تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۵
صفحه‌های ۱۹۰-۱۸۳

ارزیابی اثر تغذیهٔ افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید بر انجمادپذیری اسپرماتوزوای خروس

محمدامین نمازی‌زادگان[۱]، ملک شاکری[۲*]، مهدی ژندی[۲]، مجتبی زاغری[۳]، رامین شهابی[۱]

۱. کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۴/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۷/۱۵

چکیده

به‌منظور ارزیابی اثر افزودن گوانیدینواستیک‌اسید در جیرهٔ غذایی خروس بر شاخص‌های انجمادپذیری اسپرماتوزوآ، آزمایشی با ۲۰ قطعه خروس گلهٔ مادر گوشتی سویهٔ تجاری راس در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و پنج تکرار در هشت هفته انجام شد. خروس‌ها با جیره‌های حاوی سطوح صفر (شاهد)، ۰/۰۶، ۰/۱۲، و ۰/۱۸درصد از مکمل گوانیدینواستیک‌اسید تغذیه شدند. اسپرم‌گیری هفتگی و به روش مالش شکمی انجام شد. پس از افزودن نمونه‌های منی به رقیق‌کننده، برای تعادل دمایی در دمای پنج درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌های حاوی منی به داخل نی‌های انجماد منتقل شدند و در معرض بخار ازت قرار گرفتند، و بعد در ازت مایع ذخیره شدند. پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی اسپرماتوزوآ، فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، ریخت‌شناسی، و یکپارچگی غشا اندازه‌گیری و مقایسه شد. میانگین جنبایی کل در سطح ۰/۱۲ و ۰/۱۸درصد، در مقایسه با سایر سطوح بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین در میانگین جنبایی پیش‌رونده، تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند و در سطح ۰/۱۲ و ۰/۱۸درصد، به نسبت سایر سطوح بیشتر بود (P<۰/۰۵). تفاوتی در فراسنجه‌های زنده‌مانی، ریخت شناسی، و یکپارچگی غشای اسپرماتوزوآ مشاهده نشد. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که افزودن گوانیدینواستیک‌اسید در جیرهٔ خروس‌ها در تأمین انرژی اسپرماتوزوآ تأثیرگذار است و باعث بهبود فراسنجه‌های جنبایی اسپرماتوزوآ پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: انجماد و یخ‌گشایی، پیش‌ساز کراتین، جیرهٔ خوراکی خروس، ذخیرهٔ انرژی اسپرماتوزوآ، مایع منی خروس.

* نویسنده مسئول Email: mshaker@ut.ac.ir

مقدمه

توسعهٔ پرورش طیور در سال‌های اخیر و تبدیل‌شدن آن به صنعتی بزرگ و فعال از نظر تهیهٔ گوشت سفید و تخم‌مرغ، در رفع نسبی بحران کمبود پروتئین حیوانی، بسیار مؤثر و مفید بوده و توانسته است از نظر تأمین مواد غذایی نقش ارزنده‌ای داشته باشد. برای پیشرفت این صنعت به راهکارهایی برای کم‌شدن هزینه‌ها، انتخاب بهترین نژادها، و افزایش بهره‌وری نیاز است. در این زمینه باتوجه به سهم بسیار بارز خروس‌ها در هزینه‌ها و مشکلات مربوط به مدیریت همزمان مرغ و خروس در گله‌های مادر، بحث جداسازی خروس‌ها و استفاده از روش تلقیح مصنوعی مطرح است. در روش تلقیح مصنوعی، می‌توان از یک انزال خروس برای بارورکردن ۲۰ مرغ استفاده کرد و هزینه‌های تولید را کاهش داد [۱ و ۲]. در این روش می‌توان از اسپرماتوزوای تازه و یا منجمد استفاده کرد، اما محدودیت‌های زمانی ذخیره‌سازی به‌صورت مایع موجب گرایش به سوی انجماد اسپرماتوزوآ شده است [۳].

