



돼지 정자의 동결보존 시 α -Linolenic Acid의 효과

이원희¹ · 황보용¹ · 이상희² · 양진우¹ · 김화영¹ · 이유림¹ · 박지은¹ · 정희태³ · 양부근¹ · 박춘근^{1,†}

¹강원대학교 동물생명과학대학, ²강원대학교 공동자원연구소, ³강원대학교 수의과대학

Effects of α -Linolenic Acid in Frozen-thawed Boar Spermatozoa

Won-Hee Lee¹, Yong Hwangbo¹, Sang-Hee Lee², Jin-Woo Yang¹, Hwa-Young Kim¹, Yu-Rim Lee¹,
Ji-Eun Park¹, Hee-Tae Cheong³, Boo-Keun Yang¹ and Choon-Keun Park^{1,†}

¹College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Institute of Animal Resources, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

³College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate effect of α -linolenic acid (ALA) on viability, acrosome reaction and mitochondrial intact in frozen-thawed boar sperm. The boar semen was collected by gloved-hand method and cryopreserved in 20% egg yolk freezing extender containing ALA (0, 3, 5, and 10 ng/mL) with 0.05% ethanol. The frozen-boar spermatozoa were thawed at 37.5°C for 45 sec in water-bath. The spermatozoa samples were evaluated the plasma membrane integrity, acrosome reaction, and mitochondrial integrity using flow cytometry. In results, population of live sperm with intact plasma membrane was significantly higher in control and 3 ng/mL ALA treatment group than ethanol group ($p < 0.05$). In contrast, dying sperms were higher in ethanol group than 3 ng/mL ALA treatment ($p < 0.05$). Acrosomal membrane damage in all sperm population was reduced in 3 ng/mL ALA groups compared with ethanol treatment ($p < 0.05$). However, acrosome damage in live sperm population was no significant difference among the all treatment groups. Mitochondrial integrity was not influenced by ALA treatments in both of live and all sperm population. In conclusion, this results show that supplement of ALA during the cryopreservation process could reduce the membrane damages including plasma and acrosomal membrane, whereas ALA did not influence to mitochondria in boar spermatozoa. Therefore, these results suggest that ALA can protect against the membrane damage derived cryo-stress, and cryopreservation efficiency of boar semen would be improved by use of ALA.

(Key words : Alpha-linolenic acid, Cryopreservation, Sperm characteristics, Pigs)

서론

가축산업에서 정자는 인공수정 및 체외수정을 포함한 다양한 보조생식술(assisted reproductive technology; ART)에 사용되고 있다. 그러나 정자는 체내 성숙과정 동안 복구능력을 상실하게 되며, 이러한 특징으로 인해 *in vitro* 환경에서 사정된 정자의 액상보존 동안 정자의 생존율 및 수정능력이 감소하므로 장기간 보존이 어렵다(Silva

와 Gadella, 2006). 그렇기 때문에 장기간 보존을 위해 정자를 동결보존하며, 동결보존된 정자는 대사활동이 감소하거나 멈추기 때문에 수명이 연장된다(Yoshida, 2000). 그러나 정자의 동결과 용해과정 중 발생하는 빙정은 세포막에 부착된 인지질과 단백질의 재분배, 막투과성과 같은 원형질막의 구조 및 기능을 변화시키며(Lessard 등, 2000), 이러한 변화들에 의한 활성산소(Reactive oxygen species; ROS) 발생 및 대사활동의 교란(Grobfeld 등, 2008)으로 인해 결과적으로 정자의 운동성, 생존율 및 수

* This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio Industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MA-FRA) (IPET 312060-05).

† Corresponding author : Phone: +82-33-250-8627, E-mail: parkck@kangwon.ac.kr

정능력이 감소하게 된다(Bailey 등, 2003).

