تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۸۶۵-۸۵۳

مطالعه تأثیر استفاده از اسانس رزماری در جیره، بر کیفیت منی خروس‌های مادر گوشتی

بهروز شکرانی[۱]، مرتضی مهری[۲*]، امیر فتاح[۳]، محسن شرفی[۴]، فاطمه شیرمحمد[۵]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران – ایران

۲، ۳، ۵. استادیار، گروه علوم دامی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران – ایران

۴. استادیار، گروه علوم طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۴/۰۹/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۲۹

چکیده

جهت بررسی تأثیر استفاده از اسانس رزماری در جیره، بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم، آزمایشی با استفاده از ۱۶ قطعه خروس راس ۳۰۸ مادر گوشتی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار، در سن ۲۴هفتگی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل جیره‌هایی با سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری در هر کیلوگرم خوراک بود. اسپرم‌گیری در روزهای صفر، ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ آزمایش انجام گرفت. نتایج نشان داد صفات دامنه جابجایی سر اسپرم، سرعت اسپرم در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر مستقیم در روزهای ۴۲ و ۵۶ نمونه‌گیری و صفات درصد خطی بودن جنبایی اسپرم، فعالیت غشاء، درصد کل اسپرم متحرک و زنده‌مانی در روز ۵۶ نمونه‌گیری در تیمار سه (۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری) به‌طور معنی‌داری افزایش و تعداد اسپرم‌های مرده کاهش یافت (P<۰/۰۵). در روزهای مختلف نمونه‌گیری بین تیمارها تفاوت معنی‌داری از نظر غلظت اسپرم، سطح مالون‌دی‌آلدهید، آپوپتوزیس، تغییرات مورفولوژیک، راستی مسیر طی شده، سرعت در مسیر منحنی و درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده مشاهده نشد. براساس نتایج حاصل، استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری در جیره، در مقایسه با سایر تیمارها سبب بهبود برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم شده است.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوزیس، اسپرم، جنبایی اسپرم، مالون‌دی‌آلدهید، مورفولوژی

* نویسنده مسئول Email: mortezamehri@gmail.com

مقدمه

مدیریت خروس و حفظ باروری در دوران تولید از مهمترین مسائل مورد توجه مدیران واحدهای مرغ مادر است. از طرف دیگر، نیل به این هدف، نیازمند یک برنامه مدیریتی منظم و هماهنگ برای رسیدن به حداکثر پتانسیل تولید می‌باشد. باروری به ۲ عامل عمده یعنی فعالیت جفت‌گیری و کیفیت اسپرم بستگی دارد [۱۲]. یکی از عوامل مؤثر در ایجاد ناباروری در پستانداران، گونه‌های اکسیژن فعال است [۱۲]. غشای اسپرم پرندگان نسبت به پستانداران، دارای مقادیر بیشتری از اسیدهای چرب سیرنشده با چند پیوند دوگانه می‌باشد که بیشتر فسفولیپیدهای آن‌را اسیدهای چرب سیرنشده‌ای همچون اسید آراشیدونیک و اسید دوکوزاتترااونیک تشکیل می‌دهند[۸]. بنابراین، اسپرم پرندگان نسبت به پراکسیداسیون (در آزمایشگاه و در طی فرآیند ذخیره‌سازی) که از نشانه‌های تنش اکسیداتیو در سلول‌ها است، حساس‌تر می‌باشد. پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سبب تخریب غشاء، کاهش تحرک، مهار فعالیت‌های آنزیمی و ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم شده و درنهایت سبب کاهش توان باروری می‌شود [۲۳]. این امر به آن دلیل است که اسپرم در طی اسپرماتوژنز، مقداری از سیتوپلاسم خود را به همراه مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در آن از دست داده و در برابر تنش اکسیداتیو حساس می‌شوند[۱۰].

برای مهار این تنش، سازوکارهای متفاوتی وجود دارد که یکی از آنها استفاده از آنتی‌اکسیدان در محیط است که به عنوان پاکسازی‌کننده رادیکال‌های آزاد، اسپرم را در برابر گونه‌های اکسیژن فعال حفاظت می‌کند [۴]. از جمله ترکیباتی که به این منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند، می‌توان به ویتامین‌های C، E و ال-کارنیتین اشاره کرد [۴]. این مواد از طریق آنزیم سوپراکسید دیسموتاز لیپیدهای غشای اسپرم را محافظت می‌کنند و بدین‌ترتیب، اکسیداسیون لیپیدها را کاهش می‌دهند. برخی از گیاهان دارویی نظیر رزماری (*Rosmarinus officinalis*) نیز نقش آنتی‌اکسیدانی دارند [۲]. رزماری از سالیان دور به عنوان چاشنی غذا و برای محافظت از خوراک‌ها به‌کار می‌رود [۲]. ماده مؤثره رزماری در برگ‌ها و گل آن حضور دارد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن شامل اسید رزمارینیک و اسید کارنوسیک می‌باشد. ۹۰ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی رزماری مربوط به اسید کارنوسیک می‌باشد [۲]. به نظر می‌رسد به دلیل وجود ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اسانس رزماری، این ماده بتواند به عنوان عامل مهمی در جهت تقویت و تحریک سیستم تولیدمثلی خروس عمل کند.

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس رزماری افزوده شده به جیره بر کیفیت اسپرم خروس گله مادر گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱۶ قطعه خروس از گله مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸، در سن ۲۴ هفتگی به مدت ۸ هفته، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار استفاده شدند. مدت روشنایی در دوره پرورش ۸ ساعت بود که در ابتدای آزمایش به ۱۱ ساعت و سپس با افزایش هفتگی نیم تا ۱ ساعته به ۱۵ ساعت رسید و بعد از آن ثابت ماند. جیره پایه مطابق با احتیاجات سویه راس ۳۰۸، حاوی ۲۶۰۰ کیلوکالری انرژی و ۱۲ درصد پروتئین بود (جدول ۱). سطوح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری (باریج اسانس کاشان) به هر کیلوگرم جیره اضافه شد.