حدود ۵۰ سال است که به انجماد اسپرماتوزوای پرندگان توجه شده و روش‌های گوناگونی در این راستا مطالعه شده است [۴].از اهداف اصلی انجماد اسپرماتوزوای طیور نگهداری طولانی‌مدت، حمل‌ونقل آسان، و نیازنداشتن به نگهداری پرندهٔ نر در واحدهای پرورش طیور بوده است. افزون بر این، استفاده از اسپرماتوزوای منجمد باعث کاهش انتقال بیماری‌ها در گله نیز خواهد شد و برای حفظ و ایجاد بانک ژنومی گله‌های لاین، نژادهای برتر، و پرندگان در حال انقراض نیز اهمیت زیادی دارد [۵]، اما هم‌اکنون روند استفادهٔ تجاری از اسپرماتوزوای منجمد و تلقیح مصنوعی در صنعت مرغداری بسیار اندک است و یا در بسیاری از موارد انجام نمی‌شود که از دلایل شایان ذکر آن، قابلیت انجمادپذیری پایین اسپرماتوزوآ [۶] و باروری کم در گله در مقایسه با جفت‌گیری طبیعی (بالای ۹۰درصد) را می‌توان نام برد [۵ و ۷]. مطالعات متعددی به‌منظور بهبود شاخص‌های انجمادپذیری ازطریق تغییر محیط رقیق‌کننده، بهبود روش‌های انجماد، و افزودن مکمل‌ها به جیرهٔ خروس‌ها برای افزایش کیفیت اسپرماتوزوآ پیش و پس از انجماد انجام شده است.

گوانیدینواستیک‌اسید (GAA) ترکیبی است که در کبد و کلیهٔ پرندگان وجود دارد و به‌وسیله آنزیم آرژنین-گلایسین آمیدینوترانسفراز، از آرژنین و گلایسین ساخته می‌شود. گوانیدینواستیک‌اسید به‌وسیلهٔ اس-آدنوزیل-ال-متیونین و توسط آنزیم گوانیدینواستات ان-متیل ترانسفراز متیله و به کراتین تبدیل می‌شود و درنهایت با انتقال یک فسفر از آدنوزین تری‌فسفات (ATP) تبدیل به ترکیبِ با انرژی بالای فسفوکراتین می‌شود [۸]. در آزمایشی افزودن گوانیدینواستیک‌اسید به جیرهٔ جوجه‌های گوشتی در سطح ۰/۰۶ و ۰/۱۲درصد، به‌طور معنی‌داری غلظت کراتین را در گوشت سینه افزایش داد [۹]. همچنین افزودن ۰/۰۸ و ۰/۱۲درصد از این مکمل به جیرهٔ مرغ‌های مادر گوشتی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش باروری و جوجه‌درآوری شد [۱۰].

کراتین و فسفوکراتین در سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایندهٔ بیضهٔ موش یافت شده است [۱۱]. باتوجه به این‌که شکل ذخیرهٔ انرژی در اسپرماتوزوآ به‌صورت فسفوکراتین است [۸] نقش کلیدی متابولیسم انرژی و ارتباط آن با فسفوکراتین در اسپرماتوزوآ مشاهده شد [۱۲ و ۱۳]. احتمالاً تقویت سامانهٔ کراتین-کراتین فسفات در مایع منی خروس می‌تواند به تأمین ATP لازم اسپرماتوزوای خروس پس از فرایند انجماد-یخ‌گشایی کمک کند و شاخص‌های انجمادپذیری آن را بهبود بخشد. هدف از پژوهش حاضر، مطالعهٔ تأثیر افزودن گوانیدینواستیک‌اسید به‌عنوان پیش‌ساز کراتین در جیرهٔ خوراکی خروس‌ها بر انجمادپذیری اسپرماتوزوای آنها است.

