ارزیابی میزان تحرک اسپرم دم اپیدیدیم شتر یک کوهانه در Green buffer با یا بدون زرده تخم مرغ

دکتر حسین حملی[1] دکتر پرویز تاجیک[2]*

دریافت مقاله: ۲۶ فروردین ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۲۰ آبان ماه ۱۳۸۲

ندف: ارزیابی تحرک اسپرم اخذ شده از قسمتهای مختلف اپیدیدیم شتریک کوهانه ر محیط Green buffer با یا بدون ۲۰ درصد زرده تخم مرغ.

لرح: مطالعه توصیفی.

مونه‌ها: بیضه شترهای یک کوهانه ایران.

وش: گرفتن بیضه ۵۰ نفر از شترهای یک کوهانه نحر شده در کشتارگاه (یکصد بضه)، برش دم اپیدیدیم و قرار دادن اسپرم به تفکیک بیضه راست و چپ و قرار ادن آنها در محیط Green buffer و ارزیابی تحرک آنها.

جزیه و تحلیل آماری: آمار توصیفی، استفاده از مربع کای.

تایج: اسپرمهای گرفته شده از بیضه حمل و نقل شده در محیط سرم فیزیولوژیک رم عمدتاً فاقد تحرک بودند، در حالی که حدود ۸۰ درصد میانگین اسپرمهای م اپیدیدیم حمل شده در مجاورت یخ متحرک بودند. پس از قرار گرفتن در رمخانه، میزان تحرک اسپرمهای سر، بدنه نزدیک به سر، بدنه نزدیک به دم یدیدیم و دم اپیدیدیم حدوداً به ترتیب ۵، ۲۰، ۵۰ و ۹۰ درصد بود. هیچ گونه ختلاف معناداری بین میزان تحرک اسپرمهای گرفته شده از بیضه راست و چپ جود نداشت. حدود ۸۰ درصد از اسپرمهای ناحیه دم، ۳۰ درصد از اسپرمهای حیه بدنه و ۵ درصد از اسپرمهای ناحیه سر در محیط Green buffer با ۲۰ درصد رده تخم مرغ دارای حرکت بودند که اختلاف بین آنها معنا دار بود (P<۰/۰۵). ن میزان اختلاف در ساعت دوم آزمایش برای اسپرمهای گرفته شده از سر یدیدیم (بدون تحرک) و اسپرمهای گرفته شده از بدنه اپیدیدیم (با ۱۰ در صد حرک) کمتر شده و نسبت اختلاف آنها با اسپرمهای گرفته شده از دم اپیدیدیم با ۷۰ در صد تحرک) بیشتر بود (P<۰/۰۱). اختلاف تحرک در اسپرمهای گرفته شده از دم با دیگر قسمتها تا پایان زمان مطالعه باقی ماند. میزان تحرک اسپرم رفته شده از دم اپیدیدیم در محیط Green buffer بدون زرده تخم مرغ در ۲ ساعت اولیه آزمایش بالاتر از میزان آن در محیط دارای زرده تخم مرغ بود در الی که بعداً کاهش پیدا کرده و تا پایان آزمایش میزان تحرک اسپرمهای موجود ر محیط حاوی زرده تخم مرغ بالاتر ماند.

نیجه گیری: اسپرم دم اپیدیدیم شتر یک کوهانه توان ماندگاری در محیط Green buffe را دارد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۶۹-۳۷۰.

ژه های کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، دم اپیدیدیم، تحرک اسپرم، شتر یک کوهانه، Green buffer.