۲۵ روز پیش از اعمال جیره‌ها، به منظور عادت‌پذیری برای اسپرم‌گیری، روزانه یک نوبت شکم خروس‌ها مالش داده شد. در روزهای صفر، ۱۴، ۲۸، ۴۲ و ۵۶ دوره آزمایش، از خروس‌ها اسپرم‌گیری شد. انزال بلافاصله در میکروتیوب جمع‌آوری و سپس به لوله فالکون منتقل و در صورت نرمال بودن، از نظر غلظت و تحرک، وارد آزمایش گردید.

جدول ۱ . مواد خوراکی و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (۲۴ هفتگی تا پایان دوره آزمایش)

مواد خوراکی (٪)	مقدار	ترکیبات شیمیایی محاسبه شده	مقدار
ذرت	۲۹/۸	انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۶۰۰
گندم	۲۰/۴	پروتئین خام (٪)	۱۲
جو	۲۰	لایزین (٪)	۰/۵۱
سبوس گندم	۱۹/۳	متیونین (٪)	۰/۳۵
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین)	۵/۳	متیونین + سیستین (٪)	۰/۵۱
روغن سویا	۰/۶	ترئونین (٪)	۰/۴
سنگ آهک	۲/۵	کلسیم (٪)	۰/۷
مونوکلسیم فسفات	۰/۹	فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۳۵
مکمل معدنی و ویتامینی[1]	۰/۵		
نمک	۰/۲۵		
جوش شیرین	۰/۱۵		
ویتامین‌های D_3، E، A	۰/۳		

۱ – مکمل معدنی حاوی ۱۰۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۶۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۶۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ید، ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم و مکمل ویتامینه دارای ۱۲ میلیون واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳ میلیون واحد بین‌المللی ویتامین D_3، صدهزار واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳۰۰۰ میلی‌گرم تیامین، ۱۲۰۰۰ میلی‌گرم B_2، ۱۵۰۰۰ میلی‌گرم B_3، ۵۵۰۰۰ میلی‌گرم B_5، ۴۰۰۰ میلی‌گرم B_6، ۴۰ میلی‌گرم B_{12}، ۵۰۰۰ میلی‌گرم K_3، ۲۵۰ میلی‌گرم بیوتین و یک کیلوگرم کولین کلراید

مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپرم با ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر رقیق شد. سپس، با استفاده از یک سمپلر مقدار ۹ میکرولیتر از مخلوط منی و آب مقطر را به آرامی در زیر فضای بین لامل و لام نئوبار قرار داده و با شمارش اسپرم‌های موجود حداقل در ۴ مربع اصلی لام هموسایتومتر، غلظت اسپرم محاسبه شد [۷].

تجزیه و تحلیل ویژگی‌های حرکتی اسپرم با استفاده از نرم‌افزار کاسا (نسخه ۵/۲، میکرو اپتیک، بارسلونا، اسپانیا) انجام گرفت. فراسنجه‌های مربوطه شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، درصد خطی بودن جنبایی اسپرم، راستی مسیر طی شده، سرعت در مسیر منحنی، دامنه جابه‌جایی سر اسپرم، میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر، سرعت در مسیر مستقیم بود. بدین‌منظور، با استفاده از سمپلر ۸ تا ۱۰ میکرولیتر از اسپرم روی لام ریخته و یک لامل تمیز روی آن گذاشته و سپس با استفاده از دستگاه کاسا بررسی شد. پس از بررسی نمونه منی، داده‌های مربوطه توسط این برنامه ثبت شد.

به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم و تعیین درصد اسپرم‌های طبیعی و غیرطبیعی از محلول هانکوک استفاده شد [۱۶]. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی حداقل ۳ قطره از هر نمونه به میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر محلول هانکوک افزوده و سپس ۱ قطره از این محلول روی لام قرار گرفت. با شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر، اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی محاسبه شد. میانگین سه مشاهده به‌عنوان یک داده واحد درنظر گرفته شد.

درصد فعالیت غشاء نیز براساس تست هاست انجام شد. شیوه کار بر این اصل استوار است که اسمولاریتی محیط هاست ۱۰۰ و اسمولاریته موردنیاز برای اسپرم ۴۲۵ میلی‌اسمولار می‌باشد. بنابراین، اسپرم زنده با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به سرعت واکنش داده و انتهای دم آن گره می‌خورد و اسپرم‌های مرده هیچ واکنشی نشان نمی‌دهند. بدین‌منظور، ۱۰ میکرولیتر از منی به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک هاست که حاوی فروکتوز و سیترات سدیم بود، افزوده و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۱۰ میکرولیتر از نمونه انکوبه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای $۳۷^{\circ C}$ و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ۴۰۰ اسپرم شمارش شده و نسبت اسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) به گره نخورده (مرده) محاسبه شد [۱۴].

آزمایش میزان پیشرفت آپوپتوزیس به روش ارزیابی جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین انجام و اسپرم‌ها براساس میزان حرکت فسفاتیدیل سرین به سمت غشای پلاسمایی به سه گروه زنده، آپوپتوز شده و مرده تقسیم شدند. بدین‌منظور، نمونه اسپرم به وسیله بافر کلسیم شستشو و ۱۰ میکرولیتر آنکسین-V به نمونه‌های منی افزوده شد. نمونه‌ها در جای تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر یدید پروپیدیوم (به نمونه اضافه شد و میزان فعالیت آپوپتوز نمونه‌ها به‌وسیله فلوسایتومتری ارزیابی شد. در نموداری که دستگاه فلوسایتومتری ارائه می‌دهد، اگر آنکسین و یدید پروپیدیوم هر دو منفی باشد، اسپرم زنده و اگر هر دو مثبت باشند، آپوپتوز در مراحل پایانی است (آپوپتوز ثانویه). اگر آنکسین مثبت و یدید پروپیدیوم منفی باشد، نمونه زنده، ولی دچار آپوپتوز اولیه شده است و منفی بودن آنکسین و مثبت بودن یدید پروپیدیوم نشانه مرده بودن اسپرم است [۲۹].

میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخصی از میزان اکسیداسیون لیپید غشایی توسط آزمون "مواد واکنش‌دهنده با اسید تیوباربیتوریک" مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بدین‌ترتیب که ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه اسپرم درون لوله فالکون ریخته شد، سپس به ترتیب یک میلی‌لیتر هیدروکسی تولوئن بوتیله، یک میلی‌لیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و ۲ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید به نمونه اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت بود، به اپندورف منتقل و یک میلی‌لیتر تری‌باربیتوریک اسید به آن افزوده و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. سپس، به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سرد شده و ۱ میلی‌لیتر از نمونه حاصل به درون کووت منتقل و در دستگاه اسپکتروفوتومتر مقدار جذب انجام شده توسط نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد[۱۳].

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱)، رویه MIXED برای اندازه‌گیری‌های تکرار شده براساس مدل ۱ تجزیه و میانگین‌ها به کمک آزمون توکی - کرامر مقایسه شدند [۲۱]:

رابطه (۱)

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{ij} + \beta_1(t_k) + \beta_{2i}(\tau * t)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$
$$i = 1,\dots,a;\ j = 1,\dots,b;\ k = 1,\dots,n$$

در این رابطه، y_{ijk}، ijk اُمین مشاهده، μ میانگین کل، τ_i اثر iاُمین تیمار، δ_{ij} اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ_δ^2، β_1 ضریب رگرسیون مشاهدات از دوره‌های اندازه‌گیری، β_{2i} ضریب رگرسیون مشاهدات از اثر متقابل تیمار × دوره‌های اندازه‌گیری $(\tau * t)_{ik}$، ε_{ijk} اشتباه تصادفی با میانگین صفر و واریانس σ^2، واریانس بین

اندازه‌گیری‌ها درون خروس‌ها می‌باشد. همچنین، a تعداد تیمارها، b تعداد خروس مورد آزمایش و n تعداد دوره‌های اندازه‌گیری می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به فراسنجه‌های مورد بررسی در جدول ۲ آمده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت اسپرم در روزهای مختلف نمونه‌گیری معنی‌دار نبود. بیشتر گیاهانی که سرشار از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند، تعداد اسپرم را افزایش می‌دهند [۱۹] و در تحقیقی با استفاده از پودر برگ کنجد به عنوان ترکیب حاوی آنتی‌اکسیدان [۲۵] که افزایش تعداد اسپرم به احتمال زیاد می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی مربوط باشد، زیرا آنتی‌اکسیدان به‌طور مستقیم و غیرمستقیم با تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه، تعداد اسپرم و میزان باروری را افزایش می‌دهد. مطالعات مذکور اگرچه نتایج این تحقیق را کاملاً تأیید نمی‌کند، ولی می‌تواند تا اندازه‌ای بیانگر نحوه عمل رزماری به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، مشابه ترکیبات دانه کنجد باشد.

یکی از فرآیندهای مورد انتظار در این آزمایش تأثیر اسانس رزماری بر غلظت اسپرم خروس بود که محقق نگردید، زیرا به نظر می‌رسد رزماری با استفاده از کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید غشایی در بافت سمینفروس بیضه بتواند حمایت بیشتری از ساخت اسپرم در بیضه داشته باشد [۳۰]. افزایش غلظت اسپرم در بلدرچین‌های تغذیه شده با ال-کارنیتین (به عنوان آنتی‌اکسیدان) می‌تواند به دلیل محافظت بهتر ساختار غشای اسپرم، سبب افزایش طول عمر اسپرم شود [۳۰]. به نظر می‌رسد که نحوه استفاده از اسانس رزماری تأثیر مستقیمی بر این فرآیند داشته باشد و باتوجه به اینکه اسانس مورد استفاده در این مطالعه خوراکی بود. از طرف دیگر، حجم آن در مقابل مقدار خوراک مصرفی پرنده، ناچیز است و احتمال غیرفعال شدن آن در تماس با دیگر ترکیبات شیمیایی خوراک وجود دارد، احتمالاً اگر اسانس در آب حل شده و به مصرف خروس‌ها رسیده بود، اثرات مشهودتری مشاهده می‌شد.

دامنه جابه‌جایی سر اسپرم در روزهای ۴۲ و ۵۶ آزمایش در تیمار سوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲). به‌طورکلی، تیمار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری در مقایسه با دیگر تیمارها و به‌خصوص تیمار شاهد باعث افزایش دامنه جابه‌جایی سر اسپرم پس از یک دوره اسپرماتوژنز شده است. در مورد استفاده از برخی مواد آنتی‌اکسیدان طبیعی دیگر از جمله ملاتونین نیز برخی پژوهشگران افزایش جنبایی اسپرم را گزارش نموده و دلیل آنرا به اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در جلوگیری از پراکسید شدن لیپیدهای غشای اسپرم نسبت داده‌اند [۶]. از طرف دیگر، برخی پژوهش‌ها حاکی از کاهش جنبایی اسپرم در حضور ملاتونین بوده است، دلیل این امر نیز کاهش ورود کلسیم به سلول اسپرم، به‌دلیل مهار تشکیل cAMP توسط ملاتونین گزارش شده است [۵]. بنابراین، در این گونه پژوهش‌ها تعیین غلظت دقیق آنتی‌اکسیدان مورد استفاده از اهمیت بالایی برخوردار است و غلظت‌های بالا یا پایین ممکن است اثرات متفاوت و متناقضی به همراه داشته باشد [۵].

سطوح مختلف اسانس رزماری تأثیری بر سطح مالون دی‌آلدهید در روزهای مختلف نداشت. به دلیل وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب سیرنشده در غشای اسپرم، به نظر می‌رسد وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان برای خنثی‌سازی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجود در رقیق‌کننده‌ها ضروری باشد [۶].