مواد و روش‌ها

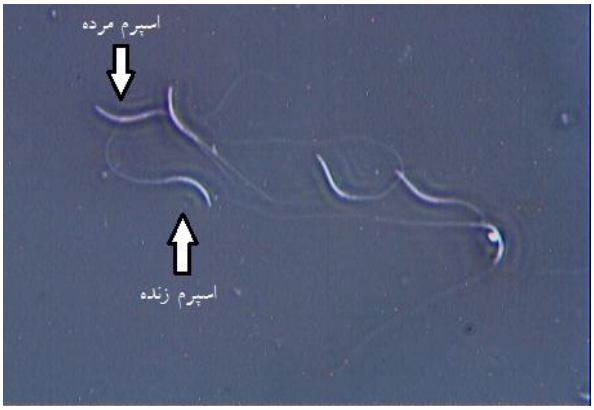
این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با تعداد ۲۰ قطعه خروس گلهٔ مادر سویهٔ تجاری راس با چهار تیمار و پنج خروس در هر تیمار و پنج تکرار به‌مدت هشت هفته انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱. جیرهٔ شاهد (فاقد افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید)، ۲. جیرهٔ حاوی ۰/۰۶درصد افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید، ۳. جیرهٔ حاوی ۰/۱۲درصد افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید، و ۴. جیرهٔ حاوی ۰/۱۸درصد افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید بودند. جیره‌ها بر پایهٔ ذرت و سویا و با انرژی ۲۷۵۴ کیلوکالری بر کیلوگرم استفاده شدند و گوانیدینواستیک‌اسید جایگزین مادهٔ خنثی (ماسه)، در جیره‌ها شد (جدول ۱). خروس‌ها پس از هفت روز دورهٔ عادت‌پذیری به اسپرم‌دهی، به‌مدت هشت هفته (از ۲۹ تا ۳۷هفتگی) با جیره‌های فوق تغذیه شدند.

جدول ۱. ترکیب جیرهٔ آزمایشی و مواد مغذی تأمین‌شده

ترکیب جیره	مقدار (درصد)
ذرت	۶۹/۰۰
کنجالهٔ سویا	۸/۵۰
سبوس گندم	۱۹/۱۹
دی‌کلسیم فسفات	۱/۴۰
نمک	۰/۳۲
صدف	۰/۸۰
دی‌ال متیونین	۰/۱۱
مکمل معدنی	۰/۲۵
مکمل ویتامینه	۰/۲۵
ماسه+GAA	۰/۱۸
مواد مغذی محاسبه‌شده	
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۷۵۴
پروتئین (درصد)	۱۲
کلسیم (درصد)	۰/۷
فسفر (درصد)	۰/۳۵
سدیم (درصد)	۰/۱۵
ال‌لایزین (درصد)	۰/۴۵
دی‌ال متیونین (درصد)	۰/۲۹
متیونین+سیستئین (درصد)	۰/۴۹

پس از گذشت سه هفته از آغاز تغذیهٔ خروس‌ها، زمانی که یک دورهٔ اسپرماتوژنز در خروس کامل شد [۱۴]، اسپرم‌گیری به‌صورت هفتگی (۵ هفته) و به روش مالش شکمی از تمام خروس‌ها صورت گرفت. از هر پنج خروس در هر تیمار به‌صورت هم‌زمان اسپرم‌گیری انجام و سریعاً به آزمایشگاه منتقل و با هم مخلوط می‌شد. منی پس از ۲۰ برابر رقیق‌شدن در محیط رقیق‌کنندهٔ بلتسویل شامل دی‌پتاسیم فسفات (۱۲/۷ گرم در لیتر)، سدیم گلوتامات (۸/۶۱ گرم در لیتر)، فروکتوز (۵ گرم در لیتر)، سدیم‌استات (۴/۳ گرم در لیتر)، تریس (۱/۹ گرم در لیتر)، پتاسیم سیترات (۰/۶۴ گرم در لیتر)، مونوپتاسیم فسفات (۰/۶ گرم در لیتر)، کلراید منیزیم (۰/۳۴ گرم در لیتر)، و ۵درصد گلیسرول برای تعادل دمایی به‌مدت دو ساعت در داخل یخچال با دمای پنج درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد[۱۵]. سپس نمونه‌های حاوی منی به داخل نی‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و هفت دقیقه در معرض بخار ازت قرار گرفتند، سپس به تانک حاوی ازت مایع (۱۹۶- سانتی‌گراد) منتقل و به‌مدت حداقل ۴۸ ساعت نگهداری شدند. برای یخ‌گشایی مایع منی، نی‌ها از ازت مایع خارج و به‌مدت سه دقیقه در آب چهار درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند، سپس محتوای آنها به داخل میکروتیوپ‌ها تخلیه شدند. پس از یخ‌گشایی، فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشا، زنده‌مانی، و ریخت‌شناسی اسپرماتوزوآ ارزیابی شد.