Assessment of camel sperm motility obtained from cauda epididymis in Green buffer with or without egg yolk

Hamali, H.,[1] Tajik, P.[2]

[1] *School of Veterinary Medicin, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*
[2] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicin, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Objective: Assessment of camel sperm motility obtained from cauda epididymis in Green buffer with or without 20% egg yolk.
Design: Descriptive study.
Samples : Testicles from Dromedary camel.
Procedure : Dromedary camel testicles (n=100) were obtained from slaughter-house, cauda were incised in the laboratory.The sperm cells were transferred into Green Buffer medium and sperm motility was assessed.
Statistical analysis: Descriptive statistics, χ^2-test.
Results: No motility was observed in epididymal sperm obtained from testicles transported in warm saline, however, transportation of testicles in 4-5°C supported sperm motility by 80%. After incubation, 5% of sperm cells from caput epididymis were motile. These values were 20%, 50% and 90% for caput-body, body-cauda and cauda regions respectively. No significant different was observed between motility of right and left testicles respectively. Approximately 80% of epididymal sperm cells from cauda epididymis were motile in Green buffer + 20% egg yolk after 1 hour incubation which was significantly higher (P<0.01) than sperm cells from corpus (30%) and caput (5%) epididymis. These values were 70%, 10% and 0 for cauda, corpus and caput epididymis in 2nd hour. Motility of caudal sperm cell were higher in Green buffer without egg yolk at first 2 hours of incubation but it decreased and remained lower during the observation.
Conclusion: Dromedary camel epididymal sperm cells motility is supported by Green buffer. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4: 369-372, 2003.***
Key words: Epididymal sperm, Cauda epididymis, Sperm motility, Dromedary camel, Green buffer.
Corresponding author email:ptajik@ut.ac.ir

کی از روشهای جمع‌آوری اسپرم از دام نر استفاده از اسپرم اپیدیدیمی است ه اخیراً مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این امر نه تنها در ورد قوچ بلکه در مورد حیوانات دیگر نیز انجام شده است. انجام تحقیقات روی قوچ و حیوانات دیگر عبارت اند از:

در سال ۱۹۹۱ میلادی توانایی اسپرم اپیدیدیمی قوچ جهت انجام واکنش کروزومی و نفوذ به تخمک گوسفند توسط Williams و همکاران مورد زیابی قرار گرفت (۱۷). در سال ۱۹۹۴ Bruan و همکاران احتمال سرد و نجمد کردن اسپرم انزالی و اپیدیدیمی نریان را مورد ارزیابی قرار دادند (۳). ر سال ۱۹۹۷ Sharma و همکاران توانستند عوامل موثر بر انجماد اسپرم اپیدیدیمی انسان جهت استفاده های کلینیکی را مورد تجزیه و تحلیل قرار دهند (۱۲). در سال ۲۰۰۰ میلادی Blash و همکاران اسپرم اپیدیدیمی بز را از ۲۰ رأس بز کشته شده اخذ نموده و پس از ارزیابیهای لازم آنها را منجمد نموده‌اند. از این اسپرمها هم به جهت تلقیح مصنوعی و هم باروری آزمایشگاهی (IVF) استفاده نموده‌اند (۱). در همین سال Moris و همکاران وضعیت توانا شدن اسپرم اپیدیدیمی نریان را پس از انجماد مورد ارزیابی قرار دادند (۹). و بالاخره Patrizo در همین سال توانست با موفقیت اسپرم اپیدیدیمی انسان را جهت انجماد و نگهداری مورد استفاده قرار دهد. این محقق میزان ۴۰ درصد آبستنی موفق همراه با تولد نوزاد زنده را با استفاده از تلقیح توسط اسپرم اپیدیدیمی منجمد گزارش نمود. این محقق همچنین گزارش داد که تفاوت معناداری بین انتقال رویانهای منجمد شده منتج

آموزشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.
گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
نویسنده مسؤول ptajik@ut.ac.ir

