تولیدات دامی
دوره ۲۳ ■ شماره ٤ ■ زمستان ١٤٠٠
صفحه‌های ۵۹۲-۵۸۳
DOI: 10.22059/jap.2021.325561.623624

مقاله پژوهشی

اثر عصاره گیاه مارچوبه بر کیفیت منی قوچ عربی طی ذخیره‌سازی به حالت مایع در دمای چهار درجه سانتی‌گراد

ابوذر غلام‌پور[۱]، خلیل میرزاده [۲*]، صالح طباطبایی وکیلی[۲]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

چکیده
هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر عصاره مارچوبه بر کیفیت منی قوچ عربی در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی به حالت مایع در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بود. اسپرم‌گیری از ۱۰ راس قوچ نژاد عربی با متوسط سن ۲/۵ سال به‌طور هفتگی (هر هفته یکبار) به‌مدت شش هفته انجام شد. پس از افزودن سطوح صفر، ۱/۵، سه و ٤/۵ درصد عصاره مارچوبه به رقیق‌کننده منی، فراسنجه‌های کیفی اسپرم در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت از نگهداری تیمارها به حالت مایع مورد ارزیابی قرار گرفتند. در زمان صفر، زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره مارچوبه بیش‌تر از رقیق‌کننده حاوی سطوح صفر و ٤/۵ درصد عصاره بود (P<۰/۰۵). پس از ۲٤ ساعت ذخیره‌سازی منی، فراسنجه‌های تحرک کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشای پلاسمای اسپرم و زنده‌مانی اسپرم، در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بودند (P<۰/۰۵). فراسنجه‌های کیفی اسپرم در ٤۸ ساعت پس از اسپرم‌گیری و ذخیره‌سازی در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره معنی‌دار و عملکرد بهتری داشتند (P<۰/۰۵). بالاترین میزان سلامت غشایی پلاسمایی، جنبایی پیش‌رونده و تحرک کل اسپرم در ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی اسپرم، در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره مشاهده شد (P<۰/۰۵). براساس نتایج حاصل در این مطالعه استفاده از عصاره مارچوبه در رقیق‌کننده به میزان سه درصد کیفیت اسپرم قوچ‌های عربی پس از شرایط سردسازی را بهبود می‌بخشد.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، تحرک، ذخیره‌سازی، قوچ عربی، مارچوبه.

The effect of *Asparagus officinalis* extract on Arabi ram semen quality during storage in liquid condition at 4 ˚C

Abuzar Gholampur[1], Khalil Mirzadeh[2*], Saleh Tabatabai Vakili[2]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Khuzestan university of Agriculure and Natural Resources, Mollasani, Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Khuzestan university of Agriculure and Natural Resources, Mollasani, Iran.
Received: June 30, 2021 Accepted: September 7, 2021

Abstract
The study aimed to investigate the effect of *asparagus* extract on quality semen of Arabian rams at different storage times at a temperature of 4 degrees Celsius. Sperm collection was performed from 10 Arab rams with an average age of 2.5 years per week (once a week) for six weeks. After adding 0, 1.5, 3 and 4.5% *asparagus* extract to the semen diluent, sperm quality parameters were evaluated at 0, 24, 48, and 72 hours after storage in liquid condition. At zero hour, sperm viability in diluent had 3% *asparagus* extract was higher than diluent containing 0 and 4.5% extract (P<0.05). After 24 hours of semen storage, the parameters of total motility, progressive motility, plasma membrane integrity and viability were higher in sperm diluent containing 1.5 and 3% of the extract (P<0.05). Qualitative parameters of sperm in 48 hours after sperm collection and storage in diluent contain 3% of extract had significant and better performance (P<0.05). The highest rate of plasma membrane integrity, progressive motility and total sperm motility was observed in diluent containing 3% extract in 72 hours after sperm storage (P<0.05). According to the results of this study, the use of *asparagus* extract in the diluent at the rate of 3% improves the sperm quality of Arabian rams after cooling conditions.

Keywords: Arabic ram, Asparagus, Motility, Sperm, Storage.