جنبایی کل و جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرماتوزوآ با سیستم آنالیز کامپیوتری اسپرم (CASA; CEROS version 12.3; Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) بررسی و تحلیل شد و به‌صورت درصدی از کل اسپرم‌ها بیان شد. بدین منظور، غلظت ۲۰ میلیون اسپرماتوزوآ در میلی‌لیتر استفاده شد. یکپارچگی غشا ازطریق آزمون تورم هیپواسموتیک (هاست؛ Hypo-osmotic swelling test) ارزیابی شد و به‌صورت درصد از کل اسپرم‌ها بیان شد [۱۶]. محلول هاست شامل فروکتوز (۹ گرم در لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم در لیتر) با اسمولالیتهٔ ۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم استفاده شد [۱۷]. ریخت‌شناسی اسپرماتوزوآ با استفاده از محلول هانکوک (شامل ۶۲/۵ میلی‌لیتر فرمالین، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول سالین سدیم، ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر، و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیرشده) ارزیابی شد و به‌صورت درصد اسپرماتوزوای بهنجار از کل اسپرم‌ها بیان شد [۱۸]. زنده‌مانی اسپرماتوزوآ پس از یخ‌گشایی با استفاده از رنگ ائوزین-نگروزین (شامل رنگ ائوزین (۱۶/۷ گرم در لیتر)، رنگ نگروزین (۱۰۰ گرم در لیتر)، و سدیم سیترات (۲۹ گرم در لیتر)) ارزیابی شد و به‌صورت درصد اسپرماتوزوای زنده از کل اسپرم‌ها بیان شد [۱۹]. اساس این رنگ‌آمیزی به این صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرماتوزوای مرده نفوذ می‌کند، در حالی‌که اسپرماتوزوای زنده رنگ نمی‌گیرد (شکل ۱).



شکل ۱. آزمون زنده‌مانی؛ رنگ ائوزین به درون اسپرماتوزوای مرده نفوذ می‌کند و از اسپرماتوزوای زنده که رنگ نمی‌گیرد، متمایز می‌شود

داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS (نسخهٔ ۹/۱)، رویهٔ مدل خطی عمومی براساس مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

$$Y_{ij}=\mu+L_i+e_{ij} \quad (۱)$$

در این رابطه: Y_{ij} فراسنجه‌های ارزیابی‌شدهٔ اسپرماتوزوآ، μ میانگین جامعه، L_i اثر تیمار، و e_{ij} اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های جنبایی (جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده) در جدول ۲ ارائه شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که درصد میانگین جنبایی کل اسپرماتوزوای خروس‌هایی که جیرهٔ حاوی ۰/۱۲ و ۰/۱۸درصد از افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید دریافت کردند، از سطح ۰/۰۶درصد و تیمار شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). همچنین درصد میانگین جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرماتوزوآ در سطح ۰/۱۲ و ۰/۱۸درصد به نسبت سطح ۰/۰۶درصد و تیمار شاهد بیشتر بود و تیمار شاهد و سطح ۰/۰۶درصد نیز با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). بر این اساس، مقدار بهینهٔ مصرف افزودنی گوانیدینواستیک‌اسید به‌منظور افزایش شاخص‌های جنبایی پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی، سطح ۰/۱۲درصد است.

حفظ جنبایی اسپرماتوزوآ و فعالیت زیاد این سلول باعث شده است که در مقایسه با سایر سلول‌های بدن به ATP فوق‌العادهٔ بیشتری نیاز داشته باشد. آدنوزین تری‌فسفات (ATP) ترکیبی اساسی در سلول اسپرماتوزوآ به‌شمار می‌آید که منبع انرژی سلول است و برای فسفوریلاسیون پروتئین‌ها به‌عنوان کوفاکتور تنظیم‌کنندهٔ عملکرد پروتئین‌ها محسوب می‌شود [۱۲]. در اثر انجماد اسپرماتوزوآ، فاکتورهای غشایی از قبیل سیالیّت، نفوذپذیری، و ترکیبات لیپیدی تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که پس از یخ‌گشایی میزان سیالیّت غشا و مقدار ترکیبات لیپیدی اسپرماتوزوآ کاهش می‌یابد و این خود سبب کاهش قدرت جنبایی، باروری، و زنده‌مانی اسپرماتوزوآ می‌شود [۷ و ۲۰]. محتوای ATP اسپرماتوزوآ در اثر انجماد تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد [۲۱]. گوانیدینواستیک‌اسید توسط آنزیم گوانیدینواستات ان‌ـمتیل ترانسفراز به کراتین تبدیل می‌شود و بیان ژن این آنزیم در سلول‌های سرتولی موش شناسایی شده است [۸].