از تلقیح با اسپرم تازه و یا منجمد وجود ندارد (۱۱). تلاش حاضر بررسی مقدماتی است در مورد اسپرم اپیدیدیمی شتر یک کوهانه که برای اولین بار در ایران انجام شده است. در بررسی قبلی (اطلاعات منتشر نشده) اسپرم اپیدیدیمی شتر یک کوهانه مشخص شد درصد قابل ملاحظه ای از اسپرمها زنده بودند ولی میزان اسپرمهای دارای قطره پروتوپلاسمی نیز زیاد بود. وجود قطرات پروتوپلاسمی در اسپرمهای اخذ شده از اپیدیدیم قابل انتظار می‌باشد و عقیده بر این است که این قطرات با مرور زمان و بلوغ اسپرماتوزوئید محو می شوند. از طرف دیگر، تلقیح مصنوعی و انتقال رویان اخیراً در امر تولید مثل شتر مورد توجه قرار گرفته اند. با وجود اینکه در سالیان اخیر تلقیح مصنوعی در شتران یک کوهانه و دو کوهانه در آمریکای جنوبی مورد استفاده قرار گرفته است، ولی هنوز نیاز به استاندارد سازی روشهای جمع آوری و ارزیابی اسپرم احساس می‌شود. علاوه بر این تحرک کم اسپرم، عدم وجود تکنیکهای پیشرفته در انجماد اسپرم و نبود یک روش قابل اعتماد برای تعیین دقیق زمان تخمک ریزی و تلقیح مصنوعی، مشکلاتی هستند که اگر در آینده حل شوند، تلقیح مصنوعی را در شتر رایج خواهد نمود.

تغییرات مورفولوژیک اسپرماتوزوا در حین عبور از اپیدیدیم اتفاق می افتد که به وسیله Mansour در سال ۱۹۸۲ مطالعه شده است. آنها یافتند که درصد اسپرمهای بدون دم به طور مشهودی در قسمت دم اپیدیدیم نسبت به سر آن بیشتر است. درصد اسپرماتوزواهای همراه با قطره سیتوپلاسمی به طور مشهودی درسر بیشتر از بدنه یا دم اپیدیدیم است (نقل از ۸).

اکنون به اسپرم اپیدیدیمی به عنوان یک منبع تأمین گامت نر توجه می شود، همچنان که تحقیقات موجود به آن اذعان دارد (۶،۷)، لازم است تا این نوع منبع تأمین گامت در دامهای کشور مورد ارزیابی قرار گیرد. از طرف دیگر اکنون محیط تجاری Green buffer به عنوان یک محیط قابل قبول برای رقیق کردن اسپرم شتر مطرح است (۱۳،۱۴). تحقیق حاضر بر آن است تا میزان تحرک اسپرم اپیدیدیمی شتر یک کوهانه را در محیط تجاری Green buffer با یا بدون زرده تخم مرغ مورد ارزیابی قرار دهد. از طرف دیگر بر آن است تا اختلاف احتمالی بین میزان تحرک اسپرمهای گرفته شده از بیضه راست و چپ را مشخص نماید.

مواد و روش کار

محل انجام پژوهش: در پاییز و زمستان ۱۳۸۱ به کشتارگاه لاهوتی در اطراف تهران مراجعه و پس از کشتار شترهای بالغ بیضه‌های آنان شماره‌گذاری گردید. آنگاه راست یا چپ بودن بیضه ها مشخص و با ثبت تاریخ دقیق نمونه گیری در هر روز که به کشتارگاه رجوع می‌شد نمونه ها به آزمایشگاه که در فاصله کوتاهی از محل کشتار بود انتقال می یافتند. در آزمایش اول نمونه ها یا در مجاورت یخ (حدود ۴ درجه سانتیگراد) و یا در سرم فیزیولوژیک نرمال با گرمای ۳۷ درجه سانتیگراد حمل و از آزمایش دوم به بعد تمام نمونه ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

روش کار

در آزمایشگاه، بیضه‌ها یکبار دیگر با سرم فیزیولوژیک حاوی آنتی بیوتیک شستشو شده و سپس با برش تونیکا واژینالیس، اپیدیدیم مشخص می‌گردید. با توجه به اثرات سوء حضور خون برای اسپرم، ابتدا عروق سطحی موجود بر روی اپیدیدیم توسط تیغه بیستوری برشهای ظریفی داده شده و با ماساژ عروق توسط لبه کند تیغ، خون از داخل رگها تخلیه و توسط تامپون خشک