جدول ۲. اثر سطوح مختلف اسانس رزماری تغذیه شده در روزهای متفاوت در جیره‌های خروس بر میانگین فراسنجه‌های کیفی اسپرم

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
غلظت اسپرم (میلیارد در میلی‌لیتر)	سطح ۱	۴/۴۶	۴/۱۰	۴/۵۳	۴/۴۷	۴/۳۵
	سطح ۲	۴/۸۲	۴/۸۰	۴/۷۵	۴/۵۰	۴/۷۲
	سطح ۳	۴/۶۷	۴/۷۰	۴/۶۷	۴/۷۲	۴/۷۰
	سطح ۴	۴/۸۶	۴/۸۰	۴/۸۷	۴/۷۷	۴/۸۶
	SEM	۰/۱۲۲	۰/۱۳۹	۰/۱۲۴	۰/۱۲۱	۰/۱۵۱
دامنه جابه‌جایی سر اسپرم (میکرون)	سطح ۱	۲۷/۳۴	۲۸/۵۰	۲۷/۰۱	۲۵/۷۵[b]	۲۸/۲۵[b]
	سطح ۲	۲۸/۵۰	۲۹/۷۵	۲۷/۰۰	۲۶/۵۰[b]	۲۶/۷۵[b]
	سطح ۳	۲۷/۳۰	۲۸/۰۰	۲۹/۲۵	۳۸/۲۵[a]	۳۹/۵۰[a]
	سطح ۴	۲۷/۹۶	۲۷/۳۳	۲۹/۴۶	۲۷/۹۶[b]	۲۷/۳۳[b]
	SEM	۰/۳۱۵	۰/۳۵۹	۰/۵۷۸	۱/۴۲۹	۱/۳۸۷
میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (میکرون در ثانیه)	سطح ۱	۱۲/۹۱	۱۳/۴۵	۱۳/۶۰	۱۴/۱۰[bc]	۱۳/۶۲[b]
	سطح ۲	۱۲/۳۰	۱۳/۲۵	۱۳/۲۲	۱۳/۴۷[c]	۱۴/۴۷[ab]
	سطح ۳	۱۲/۱۳	۱۲/۶۷	۱۳/۳۵	۱۹/۰۷[a]	۱۹/۴۷[a]
	سطح ۴	۱۲/۹۳	۱۳/۶۶	۱۳/۶۷	۱۸/۴۲[ab]	۱۱/۰۳[b]
	SEM	۰/۲۸۳	۰/۲۷۲	۰/۱۹۲	۰/۷۸۴	۰/۹۰۶

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
سرعت در مسیر مستقیم (میکرون در ثانیه)	سطح ۱	۷/۵۸	۷/۴۷	۶/۹۴	۷/۶۷[b]	۶/۸۵[b]
	سطح ۲	۷/۷۹	۷/۶۲	۸/۲۲	۷/۷۵[b]	۸/۰۵[b]
	سطح ۳	۷/۲۲	۷/۶۵	۷/۶۲	۱۱/۲۵[a]	۱۱/۸۴[a]
	سطح ۴	۶/۶۶	۷/۲۶	۶/۹۱	۶/۷۲[b]	۷/۸۶[b]
	SEM	۰/۲۴۵	۰/۲۰۴	۰/۲۰۴	۰/۵۲۸	۰/۵۰۸
راستی مسیر طی شده (٪)	سطح ۱	۵۸/۷۲	۵۵/۶۵	۵۰/۶۵	۵۵/۴۱	۵۰/۲۰
	سطح ۲	۶۳/۴۳	۵۷/۶۱	۶۲/۴۳	۵۷/۹۰	۵۷/۳۱
	سطح ۳	۶۱/۳۳	۶۲/۰۵	۵۷/۵۶	۵۸/۹۵	۶۰/۹۰
	سطح ۴	۵۱/۶۷	۵۳/۵۰	۵۱/۶۴	۳۵/۴۸	۷۴/۷۳
	SEM	۲/۸۰۴	۲/۴۷۵	۲/۰۷۷	۲/۹۵۳	۳/۲۷۸
سرعت در مسیر منحنی (میکرون در ثانیه)	سطح ۱	۲۷/۹۳	۲۸/۱۰	۲۸/۷۲	۲۷/۹۲	۲۹/۵۲
	سطح ۲	۲۸/۴۷	۲۹/۲۵	۲۶/۸۵	۲۶/۹۲	۲۷/۲۵
	سطح ۳	۲۸/۶۲	۲۸/۸۲	۲۵/۴۰	۲۸/۲۲	۲۷/۸۷
	سطح ۴	۲۷/۴۳	۲۶/۸۳	۲۴/۹۰	۲۷/۷۴	۲۶/۸۰
	SEM	۰/۴۷۵	۰/۴۳۷	۰/۹۹۰	۰/۴۴۴	۰/۶۴۱

ادامه جدول ۲. اثر سطوح مختلف اسانس رزماری تغذیه شده در روزهای متفاوت در جیره‌های خروس بر میانگین فراسنجه‌های کیفی اسپرم

