من الضوء بين الساعة الخامسة صباحا والساعة التاسعة مساءا.

2- جمع القذفة

استند جمع القذفة إلى الطريقة التي وصفها Burrows and Quinn [18] من الديكة في عمر 26 أسبوعًا. واستخدمت تقنية تدليك البطن لجمع القذفة ثلاث مرات في الأسبوع من ستة ديكة، وجمعت القذفة الفردية ووضعت في حاوية مبردة حاوية على الماء درجة حرارة بين 38 و 40 درجة مئوية [19]. ونقل القذفة إلى المختبر في غضون 5 دقائق بعد جمعه. وقيس حجم القذفة عيانياً باستخدام أنبوب تجميع متدرج ودرجة الحموضة بمساعدة مقياس درجة الحموضة (Hanna instruments، Portugal). وحدد تركيز النطف باستخدام مقياس الطيف الضوئيJENWAY 6310. وعين الطول الموجي على 650 نانومتر. ثم أضيف 3 مل من محلول سيترات الصوديوم 2.9% (pH 7.0)، مع 15 مل من القذفة في

كفيت (cuvette) ، وحول الامتصاص إلى تركيز النطف. الصيغة المستخدمة: (11.170 × الامتصاص) - 90. وسجل هذا في عدد النطف / مل (× 10^9 / مل) [20].

بعد إعداد السائل المنوي، تم خلط 10مايكرولتر من القذفة الخام مع 500 مايكرو لتر من مخفف كوبيدل، عند 38 درجة مئوية، و 5 مايكرو لتر من القذفة المخفف 1:50 مع مخفف كوبيدل، وضع على شريحة مجهرية دافئة ومغطاة بستارة دافئة. مخفف كوبيدل في تركيبة الكيمياوي يحتوي على سكر الكلوكوز وصفار البيض ومحلول منظم لدرجة الحموضة ومضادات حيوية ومحلول سترات الصوديوم. وفحص هذا على مجهر مزود بلوحة دافئة، في 37 درجة مئوية. حددت نسبة الحركة الكلية (TM)% من النطف بوضوح تحت المجهر عند تكبير × 10. كما تم تصنيف الحركة الكلية للحيوانات المنوية إلى حركة سريعة أو متوسطة أو بطيئة وحركة تقدمية وغير تقدمية [20]. ومن أجل تحديد تأثير درجة الحرارة على القذفة المخزون في المدى القصير24 ساعة، خففت جرعة القذف الفردية ببطء (1: 2)، مع مخفف كوبيدل مع 20% من صفار البيض. وقورنت عينات القذفة المخففة بعد تعرضه الى 5 و 25 درجة مئوية مع معاملة السيطرة و 4 و 24 ساعة لحركة النطف والحيوية للحيوانات المنوية و تكررت هذه الملاحظات ست مرات [19].

3- حفظ السائل المنوي بالتبريد والتجميد

جمد المني الطبيعي الخام من الديكة وخزن في 5 درجة مئوية و حددت كل من حركة النطف والحيوية. خفف القذفة المجمَّع (1: 1) باستخدام مخفف الكوبيديل والمكمل مع 7% DMSO أو 7% EG وتمت معايرته عند 5 درجة مئوية لمدة ساعتين مع مجموعة سيطرة خالية من مواد الحفظ بالتبريد. وضعت القصبات التي تحتوي على 0.25 مايكرو لتر من القذفة المخفف في ثلاجة قابلة للبرمجة. وبرد القذفة في البداية إلى 5 درجة مئوية ثم حفظ بمعدل −1 درجة مئوية / دقيقة حتى الوصول الى درجة الحرارة وهي – 20 درجة مئوية [21]. ثم وضعت على مسافة 5 سم فوق النيتروجين السائل لمدة 5 دقائق، بعد ذلك تم انزلاق القصبات مباشرة في حاوية محتوية على النيتروجين السائل (−196) درجة مئوية وأيضاً لمدة 5 دقائق إضافية قبل التخزين في حاوية النيتروجين السائل. تم إذابة القصبات في درجة حرارة 5 مئوية لمدة 5 دقائق ، لتحديد خصائص حركة النطف والحيوية. تم تكرار هذه العملية ست مرات.