می‌گردید. بعد از خارج شدن خون، مجدداً بیضه ها و اپیدیدیم با سرم فیزیولوژی شستشو شده و به وسیله تامپون خشک می‌گردید. تا جایی ک امکان داشت بافت همبند موجود در اطراف اپیدیدیم جدا شده و توسط یک قیچی استریل، قسمتهای مورد آزمایش اپیدیدیم در محیطی که قبلاً برای آن تهیه شده بود، خرد می گردید. این محیط به مدت ۲۰ دقیقه قبل از خرد کردن اپیدیدیم در انکوباتور ۳۹/۵ درجه سانتیگراد با فشار ۵ درصد گاز کربنیک قرار می‌گرفت. بعد از خرد کردن اپیدیدیم، ظروف حاوی قطعات اپیدیدیم حداقل به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور منتقل می‌شد تا اسپرمها از داخل قطعات اپیدیدیم خارج شده و وارد محیط گردند. در این مرحله یک ارزیابی مقدماتی با بزرگنمایی ۱۰۰ تا ۴۰۰ انجام می‌گرفت. نمونه ها همچنین ا لحاظ غلظت مورد ارزیابی قرار گرفته تا همیشه مقدار ثابتی از اسپرم وار محیطهای مورد آزمایش گردد. این غلظت در تمام آزمایش حدود ۳۰ میلیو اسپرم در هر میلی لیتر (حدوداً ۱۰ برابر آنچه در IVF مورد استفاده قرا می‌گیرد) بود. البته قبلاً نشان داده شده است که غلظت اسپرم تا این مقدا آسیبی به خود اسپرم وارد نساخته و میزان ماندگاری آن را تحت تأثیر قرا نمی‌دهد (۱۵). لازم به یادآوری است که قبلا محیطهای مورد آزمایش ب صورت قطره های ۱۰۰ میکرونی تهیه و پس از پوشانیدن با پارافین استریل (ساخت شرکت مرک آلمان)، حداقل به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرا می‌گرفت. به فواصل یکساعت از افزودن اسپرم ظروف از انکوباتور خارج تحرک اسپرمها مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. این عمل پس از قرار دادن یک قطره همگن شده از سوسپانسیون اسپرم و محیط آزمایش بین لام و لامل گرم شده انجام می‌پذیرفت. محیط های مورد آزمایش عبارت بودند از:

۱. Green buffer + ۲۰درصد زرده تخم مرغ، ۲. Green buffer بدو زرده تخم مرغ.

بعد از تهیه لام در آزمایشگاه با میکروسکوپ با درشت نمایی (۱۰۰ مورفولوژی سلولهای اسپرم به تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر لام مورد مطالع قرار می گرفت.

تهیه رنگ: برای تهیه رنگ ۵ گرم نیگروزین را با ۰/۸۴ گرم ائوزین ۱/۴۵ گرم سدیم سیترات (هر دو ساخت شرکت مرک آلمان) و ۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط می شد. مواد این تحقیق از بیضه ۵۰ نفر شت یک کوهانه گرفته شده (مجموعاً ۱۰۰ بیضه) استفاده گردید.

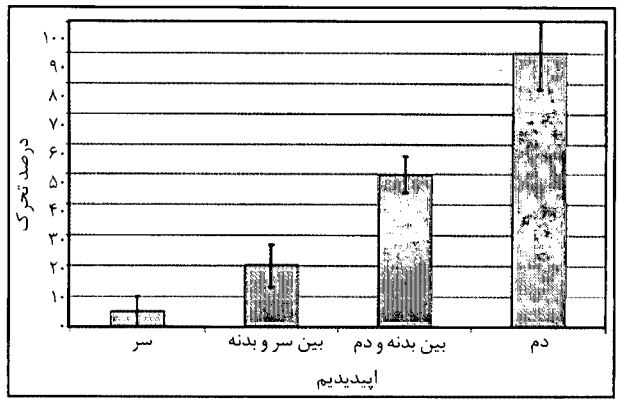
اطلاعات به دست آمده به وسیله آزمون مربع کای مورد ارزیابی قر گرفته و نتایج به صورت منحنی + انحراف استاندارد ارایه گردید.