* نویسنده مسئول Email: mirzadeh@asnrukh.ac.ir

مقدمه

در حال حاضر اسپرم به دو صورت مایع و منجمد ذخیره می‌شود. ذخیره منی در شرایط مایع از طریق کاهش متابولیسم اسپرم، با استفاده از کاهش دما و مواد شیمیایی انجام می‌شود تا از پیرشدن اسپرم در مدت ذخیره‌سازی جلوگیری شود. انجماد منی نیز با توقف فعالیت‌های اسپرم سبب حفظ اسپرم در مدت ذخیره‌سازی آن می‌شود [۷]. در نگهداری به‌صورت مایع مشکلات مربوط به انجماد و آسیب‌دیدن اسپرم وجود ندارد و می‌توان باروری منی را تا حد قابل قبول حفظ کرد، اما مدت ذخیره‌سازی و باروری اسپرم مایع کوتاه است [۹]. استفاده از عصاره گیاهان به‌عنوان منبع از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند ترکیبات فنلی، ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، ترکیبات اسیدآمینه‌ای، ویتامین‌ها و مواد معدنی سبب کاهش اثرات استرس اکسیداتیو و متعادل‌کردن مقدار رادیکال‌های آزاد محیط اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپید می‌شود. امروزه استفاده از عصاره گیاهانی مانند گل میخک، آلووئرا، درخت آرگان، چایی سرخ و سبز، گیاه کبر، خرنوب، گیاه چمن معطر، خرمالو، سرخارگل، اوریکوما لانگیفولیا، رازیانه، گیاه درواش، گزنه، خارخاسک، گیاه ریشه طلایی، رزماری و گیاه خرفه به سبب اثرات مثبت در بهبود پارامترهای کیفی اسپرم و ارزانتر بودن نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی مرسوم است [۱۸].

مارچوبه (*Asparagus officinalis*) به‌دلیل غنی‌بودن از نظر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی هم‌چون ساپونین، گلوتامیک اسید، اسیدآسپارتیک، روتین، پروتودیوسین، گلوتاتیون، فلاونویید و هم‌چنین ویتامین‌های A، B، C و E هم‌چنین عناصر معدنی حائز اهمیت فراوان است [۱۳]. گیاه مارچوبه خوراکی سرشار کلسیم می‌باشد [۱]. مارچوبه خوراکی منبع غنی سلنیوم آلی می‌باشد [۲٤].

گیاهان دارویی با اثرات و ترکیبات ثانویه مشابه با مارچوبه شامل آویشن [۲۳]، رازیانه [۱۱] و خارخاسک [۱۲] باعث بهبود فراسنجه‌های اسپرمی بعد از اضافه‌شدن به رقیق‌کننده در شرایط مایع و پس ازانجماد- یخ‌گشایی شدند. هدف از این آزمایش، بررسی تأثیر عصاره گیاه مارچوبه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی منحصربه‌فرد آن بر کیفیت منی قوچ عربی تحت شرایط مایع بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، از۱۰ راس قوچ نژاد عربی با متوسط سن بالای ۲/۵ سال متعلق به ایستگاه دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد. اسپرم‌گیری به‌طور هفتگی (هر هفته یکبار) به‌مدت شش هفته از قوچ‌ها در فصل تولیدمثلی انجام شد. نمونه‌های منی توسط دستگاه الکترواجاکولیتور جمع‌آوری شد. منی جمع‌آوری‌شده از قوچ‌ها (حجم منی بین ۲-۰/۷۵ میلی‌لیتر و غلظت بیش از $۲/۷\times۱۰^{۹}$ در میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۷۵ درصد) به آزمایشگاه منتقل و پس از مخلوط‌کردن آن‌ها به‌منظور از بین‌بردن اثرات فردی، به نسبت یک به ۱۰ با رقیق‌کننده بر پایه تریس (۳/۲۸۵ گرم تریس، ۰/۵ گرم فروکتوز، ۱/۸۷۵ گرم اسیدسیتریک، ۱۵ درصد زرده تخم مرغ و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) رقیق و به چهار گروه تیماری تقسیم شد. تیمارها شامل افزودن سطوح صفر، ۱/۵، سه و ٤/۵ درصد عصاره گیاه مارچوبه به نمونه‌های منی رقیق‌شده و ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل درصد جنبایی، زنده‌مانی، ناهنجاری مورفولوژی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های صفر، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از نگهداری نمونه‌ها به حالت مایع در دمای چهار درجه سانتی‌گراد بود.

برای عصاره‌گیری از گیاه مارچوبه، ابتدا ۲۰۰ گرم از گیاه مارچوبه در ۰/۵ لیتر از الکل اتانول در داخل بالون مخلوط و سپس به‌مدت ۲٤ ساعت روی دستگاه شیکر

قرار داده شد. بعد از ٢٤ ساعت ظرف را از روی دستگاه شیکر برداشته و عصاره گیاه مارچوبه را با دستگاه روتاری جدا شد. سپس عصاره به‌مدت ٢٤ ساعت در آون قرار گرفت تا الکل آن تبخیر شود. ترکیب شیمیایی اجزای خوراکی گیاه مارچوبه در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد (جدول ١).