4- التحليل الاحصائي

حللت البيانات باستخدام البرنامج الإحصائي [22] وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار دنكن متعدد الحدود [23] على مستوى معنوية ($P<0.05$). تم استخدام تحليل التباين لإثبات الاختلافات في تأثير درجة الحرارة ، ووقت تخزين السائل المنوي، ومواد الحفظ بالتبريد على حركة النطف والحيوية. وفق الانموذج الرياضي التالي $Yijk=U+ Ai +Bj+ AB(ij)+eijk$

النتائج والمناقشة

لم تكن هناك فروق معنوية في حجم القذفة ودرجة الحموضة وتركيز النطف (النطف) للديكة الفردية، مما يدل على التجانس داخل الهجين (الجدول1). تراوحت أحجام القذفة الفردية من 0.1 إلى 0.3 مل ودرجة الحموضة المنوية من 6.4 إلى 7.2 وتركيز النطف من 5.2 إلى 6.9 × 10^9 / مل. قد لا يترتب على زيادة حجم القذفة بالضرورة زيادة تركيز النطف في الديكة. كان متوسط حجم القذفة من ديكة روز أكثر من 0.2 مل. هذه النتائج تتناقض مع نتائج [24] الذي بين أن حجم القذفة أقل من 0.2 مل في الصنف نفسه. الاختلافات في حجم القذفة قد تعتمد بشكل رئيسي على التأثير النسبي للغدد التناسلية المختلفة والإدارة ومدى استغلال الإمكانات الوراثية وكذلك موسم الجمع [25]. في الدراسة الحالية كان تركيز النطف من 6.8 × 10^9 / مل، أعلى من التي ذكرها باحثون آخرون [26]. أفاد [26] أن متوسط تركيز النطف هو 4.7 × 10^9 / مل في الديكة البيضاء ذات اللونين الأسود ذو العرف و 4.2 × 10^9 / مل في سلالات المنيروكا السوداء. وذكر كل من [27] و [28] أن تراكيز النطف من 2.4 × 10^9 / مل في الديكة جرزى و 3.6 × 10^9 / مل في ديكة شيكابراون. عمومًا يرتبط الرقم الهيدروجيني للسائل المنوي بحركة النطف ومعدل الأيض. ذكر [29] أن درجة حموضة القذفة للتركي والدجاج تتراوح بين 6.0- 8.0 والتي تتماشى مع نتائج هذه الدراسة (PH=6.9). بشكل عام درجة الحموضة المنوية أقل من 6.0 يقلل من حركة النطف وإنتاج حامض اللبنيك وامتصاص الأوكسجين. الرقم الهيدروجيني العالي يزيد من معدل الأيض أثناء تخزين القذفة في المختبر [28].

الجدول (1). المتوسطات ± الخطأ القياسي لحجم القذفة والاس الهيدروجيني وتركيز النطف لديكة هجين روز308.

المعاملات T (الديكة)	حجم القذفة(مل)	الاس الهيدروجيني للمني	تركيز النطف ($\times 10^9$ / مل)
T1	0.1 ± 0.2	0.3±7.1	78.3±6.9
T2	0.1 ± 0.1	0.3±7.1	71.2±6.4
T3	0.1 ± 0.3	0.4±6.8	66.9±6.9
T4	0.1 ± 0.2	0.2±7.2	67.6±5.2
T5	0.1 ± 0.2	0.3±6.4	76.3±6.8
T6	0.1 ± 0.2	0.3±6.6	89.0±6.5
المتوسط	0.1 ± 0.2	0.2±6.9	69.9±6.5