ممکن است علت افزایش فراسنجه‌های جنبایی، احتمالاً افزایش ذخیرهٔ فسفوکراتین در پی افزایش کراتین در سلول اسپرماتوزوآ و یا مایع منی باشد که می‌تواند سبب افزایش انرژی قابل دسترس پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی اسپرماتوزوآ شود. البته این مطلب نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

جدول ۲. اثر تیمارهای آزمایشی گوانیدینواستیک‌اسید (GAA) بر جنبایی کل و جنبایی پیش‌روندهٔ اسپرماتوزوآ

فراسنجه	شاهد	سطح ۰/۰۶	سطح ۰/۱۲	سطح ۰/۱۸	SEM	P-value
جنبایی کل (درصد)	۳۴/۰۰[a]	۳۸/۰۰[a]	۴۷/۰۰[b]	۵۰/۰۰[b]	۲۰/۶۲	۰/۰۰۰۱
جنبایی پیش‌رونده (درصد)	۲۴/۰۰[a]	۳۱/۰۰[b]	۴۰/۰۰[c]	۴۲/۰۰[c]	۲۰/۰۰	۰/۰۰۰۱

a-b: تفاوت ارقام با حروف نامشابه در هر ردیف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های یکپارچگی غشا، ریخت‌شناسی، و زنده‌مانی اسپرماتوزوآ پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی معنی‌دار نبود (جدول ۳). در اثر انجماد مقدار ترکیبات لیپیدی و در پی آن یکپارچگی غشا کاهش می‌یابد [۷]. همچنین کاهش در فسفولیپیدهای غشای اسپرماتوزوآ به‌دلیل متابولیسم درونی اسیدهای چرب نیست و این تصور که فسفولیپیدهای غشا در جهت تأمین انرژی اسپرماتوزوآ کاهش می‌یابد، رد می‌شود [۳]. به بیان دیگر، احتمالاً دلایل دیگری برای تأثیرات انجماد بر اسپرماتوزوآ وجود دارد [۳]. استفاده از گلیسرول به‌عنوان محافظت‌کنندهٔ انجمادی در رقیق‌کنندهٔ اسپرماتوزوای طیور، تأثیر منفی بر اسکلت سلولی، غشای دولایهٔ لیپیدی، پروتئین‌های غشایی، و ساختار گلی‌کوکالیس سطح غشا دارد [۶]. از این رو معنی‌داری‌نبودن اثر تیمارهای استفاده‌شده بر یکپارچگی غشا در این پژوهش ممکن است به‌دلیل انجماد و استفاده از گلیسرول در مایع رقیق‌کننده باشد.

زنده‌مانی اسپرماتوزوآ در شرایط انجماد، بین گونه‌های مختلف پرندگان متفاوت است که این تفاوت به میزان سیالیّت غشا آنها باز می‌گردد. همچنین این تفاوت گونه‌ای در سیالیّت غشا ناشی از تفاوت بین‌گونه‌ای در محتوی کلسترول و پروتئین‌های غشایی است [۷]. به‌دلیل اینکه مسیر بیوشیمیایی تأمین کراتین‌فسفوکراتین از گوانیدینواستیک‌اسید در افزایش ذخیرهٔ انرژی اسپرماتوزوآ، تأثیرگذار است بنابراین ممکن است در محتوی کلسترول و پروتئین‌های غشایی اثر شایان توجه‌ای نداشته باشد. از این رو، تأثیرنداشتن تغذیهٔ این افزودنی بر زنده‌مانی پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌تواند توجیه‌پذیر باشد. براساس نتایج تحقیق حاضر، این‌گونه به‌نظر می‌رسد که افزودن گوانیدینواستیک‌اسید در سطح بهینهٔ ۰/۱۲درصد در جیرهٔ خروس‌ها سبب بهبود فراسنجه‌های جنبایی اسپرماتوزوآ پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی می‌شود.