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
درصد خطی بودن جنبایی اسپرم (٪)	سطح ۱	۲۶/۸۷	۲۶/۶۹	۲۳/۹۴	۲۷/۶۵	۲۳/۵۷[b]
	سطح ۲	۲۷/۴۵	۲۶/۰۸	۳۰/۶۰	۲۸/۸۲	۲۹/۵۷[b]
	سطح ۳	۲۵/۲۶	۲۶/۶۷	۳۲/۱۷	۳۹/۹۸	۴۲/۶۱[a]
	سطح ۴	۲۴/۲۰	۲۷/۰۰	۲۷/۹۴	۲۴/۶۴	۲۹/۴۰[b]
	SEM	۰/۷۵۴	۰/۷۵۵	۱/۷۰۰	۱/۹۳۱	۱/۹۳۵
جنبایی پیش‌رونده (٪)	سطح ۱	۱۱/۳۹	۹/۲۳	۱۱/۱۱	۹/۸۰	۱۰/۳۳
	سطح ۲	۹/۷۶	۹/۹۷	۹/۰۵	۹/۰۴	۹/۶۶
	سطح ۳	۹/۰۷	۱۰/۲۲	۹/۷۵	۱۰/۷۶	۹/۳۵
	سطح ۴	۱۰/۶۳	۱۰/۶۴	۱۰/۲۶	۸/۸۱	۹/۹۶
	SEM	۰/۴۹۲	۰/۳۰۷	۰/۳۱۴	۰/۳۵۵	۰/۴۱۵
اسپرم‌های مرده (٪)	سطح ۱	۱۳/۳۳	۱۵/۷۵	۱۴/۶۱	۱۴/۰۰[a]	۱۵/۲۵[a]
	سطح ۲	۱۳/۷۵	۱۴/۰۰	۱۴/۵۰	۱۱/۰۰[a]	۱۱/۵۰[ab]
	سطح ۳	۱۴/۰۰	۱۲/۲۵	۱۳/۲۵	۶/۰۰[ab]	۲/۷۵[b]
	سطح ۴	۸/۰۰	۱۲/۰۰	۴/۲۱	۰/۰۰[b]	۱۹/۵۰[a]
	SEM	۱/۳۳۳	۱/۸۷۵	۱/۶۲۶	۱/۵۸۷	۱/۸۸۲

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
جنبایی کل (٪)	سطح ۱	۶۶/۳۳	۶۶/۵۰	۶۶/۰۵	۶۶/۳۷[b]	۶۵/۸۰[ab]
	سطح ۲	۶۸/۱۳	۶۷/۸۲	۶۸/۹۶	۶۹/۳۲[b]	۷۰/۴۰[ab]
	سطح ۳	۶۶/۸۵	۶۸/۰۷	۶۸/۹۵	۸۰/۱۷[ab]	۸۰/۰۰[a]
	سطح ۴	۷۳/۰۰	۷۴/۷۳	۷۳/۰۷	۸۷/۵۲[a]	۶۴/۵۸[b]
	SEM	۱/۵۷۵	۱/۳۸۶	۱/۳۷۰	۲/۴۵۷	۲/۰۴۷
آپوپتوزیس (٪)	سطح ۱	۸/۶۹	۸/۷۵	۹/۲۸	۹/۵۰	۹/۰۰
	سطح ۲	۸/۵۰	۸/۷۵	۸/۷۵	۱۰/۲۵	۹/۷۵
	سطح ۳	۹/۰۰	۹/۷۵	۷/۷۵	۵/۵۰	۷/۵۰
	سطح ۴	۸/۳۳	۷/۶۶	۹/۸۴	۶/۲۲	۸/۱۶
	SEM	۰/۴۳۳	۰/۵۹۷	۰/۴۳۰	۰/۷۸۹	۰/۶۲۷
زنده‌مانی (٪)	سطح ۱	۷۸/۰۱	۷۵/۵۰	۷۶/۱۸	۷۶/۵۰[b]	۷۵/۷۵[b]
	سطح ۲	۷۷/۷۵	۷۷/۲۵	۷۶/۷۵	۷۸/۷۵[b]	۷۸/۷۵[b]
	سطح ۳	۷۷/۰۰	۷۸/۰۰	۷۹/۰۰	۸۸/۵۰[ab]	۸۹/۷۵[a]
	سطح ۴	۸۳/۶۶	۸۰/۳۳	۸۵/۹۷	۹۶/۱۲[a]	۷۲/۳۳[b]
	SEM	۱/۴۳۹	۱/۹۸۷	۱/۴۵۶	۲/۱۶۹	۲/۰۰۱

ادامه جدول ۲. اثر سطوح مختلف اسانس رزماری تغذیه شده در روزهای متفاوت در جیره‌های خروس بر میانگین فراسنجه‌های کیفی اسپرم

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
مورفولوژی اسپرم (درصد اسپرم غیرنرمال)	سطح ۱	۱۰/۶۵	۱۱/۶۰	۱۱/۶۵	۱۲/۷۵	۱۲/۰۰
	سطح ۲	۱۲/۲۵	۱۳/۷۵	۱۴/۷۵	۱۴/۲۵	۱۲/۲۵
	سطح ۳	۱۲/۷۵	۱۳/۵۰	۱۳/۷۵	۱۳/۷۵	۱۴/۵۰
	سطح ۴	۱۲/۶۶	۱۲/۶۶	۱۲/۰۲	۱۱/۰۲	۱۱/۰۰
	SEM	۰/۴۷۸	۰/۳۶۸	۰/۵۲۶	۰/۴۰۸	۰/۵۱۶
میزان مالون دی‌آلدهید (نانوگرم در میکرولیتر)	سطح ۱	۰/۳۲۰	۰/۳۲۰	۰/۳۲۴	۰/۳۳۲	۰/۳۳۰
	سطح ۲	۰/۳۲۷	۰/۳۳۵	۰/۳۴۲	۰/۳۲۲	۰/۳۲۵
	سطح ۳	۰/۳۴۰	۰/۳۴۷	۰/۳۴۵	۰/۳۲۰	۰/۳۴۵
	سطح ۴	۰/۳۳۷	۰/۳۴۲	۰/۳۴۷	۰/۳۳۰	۰/۳۴۰
	SEM	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵

	اسانس	روز آزمایش				
		۰	۱۴	۲۸	۴۲	۵۶
فعالیت غشاء (٪)	سطح ۱	۷۰/۵۵	۷۰/۶۵	۷۰/۲۷	۷۰/۶۴[b]	۷۰/۰۶[ab]
	سطح ۲	۷۲/۷۴	۷۲/۴۳	۷۳/۵۷	۷۳/۹۳[b]	۷۵/۰۱[ab]
	سطح ۳	۷۰/۷۱	۷۱/۹۳	۷۲/۸۱	۸۴/۰۳[ab]	۸۳/۸۶[a]
	سطح ۴	۷۵/۸۱	۷۷/۵۴	۷۵/۸۸	۹۰/۳۳[a]	۶۷/۳۹[b]
	SEM	۱/۵۲۳	۱/۳۰۸	۱/۳۵۶	۲/۳۳۷	۲/۰۹۲