لا توجد هنالك اختلافات معنوية بين المعاملات ($P < 0.05$)

يتبن من نتائج الجدول (2). أن أكثر من 80% من النطف كانت حية وطبيعية. وسجلت ديكة المعاملة الثالثة (T3) قدرة عالية على البقاء في النطف (88.3)% مقارنة مع T4, T2 , T1 اذ كانت النسب (82.3)% ، (80.1)% و (81.4) % على التوالي. ومع ذلك فأن T3 لم تختلف معنويا في حيوية النطف مع T5 و T6 اذ كانت النسب (85.2)% و (86.2)%. كما لم تختلف النسبة المئوية للنطف الحية مع تشوهات الرأس والقطعة الوسطية والذيل بشكل كبير بين الأفراد.

الجدول (2) . المتوسطات ± الخطأ القياسي لمعدل تشوهات النطف والنسب الحية للنطف لديكة روز308.

المعاملات T (الديكة)	نسبة النطف الحية	نسبة النطف الميتة	نسبة التشوهات		
			الرأس	المنتصف	الذيل
T1	3.8±82.3bc	5.1±4.7	0.0±1.5	2.3±2.9	6.3±7.7
T2	2.5±80.1c	3.7±4.4	1.8±3.5	1.6±3.1	4.5±8.4
T3	3.3±88.3a	2.6±3.4	0.5±1.8	2.7±2.6	2.4±2.9
T4	4.8±81.4c	4.7±4.9	1.0±2.0	3.9±6.4	3.2±3.7
T5	3.6±85.2ab	3.9±4.7	1.0±2.0	2.4±2.4	4.6±3.9
T6	4.5±86.2ab	2.8±4.4	1.2±2.5	2.8±2.4	2.9±3.7
المتوسط	4.3±83.9	3.9±4.4	1.7±2.2	2.1±3.3	4.5±5.0

القيم التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها على مستوى ($P <0.05$)

يظهر تأثير درجة الحرارة على حركة النطف أثناء التخزين عند 5 درجة مئوية و 25 درجة مئوية في الجدول 3. انخفضت نسبة % TM بشكل كبير خلال التخزين في المختبر وبعد 24 ساعة عند 25 درجة مئوية حيث كانت % 25.4. وأظهرت عينات القذفة المخزنة في 5 درجة مئوية نسبة % TM أكثر من % 50.2 بعد 24 ساعة. تم تسجيل انخفاض طفيف في نسبة الحركة التقدمية و كذلك سرعة النطف انخفضت مع زيادة فترة التخزين. كانت الحركة التقدمية أعلى في القذفة وانخفضت بشكل ملحوظ بعد تخزين القذفة لفترات طويلة.

الطريقة الأكثر شيوعا للحفاظ على القذفة هي الحفظ بالتجميد في النيتروجين السائل في –196درجة مئوية [30]،[31]. ومع ذلك ، فإن النتروجين السائل ، ومخففات القذفة والكواشف والمجمدة القابلة للبرمجة متاحة لنسبة قليلة من المزارعين لا سيما في قطاع الزراعة الصغير. الهدف الأساسي لأي برنامج وقابلية برمجة التجميد لحفظ القذفة هو الحفاظ على معدل حركة النطف على مدى فترة طويلة من الوقت [32]. الحركة الكلية للحيوانات المنوية لمجموعة السيطرة سجلت % 82.2 مباشرا بعد جمع القذفة. كما سجلت عينات القذفة من هجين روز حركة كلية للسائل المنوي % 55 بعد 24 ساعة في المختبر في درجة حرارة 5 مئوية، في حين أظهرت عينات القذفة المخزنة في 25 درجة مئوية، انخفاض حاد إلى % 30 بعد 24 ساعة. كان هناك أيضا انخفاض منتظم في معدل حركة النطف أثناء التخزين عند 5 درجة مئوية، مقارنة مع انخفاض سريع لتلك النطف المخزنة في 25 درجة مئوية. [33] أشار الى أن هنالك تغيرات تعتمد على الوقت في خصائص حركة النطف أثناء تخزين القذفة السائل في المختبر.