세포의 원형질막을 구성하는 인지질은 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acids; PUFAs)을 포함하고 있으며, 정자의 원형질막에 존재하는 PUFAs의 구성은 식이, 종 및 품종에 따라 차이를 보인다(Maldjian 등, 2005; Waterhouse 등, 2006). 이러한 PUFAs는 정자와 난자 간의 막 결합을 위해 필요한 정자 원형질막의 유동성을 조절하는 등 세포막의 기능 조절에 중요한 역할을 하기 때문에 정자 원형질막의 온전성, 운동성 및 생존을 위해 중요하다(Aksoy 등, 2006). 사람과 소에서 docosahexanoic acid(DHA)의 섭취는 정자의 운동성을 증가시키며(Conquer 등, 1999; Gholami 등, 2010), 오메가-3(n-3) 지방산을 포함하는 fish oil의 섭취는 돼지, 소 및 양에서 정자의 운동성 및 생존율을 향상시켰다는 보고가 있다(Rooke 등, 2001; Samadian 등, 2010; Khoshvaght 등, 2016). 또한 *in vitro* 환경에서 PUFAs의 처리 역시 정자의 성상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kaka 등, 2015a). 특히 Shevchenko와 Simons의 보고(2010)에서 세포의 원형질막에 존재하는 α -linolenic acid(ALA)는 원형질막에 에너지를 공급하고, 원형질막 단백질을 조절하는 것으로 알려졌다. 또한 ALA는 원형질막의 기능을 정상화시키고 유지함으로써 정자의 생존을 지속시키지만, 동결-융해 과정 동안 감소하는 것으로 알려져 있다(Parks와 Lynch, 1992). 본 연구진은 동결-융해 과정 중 감소하는 지방산으로 인해 정자의 손상이 증가하고, ALA의 보충이 동결-융해된 정액의 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 추측되었다. 따라서 본 연구는 정자의 동결과정 동안 ALA의 첨가가 동결-융해 후 정자의 성상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

정액 채취

동물실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No:KIACUC-09-0139)을 얻어 지침에 따라 수행하였으며, 본 연구에 이용된 돼지정액은 음경수압법을 이용하여 돼지에서 채취하였다. 38°C로 가온된 Modified Modena B (30.0 g/L glucose, 2.25 g/L EDTA, 2.50 g/L sodium citrate, 1.00 g/L sodium bicarbonate, 5.00g/L tris, 2.50 g/L citric acid, 0.05 g/L cysteine 및 0.30 g/L gentamicin sulfate)와 정액을 1:1 (v/v)로 희석하여 1시간 이내로 실험실로 운반 후 18°C 냉장고에서 24시간 동안 보관하였다. 본 연구에는 80 % 이상의 생존율과 20% 미만의 침체 반응을 나타내는 정액을 선별하여 이용하였다.

정액 동결 및 융해

1차 동결보존액은 11% α -lactose 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 20% egg-yolk를 첨가한 후 원심분리(3,000 rpm, 30 min, 4°C)하여 상층액을 회수한 뒤, 다른 농도의 ALA(0, 3, 5 및 10 ng/mL)를 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. ALA의 희석은 매뉴얼에 따라 ethanol을 이용하였고, 대조군은 1차 동결보존액에 ethanol 및 ALA

를 모두 첨가하지 않았으며, 대조군을 제외한 ALA 첨가군 내 ethanol의 농도는 0.05%가 되도록 하였다. 2차 동결보존액은 ALA가 첨가되지 않은 1차 동결보존액에 9% Glycerol(Sigma)와 1.5% Orvus Es Paste(OEP; Nova Chem, USA)를 첨가하여 4°C 냉장고에 보관하였다. Modena B로 희석된 돼지 정액을 원심분리(1,500 rpm, 10 min, 25°C)하여 상층액을 제거한 후, 정자의 농도가 1×10^9 개/mL가 되도록 1차 동결보존액과 혼합하여 2시간 동안 4°C로 냉각하였다. 그 후 2차 동결보존액과 혼합한 뒤 0.5 mL 스트로우에 주입하였고, 10분 동안 -120°C까지 예비 동결한 후 액체질소에 동결 보존하였다. 정자의 성상 분석을 위하여 동결보존된 정액은 37.5°C 항온수조에서 45 초 동안 용해하여 실험에 이용하였다.