نتایج

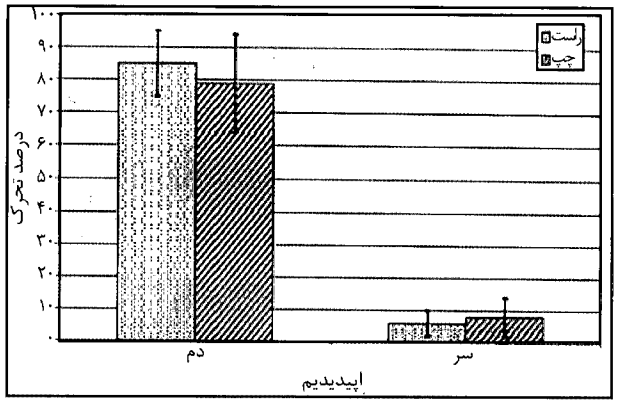
اسپرمهای گرفته شده از بیضه حمل و نقل شده در محیط سالین گر عمدتاً فاقد تحرک بودند (۲ ± ۳ درصد)، در حالی که حدوداً ۱۰ ± ۸۰ درص از اسپرمهای دم اپیدیدیم گرفته شده از بیضه های حمل شده در مجاور یخ متحرک بودند.آزمایشهای به عمل آمده نشان داد که اسپرمهایی که سر و نیم قدامی بدنه اپیدیدیم گرفته شده بود فاقد تحرک لازم بو (نمودارهای ۱ و ۲).

میزان تحرک اسپرم گرفته شده از سر اپیدیدیم به طور میانگین درصد، تحرک اسپرم گرفته شده از بدنه نزدیک به سر ۲۰ درصد، میزا تحرک اسپرمهای بین بدنه و دم اپیدیدیم حدود ۵۰ درصد و تحرک اسپرمها گرفته شده از ناحیه دم اپیدیدیم حدود ۹۰ درصد بود (نمودار ۱).

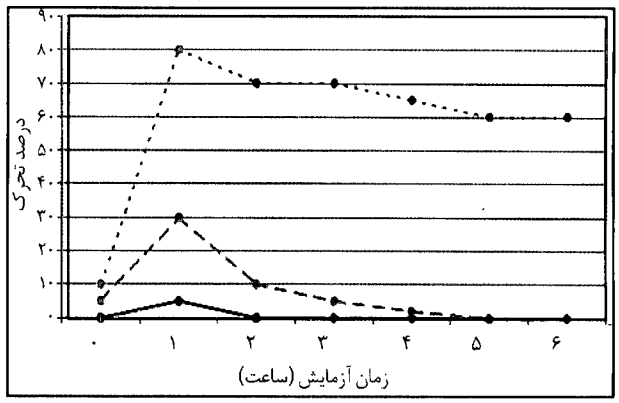
میانگین تحرک اسپرم اخذ شده از بیضه های راست و چپ اختلا



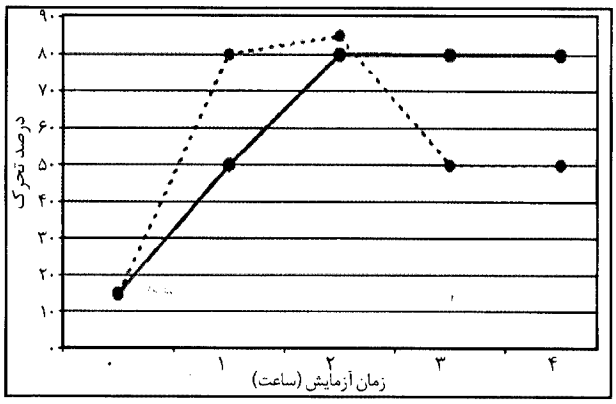
نمودار ۱- تحرک اسپرم قسمتهای مختلف اپیدیدیم شتر یک کوهانه.