أثبتت هذه الدراسة أنه من الممكن الحفاظ على نطفة ديكة روز عند 5 درجات مئوية لمدة 24 ساعة. وهذا يتفق مع النتائج التي توصل إليها [6] الذي لم يجد أي فقد في قدرة إخصاب القذفة المخزون في المختبر لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 2- 5 مئوية. [34] وجد أن معدل حركة النطف من نوع هوبرد هو% 58.6 بعد تخزين القذفة عند 5 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. هذه

النتيجة قابلة للمقارنة مع الدراسة الحالية والتي كانت معدل حركة النطف هو % 50.2 بعد التخزين لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 5 مئوية. أفاد [35] عن انخفاض معدل الحركة بنسبة % 45.6 في القذفة من الديكة من نوع Ross-308 المخزنة 24 ساعة عند 4 درجة مئوية. لاحظ [2] انخفاض في حركة النطف التقدمية أثناء التخزين.

الدراسات السابقة أشارت إلى أن القذفة المخزن في 41 درجة مئوية يقلل بشكل كبير من حركة النطف مقارنة مع تلك المخزنة في 5 أو 15 أو 25 درجة مئوية [36]. [28] ذكر أن عدد النطف الميتة في القذفة المخزَّن عند 41 درجة مئوية كان أعلى بكثير بالمقارنة مع تلك المخزونة في 4 أو 21 درجة مئوية. في تخزين النطف في المختبر عند درجة حرارة 5 درجة مئوية خفضت عملية التمثيل الغذائي للخلية وحافظت على حركة النطف على مدى فترة طويلة [2].

الجدول (3). المتوسطات ± الخطأ القياسي لتأثير درجة الحرارة على الصفات الحركية للحيوانات المنوية أثناء التخزين في 5 و 25 درجة مئوية من ديكة روز.

الصفات الحركية للحيوانات المنوية				الوقت (ساعة)	
النسب المئوية	0	4		24	
	وقت الجمع	5 ˚C	25 ˚C	5 ˚C	25 ˚C
%TM	6.6±82.2a	13.2±79.0a	17.3±48.2c	9.5±50.2d	7.8±25.4g
%PM	17.9±40.5a	15.7±38.1a	10.4±12.9c	5.6±7.9d	2.3±2.3e
%NPM	13.4±48.0a	13.2±47.1a	12.4±42.8ab	5.9±45.6ab	6.1±26.2d
%SLW	14.2±29.9b	15.0±32.3b	11.2±40.1a	6.8±42.3a	6.6±26.4c
%MED	9.2±22.9e	7.7±16.3f	6.5±9.1ab	2.9±6.6c	2.0±2.5d
%RAP	16.7±30.0a	19.1±32.2a	11.3±7.1c	4.1±4.8cd	2.9±0.9d

القيم التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها على مستوى ($P < 0.05$) TM: الحركة الكلية، PM : الحركة التقدمية ، NPM : الحركة غير التقدمية ، SLW : بطيء ، MED ، متوسط ، RAP ، سريع.

بعد إجراء عمليات التجميد والذوبان كانت نسبة الحركة الكلية % TM أقل ($P < 0.05$) لمخفف كوبويدل مع إضافة 7% من ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO) أو إيثيلين كلايكول (EG) حيث كانت النسبة (51.5%) و (49.7%) للمادتين على التوالي، مقارنة مع مجموعة السيطرة حيث كانت النسبة (89.6%) الجدول 4. الحفاظ على الأمشاج الذكرية للدواجن ضروري للحفاظ على التباين الوراثي في سلالات دجاج المزرعة [37]. في أنواع الطيور الداجنة يمكن أن يؤثر عدد النطف ونوع الديك (اللاحم أو البياض) والعمر على التخزين في المختبر ومعدل الخصوبة [38]. الدراسة الحالية تركز على الحفظ بالتجميد للسائل المنوي باستخدام DMSO أو EG. يتم قياس نجاح حفظ القذفة عمومًا من خلال تقييم معدلات بقاء النطف ومعدل حركتها.