جدول ١. ترکیبات شیمیایی گیاه مارچوبه خوراکی

ترکیب شیمیایی	مقدار (درصد)
ماده خشک	٩٦
پروتئین خام	١٦/٥
خاکستر	٩/٣
فیبر خام	١٢/٣٣
چربی خام	١٥/٢٥
الیاف نامحلول در شوینده خنثی	٣١/٠٩
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	١٩/٢

فراسنجه‌های حرکتی اسپرم نظیر درصد تحرک کل، حرکت پیشرونده، سرعت واقعی در مسیر پیموده‌شده، میانگین سرعت در مسیر مستقیم، سرعت اسپرم در خط مستقیم، بیش‌ترین دامنه حرک‌های جانبی، معیار خطی‌بودن حرکت اسپرم، معیار مستقیم‌بودن حرکت اسپرم و بسامد (فرکانس) حرکت‌های جانبی، با قراردادن پنج میکرولیتر از منی رقیق‌شده روی لام گرم و گذاشتن یک لامل بر روی آن با استفاده از دستگاه کاسا (*Labmed LX400، Culver city CA، Labmed INC USA VideoTesT®, Sperm 3.2, Rusisa*) اندازه‌گیری شد.

برای ارزیابی درصد زنده‌مانی اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد. اساس رنگ‌آمیزی بدین صورت است که رنگ ائوزین به داخل اسپرم‌های مرده نفوذ می‌کند، اما اسپرم‌های زنده رنگ نمی‌گیرند. برای انجام این رنگ‌آمیزی، ٢٠ میکرولیتر از نمونه اسپرم بر روی لام قرار گرفت و ٢٠ میکرولیتر از رنگ آماده‌شده ائوزین- نیگروزین به آن افزوده شد. سپس با سمپلر به آرامی نمونه را به هم زده شد تا اسپرم با رنگ مخلوط شود. پس از ٣٠ ثانیه، ٢٠ میکرولیتر از نمونه را برداشته و بر گوشه لام دیگری گذاشته و با یک لام دیگر روی لام به‌آرامی گسترش تهیه شد. پس از خشک‌شدن، لام را زیر میکروسکوپ نوری قرار داده تحت بزرگ‌نمایی ١٠٠٠ و با استفاده از روغن ایمرسیون حداقل تعداد ٢٠٠ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های رنگی (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه شد. برای ارزیابی درصد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم از لام‌های رنگ-آمیزی‌شده با ائوزین-نیگروزین استفاده شد. تحت بزرگ‌نمایی ١٠٠٠ میکروسکوپ حداقل تعداد ٢٠٠ اسپرم زنده در میدان‌های میکروسکوپی مختلف در هر نمونه موردارزیابی قرار گرفته و سپس میزان اسپرم‌های ناهنجار مشاهده‌شده برحسب درصد گزارش شد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم نقایصی چون سر جدا شده، قطره سیتوپلاسمی دور، دم پیچ خورده، سر باریک و سر بزرگ مدنظر قرار گرفت.

برای بررسی سلامت غشای پلاسمایی اسپرم (HOST) از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هیپواسمول به‌صورت تورم دم است. در این حالت اسپرم‌هایی که غشای پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش نشان می‌دهند، اما اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. مقدار ١٠ میکرولیتر از نمونه منی با ١٠٠ میکرولیتر از محیط هیپواسموتیک حاوی فروکتوز (نه گرم در لیتر) و سیترات سدیم (٤/٩ گرم در لیتر) مخلوط شد، سپس ٣٠ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل سه قطره از نمونه انکوبه‌شده، ارزیابی با استفاده از میکروسکوپ نوری تحت دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی

٤٠٠ صورت گرفت. در هر گروه تیماری حداقل ٢٠٠ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه محاسبه شد [١٢، ٢١، ٢٣].

این طرح به‌صورت اندازه‌گیری‌های مکرر در واحد زمان انجام شد. داده‌های حاصل از فراسنجه‌های کیفی اسپرم در هر کدام از زمان‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Spss(ویرایش بیستم) رویه ANOVA برای مدل (١) تجزیه و میانگین‌ها، به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

مدل آماری طرح با استفاده از رابطه (١) محاسبه شد.