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت بین سطوح مختلف تیماری در هر صفت (در هر روز) معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

مالون دی‌آلدهید از جمله ترکیباتی است که از پراکسیداسیون چربی‌ها حاصل شده و افزایش آن در منی باعث کاهش جنبایی اسپرم و کاهش باروری می‌شود [۱۸]. در پژوهشی، خروس‌های تغذیه شده با ۵۰۰ میلی‌گرم ال‌کارنیتین در کیلوگرم جیره، از غلظت اسپرم بیشتر و اسپرم‌های آسیب دیده کمتری نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند و میزان پراکسیداسیون لیپید آنها نیز کمتر بود [۲۰].

در تحقیقی اثر افزودن گیاه رزماری به رقیق‌کننده‌ای بر پایه لاکتوز - زرده تخم‌مرغ بررسی و مشاهده شد که مصرف رزماری، میزان مالون دی‌آلدهید را کاهش می‌دهد [۱۹]. ملاتونین یکی از ترکیبات شناخته شده در مهار پراکسیداسیون لیپیدها است که عملکرد آن در سلول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، به غلظت آن وابسته است [۵]، محققین بی‌تأثیر بودن ملاتونین و به‌طورکلی مواد آنتی‌اکسیدانی را در کاهش مالون دی‌آلدهید، در این گونه پژوهش‌ها و احتمالاً تحقیق حاضر، به دلیل نامناسب بودن مقادیر مورد استفاده می‌دانند [۵]. اثرات حفاظتی سیلی‌مارین (یک عصاره گیاهی) وابسته به خواص آنتی‌اکسیدانی و حذف رادیکال‌های آزاد توسط آن است که می‌تواند به‌طور مستقیم با اجزای غشای سلولی واکنش داده و سبب جلوگیری از آسیب‌های سلولی ناشی از پراکسیداسیون چربی گردد [۲۲]. البته در پژوهش مذکور افزودن ۲۰۰ میکروگرم سیلی‌مارین به منی خروس باعث افزایش معنی‌داری در میزان تولید مالون دی‌آلدهید شد که دلیل آن القای آپوپتوز و اکسیداسیون ذکر شد. عملکرد بهینه آنتی‌اکسیدان‌ها در غلظت‌های معینی به وقوع می‌پیوندد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، عملکرد آنها معکوس شده و سبب القای اکسیداسیون می‌شود [۲۲]. شاید دلیل اصلی بی‌تأثیر بودن اسانس رزماری بر مالون دی‌آلدهید در آزمایش حاضر نیز ناشی از این امر باشد.

تفاوت میزان آپوپتوزیس بین تیمارها در روزهای مختلف معنی‌دار نبود، ولی در تعداد اسپرم مرده یک جهش ناگهانی و معنی‌دار در روز ۵۶ در سطح ۴ رزماری رخ داد (P<۰/۰۵) (جدول ۲). به هرحال، سطح ۳ رزماری پایین‌ترین میزان اسپرم مرده را در روز ۴۲ به خود اختصاص داد (P<۰/۰۵). افزایش تعداد اسپرم‌های مرده در سطح ۴ در روز ۵۶، شاید به دلیل تجمع آنتی‌اکسیدان رخ داده باشد که در این‌صورت غلظت بالاتر آنتی‌اکسیدان می‌تواند منجر به تخریب میتوکندری‌ها و شروع فرآیند آپوپتوزیس گردد [۱۵].

در مورد درصد خطی بودن جنبایی اسپرم تنها تفاوت معنی‌دار مربوط به سطح ۳ رزماری (۱۰۰ میلی‌گرم) در روز ۵۶ آزمایش بود. درصد خطی بودن جنبایی اسپرم در پایان دوره آزمایشی بهبود یافت، به‌طوری‌که در روز ۵۶ سطح سوم رزماری نسبت به دیگر سطوح به‌طور معنی‌داری سبب افزایش درصد خطی بودن جنبایی اسپرم شد (P<۰/۰۵) (جدول ۲). فعالیت غشاء که به صورت درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (زنده) نسبت به گره نخورده (مرده) تحت محیطی با فشار اسمزی پایین بیان می‌شود، در روزهای ۴۲ و ۵۶ نمونه‌گیری تحت تأثیر سطوح مختلف رزماری قرار گرفت (P<۰/۰۵). برتری معنی‌دار تیمار ۴ در روز ۴۲ و تیمار سه در روز ۵۶ مشاهده می‌شود (P<۰/۰۵) (جدول ۲). از جمله آسیب‌های پراکسیداسیون لیپید بر اسپرم را می‌توان نقص‌های مورفولوژیک، کاهش تحرک، کاهش باروری، کاهش سیالیت غشاء، کاهش عملکرد آکروزوم، تخریب کروماتین اسپرم و کاهش ترکیب اسپرم با اووسیت ذکر کرد [۲۶]. از سوی دیگر، سیالیت غشاء، پیش‌نیاز عملکرد طبیعی سلول است و سیالیت و انعطاف‌پذیری غشاهای سلولی عمدتاً به ترکیب لیپیدی آنها بستگی دارد [۸]. ترکیب لیپیدی منی ماکیان شاخص مهمی برای تعیین کیفیت و توانایی بارورسازی آن است [۸]. در اسپرم

پرندگان وجود فسفولیپیدهایی با تراکم زیاد از اسیدهای چرب پلی‌انوئیک ۲۰ و ۲۲ کربنی عامل مهمی برای توسعه پراکسیداسیون لیپید و آسیب پراکسیداتیو به غشاء می‌باشد [۸].