وجد أن النشاط الخلوي للحيوانات المنوية التي تتوقف في الحفظ بالتبريد يعاد بعد الذوبان للسائل المنوي [37،38]، التجميد والذوبان قد يؤدي لتلف أو قتل النطف للدواجن [32]. تم العثور على DMSO المفضل للحفظ بالتبريد للسائل المنوي للديكة [19،39]. [40] استخدم أسيتاميد ثنائي ميثيل كبروتينات حرارية وسجل معدل انتقال للحيوانات المنوية من الديك % 38.4 بعد الذوبان للسائل المنوي. أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن DMSO و EG هما أفضل مواد للتجميد و لحفظ النطف لديكة روز. تم تسجيل نتائج مماثلة في القذفة للخروف بعد الذوبان [41] على الرغم من أن النطف للديك والخروف مختلفة بشكل كبير مورفولوجيا [42].

لا تعرف ميكانيكية نفاذ مواد التجميد للحيوانات المنوية لحد الان [43]. [44] بين أن مواد التجميد يمكن أن تتخلل الخلية في أقصر فترة زمنية، مما يتسبب في أقل قدر من حجم الرحلة أثناء إضافتها وإزالتها. ونتيجة لذلك يعتمد عملها على معامل النفاذية [42]. لعقود من الزمن تم استخدام صفار بيض الدواجن، وهو خليط معقد طبيعي من الكوليسترول، الفوسفوليبيدات ومضادات الأكسدة، في محاولة للحد من الآثار السلبية للصدمة التناضحية عقب الحفظ بالتبريد للمني. وقد استخدم صفار البيض على نطاق

واسع في معظم الموسعات خلال التخزين على المدى القصير أو الحفظ بالتبريد من السائل المنوي، من أجل حماية النطف من الصدمة الباردة [45, 46]. في هذه الدراسة تم تبريد المني ببطء في وجود عامل وقائي باستخدام صفار البيض من هجين روز مما أدى إلى استعادة حركة النطف بعد الذوبان.

الجدول 4.المتوسطات ± الخطأ القياسي لتأثير محاليل التجميد على حركة النطف بعد التجميد والاسالة للسائل المنوي في ديكة روز.

%RAP	%MED	%SLW	%NPM	%PM	%TM	المعاملات
21.8±52.9a	6.5±17.4a	13.9±18.4a	13.5±40.0a	15.8±49.6a	5.5±89.6a	خام
5.8±14.3b	3.8±16.6a	6.3±11.5b	6.5±23.1b	7.6±28.4b	7.6±51.5b	DMSO 7%
5.2±19.7b	6.3±13.3a	3.9±8.3bc	5.6±20.1b	8.7±29.6b	11.8±49.7b	EG 7%

القيم التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها على مستوى ($P < 0.05$)، TM: الحركة الكلية ، PM : الحركة التقدمية ، NPM : الحركة غير التقدمية ، SLW : بطيء ، MED ، متوسط ، RAP ، سريع ، DMSO : ثنائي ميثيل سلفوكسيد ، EG : اثيلين كلايكول.