Flow Cytometry

정액의 성상을 검사하기 위해 이용된 돼지 정자는 Modena B를 사용해 1×10^6 개/mL의 농도로 희석한 후, 염색을 실시하였다. 정자의 생존을 검사를 위해 40 nM의 SYBR-14 (Live/Dead sperm viability kit, Molecular probes, USA), 침체 반응을 검사를 위해 2 μ M의 Lectin from *Arachis hypogaea*(FITC-PNA; Sigma, USA), 미토콘드리아 온전성 측정을 위해 2 μ M의 Rhodamine123 (Sigma, USA)을 희석된 정자에 첨가하여 암실에서 38°C 조건 하에서 5분 동안 배양하였고, 2 μ M의 Propidium iodide(PI; Sigma, USA)를 사용하여 이중염색한 후 암실에서 38°C 조건 하에 5분 동안 배양하였다. 염색이 완료된 정액은 원심분리(1,500 rpm, 5분)를 하고 상층액을 제거한 뒤, PBS(-)를 분주하여 Flow cytometry(BD FACSCanto™ II, Becton Dickinson, San Diego, USA)로 정자 10,000개의 형광 값을 측정하였다. 동결-융해된 정자의 생존율, 침체 반응 및 미토콘드리아 온전성은 CELLQuest version 6.0 (Becton Dickinson)을 이용하여 분석하였다.

통계분석

실험 결과는 Statistical Analysis System(SAS®, version 9.3) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 일반선형모형(General Linear Model; GLM)을 적용하였고, Duncan의 다중범위검정(Multiple Range test)에 의하여 유의차를 검정하였다($p < 0.05$).

결 과

돼지정자의 동결 시 ALA 첨가에 의한 정자의 생존율을 Fig. 1에 나타낸 바와 같이, 온전한 원형질막이 부착된 생존 정자는 control과 3 ng/mL ALA 처리군에 비하여 0 ng/mL ALA 처리군에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다($p < 0.05$). 그러나 5 및 10 ng/mL ALA 처리군은 control 및 3 ng/mL ALA 처리군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 다소 감소하였다. 반면, 온전한 원형질막을 가진 죽은 정자의 비율은 0 ng/mL ALA 처리군에서 가장 높았으며, 3 ng/mL 처리군보다 유의적으로 높은 것을 확인하였다($p < 0.05$). Fig. 2는 정자에서 침체반응이 유도된 정

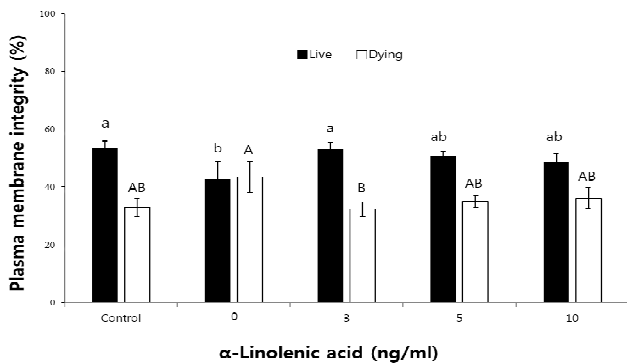


Fig. 1. Effect of α -linolenic acid (0, 3, 5 and 10 ng/mL) with 0.05% ethanol on plasma membrane integrity of frozen-thawed spermatozoa in pigs (Control: without ethanol and α -linolenic acid). ^{ab} Values with different superscripts indicate significant difference within a live column ($p < 0.05$), ^{AB} Values with different superscripts indicate significant difference within dying column ($p < 0.05$).