هیچ تفاوتی در مورفولوژی اسپرم که بیانگر میزان اسپرم‌های نرمال و غیرنرمال است، بین سطوح مختلف رزماری در روزهای مختلف نمونه‌گیری مشاهده نمی‌شود (P>۰/۰۵) (جدول ۲). ناهنجاری اولیه اسپرم یک ویژگی ذاتی و آناتومیکی مربوط به بافت بیضه است و ترکیبات مکمل و آنتی‌اکسیدان بیشتر بر کاهش ناهنجاری‌های ثانویه اسپرم اثرگذارند [۳].

سرعت در مسیر مستقیم و میانگین سرعت در مسیر مستقیم نیز در سطح سوم رزماری و در روزهای ۴۲ و ۵۶ نمونه‌گیری، به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌های آزمایشی بود (P<۰/۰۵)، ولی راستی مسیر طی شده در روزهای مختلف تحت تأثیر استفاده از اسانس رزماری قرار نگرفت. بررسی داده‌ها در مورد صفات درصد کل اسپرم‌های متحرک و زنده‌مانی نشان می‌دهد که در مورد هر دو صفت، در روز ۴۲، سطوح ۳ و ۴ رزماری و در روز ۵۶، سطح سه رزماری مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند (P<۰/۰۵) (جدول ۲). ویتامین E با جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب سیرنشده اسپرم، موجب افزایش زنده‌مانی اسپرم می‌شود [۱] همچنان که در مطالعه حاضر نیز این اثر مشاهده شد و سطح سوم اسانس رزماری به‌طور معنی‌داری میزان زنده‌مانی اسپرم را پس از طی دوره اسپرماتوژنز افزایش داد. آنتی‌اکسیدان‌ها همچون شمشیر دو لبه عمل می‌کنند و عملکرد بهینه آنها تنها در غلظت‌های خاصی رخ می‌دهد و ممکن است در غلظت‌های بالاتر، اثرات منفی روی اسپرم داشته باشند [۱۷]، ولی در مورد سرعت در مسیر منحنی و درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده نتایج نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح مختلف در روزهای مختلف نمونه‌گیری است (جدول ۲).

یکی از عوامل مهم در کاهش تحرک اسپرم، آسیب‌های ساختاری ناشی از تنش اکسیداتیو می‌باشد، زیرا کاهش فعالیت غشاء منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و کاهش توانایی تنظیم سطوح داخل سلولی یون‌ها می‌شود که مجموعه این شرایط برای تحرک اسپرم مضر است [۱۱]. مصرف رزماری، زنده‌مانی، جنبایی کل و پیش‌رونده و کیفیت اسپرم را بهبود بخشید، درحالی‌که بر فعالیت آکروزوم بی‌تأثیر بود [۱۹]. همچنین، در تحقیقی دیگر که روی ال-کارنیتین انجام گرفته بود، بهبود تحرک نمونه‌های اسپرم در حیوانات تغذیه شده با ال-کارنیتین اینگونه توضیح داده شده است که به دلیل توانایی آنتی‌اکسیدانی ال-کارنیتین، انواع ترکیب‌های اکسیژن فعال، اثرات مخرب کمتری بر غشای اسپرم و ساختار میتوکندری وارد می‌کنند [۳۳]. به علاوه، ال-کارنیتین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز می‌شود که به واسطه داشتن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، تعداد رادیکال‌های آزاد در شروع پراکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهند [۲۴]. میتوکندری دربرگیرنده مسیرهایی برای تولید انرژی است و به نظر می‌رسد که حساس‌ترین بخش ساختار اسپرم نسبت به نگهداری در دماهای پایین باشد. انواع ترکیب‌های اکسیژن فعال می‌توانند تغییراتی را در عملکرد میتوکندری ایجاد کنند که نتیجه آن در تحرک اسپرم بروز می‌نماید [۴]. استفاده از ال-کارنیتین می‌تواند سبب خنثی شدن اثر اکسیژن‌های فعال بر آنزیم‌های مؤثر در فرآیندهای فسفوریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP برای سلول اسپرم شود و از این طریق از کاهش تحرک اسپرم جلوگیری نماید [۲۸]. با این حال، استفاده از ال-کارنیتین به میزان ۲ گرم در روز، تأثیر معنی‌داری بر کیفیت اسپرم خوک (درصد تحرک و زنده‌مانی) نداشت [۹].

یکی از نتایج تخریب اکروزوم، ترشح مواد آنزیمی

است. ترشح آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز، هیالورونو گلوکوزامینداز، اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز در اثر تخریب اکروزوم گزارش شده است و مشخص شده است که ارتباط منفی بین آزاد شدن این آنزیم‌ها و تحرک اسپرم وجود دارد. در این راستا، سطح ۲ درصد اسانس رزماری در محیط انجماد اسپرم بز، فراسنجه‌های حرکتی شامل تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم را در مقایسه با گروه شاهد و سایر سطوح افزایش داده است [۳۱]. نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر نیز قابل مقایسه است، زیرا سطح ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری توانست باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس در پایان دوره اسپرماتوژنز شود.

بهبود قابل توجه فراسنجه‌های حرکتی در گروه تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری در کیلوگرم جیره نشان می‌دهد که این ترکیب قادر است به‌طور معنی‌داری کیفیت حرکتی اسپرم را بهبود بخشد ($P<۰/۰۵$). به نظر می‌رسد که ترکیبات اسانس رزماری از طریق حذف رادیکال‌های آزاد، تأثیر قابل توجهی بر توانایی حرکت اسپرم گذاشته است. رادیکال‌های آزاد سبب تشدید واکنش‌های پراکسیداسیون می‌شوند که تخریب پروتئین‌های غشاء و کروماتین اسپرم و سرانجام کاهش جنبایی و توان باروری اسپرم را در پی دارد [۳۲]. ویژگی‌های مایع منی به میزان چشم‌گیری در نژادهای مختلف خروس از ۲۵ تا ۶۰ هفتگی تغییر می‌کند. معیارهای شناخته شده‌ای نظیر غلظت و زنده‌مانی، به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، علاوه بر این فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان آنتی اکسیدان‌های مهم مثل ویتامین E و A و سلنیوم نیز کاهش چشم‌گیری را نشان می‌دهند [۲۷].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری، سبب بهبود کیفیت اسپرم، شامل فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و فعالیت غشاء می‌شود. بنابراین، می‌توان از اسانس رزماری به عنوان مکمل تغذیه‌ای برای محافظت اسپرم خروس از رادیکال‌های آزاد استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیر تولید و کارشناس فارم محترم شرکت قطره طلای نوشهر قدردانی می‌شود.