في الختام، يمكن أن نستنتج من هذه الدراسة التي أجريت على القذفة للديكة من هجين روز، أن نسبة النطف الحية والعادية أعلى من النطف غير الطبيعية. أعلى معدل حركة للحيوانات المنوية لديكة روز عندما تم تخزين القذفة في المختبر في درجة حرارة 5 مئوية مقارنة مع درجة حرارة 25 مئوية. اختلفت خصائص النطف مثل نسبة الحركة الكلية % TM، والحركة التدريجية والحركة التقدمية بين الديكة الفردية بعد الحفظ بالتبريد. أدى استخدام DMSO و EG إلى ارتفاع معدلات حركة النطف. خفضت عملية الحفظ بالتبريد من حركة النطف ومعدل السرعة، بغض النظر عن استخدام المبردات بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

References

1. Hou ML, Huang SY, Lai YK, Lee WC (2008). Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa. Anim Reprod Sci. 104: 56-68.
2. Karunakaran M, Dhali A, Mech A, Khate K, Rajkhowa C, Mishra DP (2007). Preservation of mithun (Bos frontalis) semen at refrigeration temperature. Anim Reprod Sci. 101: 257-264.
3. Dumpala PR, Parker HM, McDaniel CD. (2006). The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. Int J Poult Sci. 5: 838-845.
4. Clarke RN, Sexton TJ, Ottinger MA. (1982). Effect of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility and fertility of chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poult Sci. 61: 1912-1917.
5. Clarke RN, Bakst MR, Ottiger MA. (1984). Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poult Sci. 63: 801-805.
6. Van Wambeke F. (1972). Fertility and hatchability results with fowl spermatozoa stored in fresh and freeze-dried diluent. Br Poult Sci. 13: 179-183.
7. Blanco M, Donoghue AN, Gee G, Wildt DE. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. Biol Reprod. 63: 1164-1171.
8. Besnard J, Bleisbos E, Boichard MT, Coquerelle G, Gourichon D, Grasseau I. (2007). Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the raw avian cryobank. Poult Sci. 86: 555-564.
9. Fulton JE. (2006). Avian genetic preservation: an industry perspective. Poult Sci. 85: 227-231.

10. Scerzer J, Fayres-Hosken RA, Aceves M, Hurley DJ. (2009). Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. Aust Vet J. 87: 275-279.
11. Colas G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J Reprod Fertil. 42: 277-285.
12. Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature. 164: 666-676.
13. Herrera JA, Quintana JA, Lopez MA, Betancourt M, Fierro R. (2005). Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. Arch Androl. 51: 353-360.
14. Lake PE, Buckland RB, Ravie O. (1980). Effect of glycerol on the viability of fowl spermatozoa, implications for its use when freezing semen. Cryo-Lett. 1: 299-304.
15. Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. Theriogenology 64: 706-719.
16. Broekhuijse ML, Sontaric E, Feitsman H, Gadella BM. (2011). Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. Theriogenology. 76: 1473-1486.
17. Parker HM, Yeatman JB, Schultz CD, Zumwalt CD, Mcdaniel CD. (2000). Use of sperm analyser for evaluating broiler breeder males: selection of young broiler breeder roosters for the sperm quality index increases fertile egg production. Poult Sci. 79: 771-777.
18. Burrows HW, Quinn JP. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poult Sci. 16: 19-24.

19. Makhafola MB, Lehloenya KC, Mphaphathi ML, Dinnyes A, Nedambale TL. (2009). The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. S Afr J Anim Sci. 39: 242-245.

20. Makhafola MB, Umesiobi DO, Mphaphathi ML, Masenya MB, Nedambale TL. (2012). Characterisation of sperm cell motility rate of southern African indigenous cockerel semen following analysis by Sperm Class Analyser. Anim Sci Adv. 2: 416-424.

21. Williamson RG, Etches RJ, Reinhart BS, Macpherson JW. (1981). The effect of cooling rate before freezing and the temperature of the semen upon addition of DMSO on the fertilizing capacity of chicken semen stored at −196 _C. Reprod Nutr Dev. 21: 1033-1042.
22. SAS. (2004). SAS User's Guide: Statistics Version. 7.0, SAS Institute, Inc. Cary, NC. USA.
23. Duncan DB. (1955). Multiple range and multiple F-tests. Biometrics. 11, 1-42.