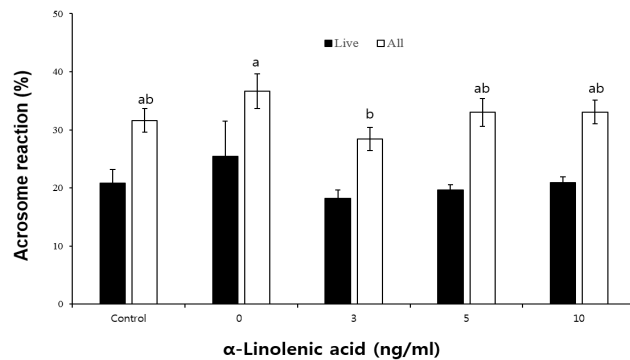


Fig. 2. Effect of α -linolenic acid (0, 3, 5 and 10 ng/mL) with 0.05% ethanol on acrosome reaction of frozen-thawed spermatozoa in pigs (Control: without ethanol and α -linolenic acid). ^{ab} Values with different superscripts indicate significant difference within all group column ($p < 0.05$).

자의 비율을 나타내었다. 그 결과, 살아 있는 정자 집단에서 첨체반응은 모든 처리군 사이에서 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 모든 정자 집단에서 비교하였을 때 3 ng/mL ALA 처리군에서 가장 낮은 것을 확인하였고, 0 ng/mL 처리군에 비하여 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 반면, 5 및 10 ng/mL ALA 처리군은 3 ng/mL ALA 처리군과 유의적 차이는 없었지만, 다소 증가한 것을 확인하였다. Fig. 3에서 미토콘드리아 온전성은 살아있는 정자와 모든 정자 집단에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 0 ng/mL ALA 처리군에서 가장 낮은 수치를 보였다.

고 찰

본 연구는 돼지 정액의 동결과정에서 ALA의 처리에

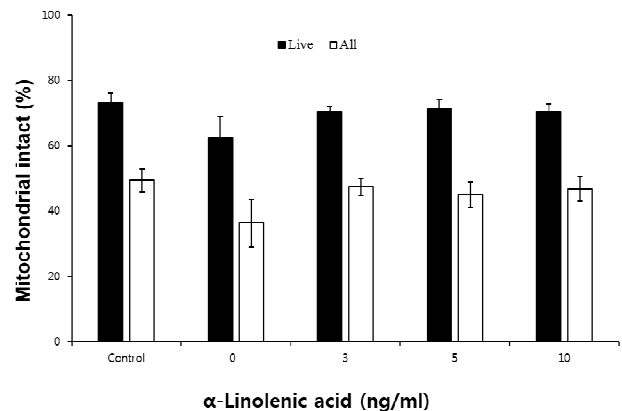


Fig. 3. Effect of α -linolenic acid (0, 3, 5 and 10 ng/mL) with 0.05% ethanol on mitochondrial intact of frozen-thawed spermatozoa in pigs (Control: without ethanol and α -linolenic acid).

의한 동결-융해 후 정자의 원형질막 온전성, 첨체반응 및 미토콘드리아 온전성의 변화를 확인하였다. 동결보존 과정 동안 정자는 물리적, 화학적 충격에 노출되어 원형질막의 지질 구성의 변화, 생존율 및 운동성의 감소 등 부정적인 영향을 받는다(Martinez-Soto 등, 2013). 특히 정자 원형질막에 존재하는 PUFAs는 막 유동성을 유지하기 때문에 정자의 기능적 성장에 매우 중요하다(Lenzi 등, 2002). 그러나 사람, 돼지 및 소를 포함한 포유류의 정자는 원형질막에 많은 PUFAs를 포함하고 있기 때문에 ROS에 의한 충격에 민감하며, ROS로 인한 지질과산화가 쉽게 발생한다고 알려져 있다(Alvarez와 Storey, 1995).