جدول ۳. اثر تیمارهای آزمایشی گوانیدینواستیک‌اسید (GAA) بر یکپارچگی غشا، ریخت‌شناسی، و زنده‌مانی اسپرماتوزوآ

فراسنجه	شاهد	سطح ۰/۰۶	سطح ۰/۱۲	سطح ۰/۱۸	SEM	P-value
یکپارچگی غشا (درصد)	۲۵/۹۷	۲۶/۷۰	۲۵/۵۹	۲۴/۴۴	۱۳/۷۶	۰/۸۰۹۴
اسپرماتوزوای بهنجار (درصد)	۸۲/۹۶	۸۳/۱۷	۸۵/۴۷	۸۳/۹۱	۱۷/۲۵	۰/۷۷۲۲
اسپرماتوزوای زنده (درصد)	۵۱/۳۷	۴۹/۴۵	۵۲/۸۷	۵۴/۲۳	۴۱/۲۶	۰/۶۸۰۵

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها

منابع

1. Reddy RP (1995) Artificial insemination of broilers: economic and management implications. International Information System for the Agricultural Science and Technology. Pp. 1-30.
2. Leeson S and Summers JD (2010) Broiler breeder production. Nottingham University Press. Pp. 21-47.
3. Douard V, Hermier D, Magistrini M, Labbé C and Blesbois E (2004) Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. Theriogenology. 61(1): 1-13.
4. Tselutin K, Seigneurin F and Blesbois E (1999) Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Science. 78(4): 586-590.

5. Donoghue A and Wishart G (2000) Storage of poultry semen. Animal Reproduction Science. 62(1): 213-232.

6. Hammerstedt RH and Graham JK (1992) Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology. 29(1): 26-38.

7. Blesbois E, Grasseau I and Seigneurin F (2005) Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction. 129(3): 371-378.

8. Schmidt A, Marescau B, Boehm EA, Renema WKJ, Peco R, Das A, Robert Steinfeld R, Chan S, Wallis J, Davidoff M, Ullrich K, Waldschütz1 R, Heerschap A, De Deyn PP, Stefan Neubauer S and Isbrandt D (2004) Severely altered guanidino compound levels, disturbed body weight homeostasis and impaired fertility in a mouse model of guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) deficiency. Human Molecular Genetics. 13(9): 905-921.

9. Michiels J, Maertens L, Buyse J, Lemme A, Rademacher M, Dierick N and De Smet S (2012) Supplementation of guanidinoacetic acid to broiler diets: effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism. Poultry Science. 91(2): 402-412.

10. Carpena M, Rademacher M, Araujo l and Girish C (2015) Effect of guanidinoacetic acid supplementation on performance of broiler breeders and their progenies. 26th annual australian poultry science symposium. Pp. 72-75.

11. Moore N (2000) The distribution, metabolism and function of creatine in the male mammalian reproductive tract: A review. International Journal of Andrology. 23(1): 4-12.

12. Miki K (2006) Energy metabolism and sperm function. Society of Reproduction and Fertility Supplement. 65: 309-325.

13. Wyss M and Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. Physiological Reviews. 80(3): 1107-1213.

14. Robinson FE, Fasenko GM and Renema RA (2003) Optimizing Chick Production in Broiler Breeders. Spotted Cow Press. Pp. 65-83.

15. Sexton T (1977) A new poultry semen extender 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry Science. 56(5): 1443-1446.

16. Saemi F, Zamiri M, Akhlaghi A, Niakousari M, Dadpasand M and Ommati M (2012) Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. Poultry Science. 91(9): 2310–2315.

17. Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Yekta AA, Esmaeili V, Sharbatoghli M, Janzamin E, Hajnasrollahi M and Mostafayi F (2014) Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. Theriogenology. 83(1): 78–85.

18. Tarif AMM, Bhuiyan MMU, Ferdousy RN, Juyena NS and Mollah MBR (2013) Evaluation of semen quality among four chicken lines. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science. 6: 7-13.

19. Graham J, Kunze E and Hammerstedt R (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. Biology of Reproduction. 43(1): 55-64.

20. Blanco JM, Gee G, Wildt DE and Donoghue

AM (2000) Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. Biology of Reproduction. 63(4): 1164-1171.

21. Long J (2006) Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? Poultry Science. 85(2): 232-236.

22. Wallimann T, Tokarska-Schlattner M and Schlattner U (2011) The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. Amino Acids. 40(5): 1271-1296.