24. Molekwa JT, Umesiobi DO. (2009). Relationship between cock semen viability and the fertility of artificially inseminated South African indigenous chicken breeds. S Afr J Anim Sci. 39: 24-28.

25. George FG, Bertschinger H, Donoghue AM, Blanco J, Soley J. (2004). Reproduction in nondomestic birds: physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. Avian Poult Biol Rev. 15: 47-101.

26. Siudzinska A, Lukaszewick E. (2008). The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. Anim Sci Pap Rep. 4: 331-340.

27. Tuncer PB, Kinet H, Ozdogan N. (2008). Evaluation of some spermatological characteristics in Gerze cocks. Ank Univ Vet Derg. 55: 99-102.

28. Obidi JA, Onyeanusi BI, Rekwot PI, Ayo JO, Dzenda T. (2008). Seasonal variations in seminal characteristics of characteristics of Shikabrown breeder cocks. Int J Poult Sci. 7: 1219-1223.

29. Donoghue AM, Wishart GJ. (2000). Storage of poultry semen. Anim Reprod. 62: 213-232.

30. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poult Sci. 78: 586-590.

31. Sontakke SD, Umaphathy G, Sivaram V, Khokutel SD, Shivaji S. (2004). Semen characteristics, cryopreservation and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (Columba livia). Theriogenology. 62: 139-153.

32. Latif A, Ijaz A, Aleem M, Mahmud A. (2005). Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. Pak Vet J. 25: 179-182.

33. Tabatabaei S, Aghaei A. (2010). Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of chicken semen. Comp Clin Path. 30: 163-169.

34. Dumpala PR, Parker HM, McDaniel CD. (2006). Similarities and differences between the sperm quality index and sperm mobility index of Broiler Breeder semen. Poult Sci. 85: 2231-2240.

35. Clarke RN, Sexton TJ, Ottinger MA. (1982). Effect of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility and fertility of chicken and turkey semen. Poult Sci. 61: 1912-1917.

36. Lukaszewicz E, Kruszynski W, Fujihara N. (2003). Effect of age on quality of raw and frozen-thawed semen in White Italian ganders. Asian J Andro. 5: 89-93.

37. Tabatabaei S, Batavani RA, Talebi AR. (2009). Comparison of oviducttal sperm age on fertility, hatchability and embryonic death rates in Iranian indigenous and Ross-308 broiler breeder chickens. J Anim Vet Adv. 8: 85-89.

38. Madeddu M, Berlinguera F, Pasciu V, Succu S, Satta V, Leoni GG. (2010). Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (Gallus gallus domesticus) and the Barbary partridge (Alectoris barbara). Theriogenology. 74: 1010-1018.

39. Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T, Tur B. (1995). Cryopreservation of poultry semen. Brit Poult Sci. 36: 805-811.

40. Purdy Y, Song FG, Silversides HD, Blackburn HD. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. Poult Sci. 88: 2184-2191.

41. Moce E, Grasseau I, Blesbois E. (2010). Cryoprotectant and freezingprocess alter the ability of chicken sperm to acrosome react. Anim Reprod Sci. 122: 359-366.

42. De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHD, Colenbrander B, Verkleu AJ. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane intergrity after cooling and freezing. Cryobiology. 30: 32-44.

43. Salamon S, Maxwell WMC. (1995). Frozen storage of ram semen, processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci. 37: 185-249.

44. Fernandez-Santos MR, Esteso MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. (2006). Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. J Androl. 27: 734-745.

45. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Crister JK. (1997). Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. Hum Reprod. 12: 112-118.

46. Umaphathy G, Sontake S, Reddy A, Ahmed S, Shivaji S. (2005). Semen characteristics of the captive Indian White-backed vulture (Gyps bengalensis). Biol Reprod 2005; 73: 1039-1045.