정자의 원형질막 기능은 생존율, 세포 죽음 및 운동성과 직접적으로 관련 있는 중요한 요소이며, 동결-융해 과정 동안 온도 변화, 빙정 형성 및 삼투압 변화 등 다양한 물리적, 화학적 충격에 의해 손상된다(Watson, 2000). 이러한 손상을 완화하기 위하여 동결과정에서 당류, 항산화제 및 지방산과 같은 첨가제를 사용하는 연구가 진행되었다(Bucak 등, 2007; Memon 등, 2011; Kaka 등, 2015a). 특히 ALA, DHA 등을 포함한 PUFAs는 원형질막의 구성 요소로서 막 투과성 및 막단백질 조절에 중요한 역할을 하기 때문에, 막 기능 유지에 있어 필수적인 요소이다. 소 정액의 동결과정 동안 ALA를 첨가했을 때 정자 내 ALA 함량이 증가하였으며(Kaka 등, 2015b), 이는 정자가 동결과정 중 외부의 ALA를 흡수할 수 있다는 것을 의미한다. 본 연구에서 원형질막 온전성은 에탄올의 처리에 의해 감소하였으나, 3 ng/mL ALA 처리에 의해 증가하는 것을 확인하였고, 5 및 10 ng/mL ALA를 처리하였을 때 다소 감소하였다. Piper 등(1994)의 연구에 따르면 ethanol은 세포 원형질막의 단백질 함량과 ATPase 단백질의 수준을 감소시킴으로써 세포막에 손상을 준다고 알려져 있다. 본 실험에서 돼지 정자의 동결과정 중 첨가된 ethanol에 의해 정자 원형질막의 온전성이 유의적으로 감소하였고, 3 ng/mL ALA를 처리하였을 때 ethanol에 의한 원형질막의 손상을 감소시켜 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 생각된다. 5 ng/mL 이상의 ALA를 처리하였

을 때 원형질막 온전성은 다소 감소하였고, 이러한 결과는 과도한 양의 지방산은 정자에서 지질과산화를 유도할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 또한 본 연구의 결과는 소 정액의 동결보존 동안 5 ng/mL ALA를 처리하였을 때, 원형질막의 기능적 온전성과 생존율이 다른 처리군보다 높았다는 보고(Kaka 등, 2015a)와 유사하지만, 최적의 농도는 차이를 보였으며, 이는 중에 따른 정자의 생리적 차이 때문이라고 생각된다.

정자의 침체는 acrosin 및 hyaluronidase 등의 효소를 포함하고 있으며, 침체반응은 정자가 난자에 침투하기 위한 필수적인 현상이다. 정자의 동결보존 동안 발생하는 다양한 충격과 ROS 발생에 의해 침체반응이 유도되며 (Watson, 2000; O'Flaherty 등, 2005), 수정 이전에 침체반응이 유도된 정자는 수정능력이 감소하게 된다. 또한 침체반응은 정자의 생존율과 직접적으로 연관되어 있다. 본 연구에서 침체반응은 3 ng/mL ALA 처리군에서 다른 처리군보다 적게 유도되었음을 확인하였고, 5 ng/mL 이상의 ALA는 침체반응을 증가시켰다. 이는 정자의 원형질막이 3 ng/mL ALA 처리군에서 가장 온전하게 나타난 결과와 일치한다. 하지만 live 정자와 모든 정자 집단에서 침체 반응의 수치가 차이를 보이는 것을 확인하였으며, 이는 침체 반응이 일어난 정자의 집단이 live 그룹보다 all 그룹의 정자에 더 많이 포함되어 있기 때문에 수치적인 차이가 발생한 것으로 생각된다. Kaka 등의 연구(2015b)에서 5 ng/mL ALA를 첨가하여 동결-융해한 소 정자의 침체막 온전성이 가장 높았으나, 10 ng/mL 이상의 ALA 처리는 침체막 손상을 증가시켰다고 보고되었다. 이러한 결과로 보았을 때, 적정 농도의 ALA는 원형질막의 기능 유지를 통하여 침체막을 보호하지만, 고농도의 ALA는 동결과정에서 발생하는 ROS에 의한 지질과산화를 증가시켜 원형질막 및 침체막에 손상을 주는 것으로 생각된다.