نمودار ۲- میزان تحرک در سر و دم اپیدیدیم بیضه های راست و چپ.



نمودار ۳- تحرک اسپرم شتر یک کوهانه در محیط Green buffer به علاوه ۲۰ درصد زرده تخم مرغ در سر اپیدیدیم (خط ممتد) بدنه (خط منقطع) و دم اپیدیدیم (نقطه چین).



نمودار ۴- میزان تحرک اسپرم دم اپیدیدیم در محیط Green buffer با ۲۰ درصد زرده تخم مرغ (خط ممتد) و یا بدون آن (نقطه چین).

معنادار نداشت، درحالی که بین اسپرمهای گرفته شده از دم و سر اپیدیدیم از این جهت اختلاف کاملاً مشخص و معنادار بود (P< ۰/۰۱) (نمودار۲).

همان طور که در نمودار ۳ مشخص شده‌است، در ابتدای آزمایش که اسپرمها سرد بوده‌اند اختلافی بین میزان تحرک در قسمتهای مختلف اپیدیدیم وجود ندارد، اما با گذشت زمان و به سرعت در ساعت اول آزمایش این اختلاف مشخص می‌گردد. به طوری که حدوداً ۸۰ درصد از اسپرمهای ناحیه دم، ۳۰ درصد از اسپرمهای ناحیه بدنه و ۵ درصد از اسپرمهای ناحیه سر دارای حرکت بودند که اختلاف بین آنها معنا دار بود (P<۰/۰۵). این میزان اختلاف در ساعت دوم آزمایش برای اسپرمهای گرفته شده از سر اپیدیدیم (بدون تحرک) و اسپرمهای گرفته شده از بدنه اپیدیدیم (۱۰ در صد تحرک کمتر شده و نسبت اختلاف آنها با اسپرمهای گرفته شده از دم اپیدیدیم (۷۰ در صد تحرک) اختلاف بیشتر گردید (P< ۰/۰۱). اختلاف تحرک در اسپرمهای گرفته شده از دم با دیگر قسمتها تا پایان زمان مطالعه باقی ماند.

نمودار ۴ میزان تحرک اسپرم گرفته شده از دم اپیدیدیم را در محیط Green buffer با یا بدون ۲۰ درصد زرده تخم مرغ نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود وجود زرده تخم مرغ باعث تأخیر در رسیدن تحرک به حداکثر خود شده اما در مراحل بعد این تحرک را به طور یکنواخت حفظ نموده‌است.