منابع

۱. احمدی ح ر (۱۳۸۴) برهمکنش ویتامین E و c بر جنبایی و باروری اسپرم رقیق شده خروس‌های بومی فارس در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شیراز.

۲. زرگری ع (۱۳۶۸) گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۷۱.

۳. ضمیری م ج (۱۳۸۸) فیزیولوژی تولیدمثل. چاپ دوم. انتشارات حق‌شناس، رشت. ۴۲۷ ص.

4. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L and Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Journal of Andrology. 8: 338-348.

5. Ashrafi I, Kohram H, Haijian H, Bahreini M and Poorhamdolallah M (2011) Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5°C. African Journal of Biotechnology. 10: 6670-6674.

6. Bansal AK and Bilaspuri GS (2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Review Article. Veterinary Medicine International. 7: 1-12.

7. Bakst MR and Cecil HC (1997) Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination. Poultry Science Association. Inc., Savoy, IL.

8. Cerolini S, Zaniboni L, Maladgian A and Gliozzi T (2006) Effect of docosahexaenoic acid and á-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. Theriogenology. 66: 877-886.

9. Ceřovský J, Frydrychová S, Lustyková A, Lipenský J and Rozkot M (2009) Semen characteristics of boars receiving control diet and control diet supplemented with L-carnitine. Czech Journal of Animal Science. 54(9): 417-425.

10. Chen H, Zhao HX, Huang XF, Chen GW, Yang ZX and Sun WJ (2012) Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? Antioxidants and redox signaling. 16(8): 754-9.

11. Christine A (2008) Recent advances in cooled-semen technology. Animal Reproduction Science. 107: 268-275.

12. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane Ketaki S, Ghaskadbi Saroj S and Lele RD (2004) Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Journal of Association of Physicians of India (JAPI). 52: 796.

13. Esterbauer H and Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods of Enzymology. 186: 407-421.

14. Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT and Oliveira RFM (2005) The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. Animal Reproduction. 2: 139-144.

15. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S and Tesarik J (2005) Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. Journal of Andrology. 26(3): 349-353.

16. Hancock JL (1951) A staining technique for the study of temperature-shock in semen. Nature. 167: 323-324.

17. Kaur R and Kaur K (2000) Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. Indian Journal of Pharmacology. 44(3): 265-272.

18. Long JA and Kramer M (2003) Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. Poultry Science. 82(11): 1802-1807.

19. Malo C, Gill L and Martin F (2010) Anti-oxidant supplementation improve boar sperm charasterictics and fertility after cryopreversation: comparison between systein and rosemary. Cryobiology. 61: 142-147.

20. Neuman SL, Lin T, Hester PY (2000) The effect of dietary carnitine on semen traits of white leghorn roosters. Poultry Science. 81: 495-50.

21. Oehlert GW (2000) Comparing models: The analysis of variance. In Freeman WH and Co, A First Course in Design and Analysis of Experiments. New York, NY. Pp. 44-52.

22. Pradhan SC and Girish C (2006) Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. Indian Journal of Medical Research. 124(5): 491-504.

23. Rosenstrauch A and Friedlander M (2007) Spermatozoa retention causes the normal reduction of fertility in aging roosters. Acta Microscopica 16(1-2) Supp 2.

24. Sarica S, Corduk M, Suicmez M, Cedden F, Yildirim M and Kilinc K (2007) The effects of dietary L-Carnitine supplementation on semen traits, reproductive parameters, and testicular histology of Japanese quail breeders. Journal of applied poultry research. 16: 178-186.

25. Shittu LAJ, Bankole MA, Oguntola JA, Ajala MO, Shittu RK, Ogundipe OA, Bankole MN, Ahmed T and Ashiru OA (2007) Sesame leaves intake improve and increase epididymal spermatocytes resreve in adult male sprague dawley rat. Scientific Research and Essays. 2(8): 319-324.

26. Sonmez M and Demirci E (2004) The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. Turkish Journal of Animial Science. 28: 893-899.

27. Speake BK, Kelso K, Cerolini S, Noble RC and Sparks NHC (1995) Changes in the polyunsaturated fatty acid composition and antioxidant capacity of spermatozoa during ageing in the avian: A relationship with reduced fertility. Proceeding of 2nd International Congress. ISSFAL, Maryland, USA, abstract n. 64.

28. Surai PE, Cerrolini S, Wishart GJ, Speake BK, Noble RC and Sparks NHC (1998) Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Poultry and Avian Biology Review. 9(1): 11-23.

29. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine exprssion onearly apoptosis cells using fluorescein labelled Annexin V. Journal of Immunology and Methods. 184: 39-51.

30. Yousef MI, Abdallah GA and Kamel KI (2003) Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Animal Reproduction Science. 76: 99-111.

31. Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Mahdi Nabi M and Mohammadi Sangcheshmeh A (2013) Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? Small Ruminant Research. 114: 120-125.

32. Zaniboni L and Cerolini S (2009) Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced *in vitro* peroxidation in control, n-3 fatty acids and alphatocopherol rich spermatozoa. Animal Reproduction Science. 112: 51-65.

33. Zhai W, Neuman SL, Latour MA and Hester PY (2007) The effect of dietary L-carnitine on semen traits of White Leghorns. Poultry Science. 86: 2228-2235.