동결-융해 후 정자의 원형질막 및 침체막이 ALA에 의해 영향을 받은 것과 다르게 미토콘드리아 온전성은 모든 처리군에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 사람 정자에서 arachidonic acid를 포함한 free unsaturated fatty acid의 처리는 미토콘드리아에서 ROS의 발생을 증가시키는 것으로 보고되었다(Koppers 등, 2010). 그러나 정자에서 PUFAs의 처리가 미토콘드리아의 기능에 미치는 영향은 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 돼지 정액의 동결과정 동안 ALA 첨가는 동결로 인해 발생하는 원형질막 및 침체막의 손상을 감소시킬 수 있으며, 최적의 ALA 수준은 3 ng/mL임을 확인하였다. 결론적으로, 돼지 정자의 동결보존 시 ALA의 사용은 동결보존된 정액의 품질과 동결효율을 향상시킬 수 있을 것이라고 생각된다.

인용문헌

1. Aksoy Y, Aksoy H, Altinkayanak K, Aydin HR, Ozkan A (2006): Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:75-79.
2. Alvarez JG, Storey BT (1995): Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42:334-336.
3. Bailey JJ, Morrie A, Cormier N (2003): Semen cryopreservation: success and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci* 83(3):393-401.
4. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, Tekin N, Akcay A (2007): The influence of trehalose, taurine, cystramine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67(5):1060-1067.
5. Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F (1999): Fatty acid analysis of blood, serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic versus asthenozoospermic males. *Lipids* 34:793-799.
6. Gholami H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli MH (2010): Effect of feeding docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology* 74:1548-1558.
7. Grobfield R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D (2008): New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70:1225-1233.
8. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Behan AA, Ebrahimi M (2015a): Alpha-Linolenic acid supplementation in tris extender can improve frozen-thawed bull semen quality. *Reprod Dom Anim* 50:29-33.
9. Kaka A, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, Behan AA, Kaka U, Ebrahimi M (2015b): α -Linolenic acid supplementation in BioXcell extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Anim Reprod Sci* 153:1-7.
10. Khoshvaght A, Towhidi A, Zare-shahneh A, Noroozi M, Zhandi M, Davachi ND, Karimi R (2016): Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology* 85: 807-812.
11. Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ (2010): Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radical Bio Med* 48:112-119.
12. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E (2002): Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 65:301-304.
13. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JJ, Sullivan R

- (2000): Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* 21:700-707.
14. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R (2005): Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63:411-421.
 15. Martinez-Soto JC, Landeras J, Gadea J (2013): Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology* 1: 365-375.
 16. Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Andrey G (2011): Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Anim Reprod Sci* 129:44-49.
 17. O'Flaherty C, Breining E, Beorlegui N, Beconi MT (2005): Acrosome reaction in bovine spermatozoa: Role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General subjects* 1726(1):96-101.
 18. Parks JE, Lynch DV (1992): Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29(2): 255-266.
 19. Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Recnacq M, Boucherie H (1994): Induction of major heat-stress proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp 30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology* 140(11):3031-3038.
 20. Rooke JA, Shao CC, Speake BK (2001): Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. *Reproduction* 121:315-322.
 21. Samadian F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M (2010): Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal* 4:2017-2022.
 22. Shevchenko A, Simons K (2010): Lipidomics: coming to grip with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(8):593-598.
 23. Silva PFN, Gadella BM (2006): Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65(5):958-978.
 24. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR (2006): Within and breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131:887-894.
 25. Watson PF (2000): The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
 26. Yoshida M (2000): Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 60-61:349-355.
- (Received August 5 2016 Accepted August 29 2016)