بحث

گزارشی در مورد باروری آزمایشگاهی تخمکهای بالغ شده شتر دوکوهانه در آزمایشگاه با استفاده از اسپرم اپیدیدیمی این حیوان توسط Bou و همکاران منتشر گردید (۴). ایشان باروری را تا مرحله ۱۶-۸ سلولی مورد مطالعه قرار دادند. محیط مورد استفاده در مطالعه مذکور محیط باروری معرفی شده توسط Brackett و Oliphant بود (۲) که به آن آلبومین سرم گاو اضافه شده بود. در این مطالعه اسپرم جهت توانا شدن به مدت ۲ ساعت در محیط یاد شده قرار گرفت ولی درخصوص نتایج تحرک اولیه و تحرک نهایی اسپرم در این محیط گزارشی موجود نیست. Del Campo و همکاران نیز در سال ۱۹۹۴ اولین باروری آزمایشگاهی تخمکهای لاما را با استفاده از اسپرم اپیدیدیمی آن گزارش نمودند (۵). در این گزارش حدود ۲۹ درصد از تخمکها بارور شدند که ۵۷ در صد از آنها حدود ۱۷ درصد تخمکهای اولیه دارای پرو نوکلئوس نر و ماده بودند. هرچند در گزارش Bou و همکاران میزان بلوغ تخمکها نسبت به آنچه در مورد گاو گزارش می شود کمتر و حدود ۴۶/۷ در صد و میزان باروری حدود ۴۳/۲ درصد گزارش شده است و در گزارش Del Campo میزان باروری و تشکیل پرونوکلئوس نر و ماده بسیار کم بود، اما این موضوع خود مؤید این مطلب است که اسپرم اپیدیدیمی شتر دو کوهانه توانایی باروری تخمکهای آن را دارد. در گزارشهای مورد بحث اطلاعی در مورد محل (سر، بدنه و یا دم) اپیدیدیم که اسپرمها از آنجا گرفته شده است، میزان زنده و یا مرده بودن اسپرمها، میزان تحرک و بالاخره غلظت اسپرمها داده نشده است. در بررسی حاضر در مورد شتر یک کوهانه، چنین به نظر می‌رسد که دم اپیدیدیم از لحاظ تحرک اولیه (یکساعت پس از قرار گرفتن در گرمخانه) و ماندگاری تحرک از بقیه مناطق بهتر است. هرچند که در مطالعه قبلی ما (اطلاعات منتشر نشده) بین میزان اسپرمهای زنده از یک طرف و نسبت اسپرمهای زنده دارای قطره های پروتوپلاسمی از طرف دیگر اختلاف معناداری وجود نداشت.

Musa و همکاران در سال ۱۹۹۲ میزان حرکت اسپرم انزالی شتر یک کوهانه را حدود ۵۰ در صد گزارش نموده‌اند (۱۰). در مطالعه حاضر نشان داده شد که بستگی به زمان مطالعه و محل نمونه برداری این میزان متفاوت و از صفر تا ۸۵ در صد متغیر است بدین معنا که اسپرمهای گرفته شده از سر و بدن اپیدیدیم دارای تحرک بسیار کم و اسپرم گرفته شده از دم اپیدیدیم حدوداً یکساعت پس از جدا سازی حد اکثر تحرک را دارا هستند. قرار دادن اسپرم در محیط Green buffer به علاوه ۲۰ درصد زرده تخم مرغ نتوانست کمکی به دوام تحرک اسپرمهای گرفته شده از سر یا بدنه اپیدیدیم نماید. در حالی که در مورد اسپرمهای دم اپیدیدیم علی رغم این که در ابتدای آزمایش تحرک کمی داشتند ولی با افزودن به این محیط همراه ۲۰ درصد زرده تخم مرغ تحرک قابل قبولی تا پایان آزمایش داشت.

گزارش شده است که تحرک اسپرم سر اپیدیدیم در گاو با افزایش میزان بی کربنات و افزایش pH محیط و در نتیجه pH داخل سلولی، افزایش می‌یابد (۱۶). در مطالعه Vijayaraghvan و همکاران در سال ۱۹۸۵ بر روی اسپرم اپیدیدیمی گاو میزان تحرک صفر و ۳۶ درصد به ترتیب برای اسپرم سر اپیدیدیم در محیطهای بدون بی کربنات و ۲۵ میلی مول بی کربنات و میزان تحرک ۲۸ و ۸۸ درصد را برای اسپرم دم اپیدیدیم در همین محیطها گزارش گردید. در مطالعه حاضر این امر مورد بررسی قرار نگرفت اما تفاوت میزان تحرک اسپرم سر (صفر تا ۵ درصد) و دم اپیدیدیم (۸۰ تا ۹۰ درصد) و اینکه محیط آزمایش احتمالا حاوی بی کربنات لازم بوده‌است این احتمال را قوت می‌دهد که همچنان که بی کربنات میزان تحرک اسپرم سر اپیدیدیم گاو را افزایش می‌دهد در مورد اسپرم شتر مؤثر نیست. در آزمایش دیگر (منتشر نشده) اسپرم سر اپیدیدیم شتر یک کوهانه در محیط حاوی ۳۷ میلی مول بی کربنات هم غیر متحرک بود. با این حال اثبات نهایی این مطلب نیز نیاز به آزمایشهای تکمیلی دارد.

References

1. Blash, S., Melican, D. and Gavin, V. (2000): Cryopreservation of epididymal spermobtained at necropsyfrom goats. Theriogenology, 54: 899-905.
2. Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12: 260-274.
3. Braun, J., Sakai, M., Hochi, S. and Oguri, N. (1994): Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. Theriogenology, 41, 4: 809-818.
4. Bou, S.C., Pang, YF., Zhang, S.L. and Xue, X.X. (1993): Preliminary study on in vitro fertilization in the domestic camel (*Camelus bacterianus*). Chinese J. Zool. 28: 35-37.
5. Del Campo, M.R., Del Campo, C., Donoso, M.X., Berland, M. and Mapletoft, R.J. (1994): In vitro fertilization and development of llama (*Lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. Theriogenology, 41: 1219-1229.
6. Janzen, N., Goldstein, M., Schlegel, P.N., Palermo, G.D. and Rosenwaks, Z. (2000): Use of electively cryopreserved microsurgically aspirated epididymal sperm with IVF and intracytoplasmic sperm injection for obstructive azoospermia. Fertil. Steril, 74: 696-701.
7. Kikuchi, J., Nagai, T., Kashiwasaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, N. and Kaneko, H. (1998): Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 C. Theriogenology 50: 615-623.
8. Menkt, H., Rath, D., Mussa, B. and EL-Naygar, M.A. (1990): Reproduction in camels are review. FAO Animal Production and Health, P: 82.
9. Morris, L.H.A., Stout, T.E., Li, X. and Alien, W.R. (2000): The capacitation status of fresh and frozen-thawed epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Theriogenology, 53: 488.
10. Musa, B., Sieme, H., Merkt, H. and Hago, B.E.D. (1992): Artificial insemination in dromedary camels. Prc. 1st Int. Camel Conf, 179-182.
11. Patrizio, P. (2000): Cryopreservation of epididymal sperm. Mol. Cell. Endocrinol. 169: 11-14.
12. Sharma, R.K., Padron, O.F., Thomas, A.J. and Agarwal, A. (1997): Factors associated with the quality before freezing and after thawingof sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. Fertil. Steril. 64: 628-631.
13. Skidmore, J.A., Billal, M. and Allen, W.R. (2000): Using modern reproductive technologies such as embryo transfer and artificial insemination to improve the reproducyive potential of dromedary camels. Proc. Int.Workshop Camel Calf Ouarzazate, Morocco, 24-26 October 1999. In: Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaus, 53: 97-100.
14. Skidmore, J.A., Billal, M., Allen, W.R. and Short, R.V. (1999): Modern reproductive methods to hybridize old and new world camelids: *Camelus dromedarius* X *Lama guanicoe*. Reproduction in domestic Animals, 34 (suppl 6): 100-103.
15. Tajik, P., Wei-Hua, W., Okuda, K. and Niwa, K. (1994): In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration. Biol. Reprod., 50:1231-1237.
16. Vijayaraghavan, S., Critchlow, L.M. and Hoskins, D.D. (1985): Evidence for a role for cellular alkalinization in the cyclic Adenosine 3', 5'- Monophosphate - mediated initiation of motility in bovine caput spermatozoa. Biol. Reprod. 32: 489-500.
17. Williams, R.M., Graham, J.K. and Hamersted, R.H. (1991): Determination of capacity of ram epididymal and ejaculated sperm to undergo the acrosome reaction and penetrate ova. Biol. Reprod. 44: 1080-1091.