$$Yij = \mu + Ti + Pj + (T\times P)ij + Eij \qquad \text{(رابطه ١)}$$

که در این رابطه، Yij، مشاهدات مربوط به صفات؛ μ، میانگین کل مشاهدات؛ Ti، اثر تیمار؛ Pj، اثر زمان؛ (TP)ij، برهمکنش اثر تیمار × زمان و Eij، اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه مارچوبه خوراکی بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری در جدول (٢) آورده شده است. پس از اسپرم‌گیری و افزودن سطوح مختلف عصاره مارچوبه (زمان صفر)، درصد تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره بیش‌تر از سطوح صفر و ٤/٥ درصد عصاره در رقیق‌کننده بود. ($p <$ ٠/٠٥). تفاوتی در درصد جنبایی پیشرونده اسپرم بین تیمارها مشاهده نشد. در این زمان درصد سلامت غشاء پلاسمای اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ١/٥ و سه درصد عصاره بالاتر بود. ناهنجاری اسپرم در سطوح ١/٥ و سه درصد عصار کم‌تر و در سطح ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود ($P<$٠/٠٥). بعد از ٢٤ ساعت از اسپرم‌گیری و ذخیره‌سازی منی، درصد فراسنجه‌های تحرک کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ١/٥ و سه درصد عصاره بالاتر بودند. درصد ناهنجاری اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود ($P<$٠/٠٥). پس از ٤٨ ساعت از اسپرم‌گیری و نگهداری منی، درصد فراسنجه تحرک کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره بالاتر بود. ناهنجاری اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود. در حالی که سطوح ١/٥ و سه درصد عصاره عملکرد بهتری در مقایسه با شاهد به لحاظ کاهش ناهنجاری‌های اسپرم داشتند ($P<$٠/٠٥). پس از ٧٢ ساعت از ذخیره‌سازی اسپرم به حالت مایع، درصد تحرک کل، جنبایی پیشرونده، سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره مارچوبه مشاهده شد. در این زمان، سطوح ١/٥ و سه درصد عصاره دارای میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم کم‌تری نسبت به شاهد و بالاترین سطح عصاره بودند ($P<$٠/٠٥).

بررسی اثر زمان بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی نشان داد که رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره گیاه مارچوبه تأثیردر جلوگیری از کاهش تحرک اسپرم، تحرک پیشرونده، سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، زنده‌مانی و ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری از صفر تا ٧٢ ساعت پس از نگهداری عملکرد بهتری از سایر تیمارها داشت ($P<$٠/٠٥).

تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه مارچوبه خوراکی بر شاخص‌های حرکتی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری در جدول (٣) آورده شده است. پس از اسپرم‌گیری و افزودن عصاره‌ها، مقدار سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در رقیق‌کننده حاوی ١/٥ و سه درصد عصاره بالاتر بود. تحرک عرضی سر اسپرم، در رقیق‌کننده حاوی ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود. درصد خطی‌بودن اسپرم در تیمار شاهد بالاتر بود. مقدار سرعت

اسپرم در مسیر منحنی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بود. پارامترهای حرکتی میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم و معیار حرکت مستقیم اسپرم تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. مقدار تناوب عرضی زنش اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ درصد عصاره مارچوبه بالاتر بود (P<۰/۰۵).

بعد از ٢٤ ساعت از ذخیره‌سازی منی، مقدار سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بود. پارامترهای حرکتی تحرک عرضی سر اسپرم، درصد خطی‌بودن تحرک و تناوب عرضی زنش تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند. مقدار سرعت اسپرم در مسیر منحنی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بود. میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در سطوح عصاره بالاتر از شاهد بودند. پارامتر معیار حرکت مستقیم اسپرم در سطح صفر و ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه مارچوبه خوراکی (LSM± SE) بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری

تیمارها (درصد)	زمان (ساعت)	تحرک کل (درصد)	جنبایی پیشرونده (درصد)	سلامت غشا (درصد)	زنده‌مانی (درصد)	ناهنجاری اسپرم (درصد)
صفر	صفر	۷۹/۹٦ ± ۰/٦۱ ^{b}	٤٦/۹٦ ± ۱/۲٤	٦۹/۱۸ ± ۱/۳۸ ^{c}	۸۱/٥٥ ± ۰/۸٤ ^{b}	٦/۹۷ ± ۰/۲۳ ^{b}
	۲٤	٦٤/۳۰ ± ۱/۱۱ ^{b}	۲۸/۱۹ ± ۰/۸۲ ^{c}	٦۰/۱۰ ± ۱/۲٦ ^{c}	٦۹/٤۱ ± ۱/۳۷ ^{b}	۷/٦٤ ± ۰/۱٤ ^{b}
	٤۸	٤۹/۸۰ ± ۲/۱۸ ^{b}	۱۸/٦۷ ± ۰/۸۲ ^{c}	٤٥/۳۱ ± ۱/۷٦ ^{c}	٥٥/۲۳ ± ۲/٤۸ ^{b}	۸/۱۷ ± ۰/۰۹ ^{b}
	۷۲	۳۱/٥٤ ± ۰/۹۸ ^{c}	۸/۷۰ ± ۰/٦۱ ^{c}	۳۳/۷۱ ± ۰/۹۹ ^{c}	۳۸/۸۰ ± ۰/٥٦ ^{c}	۸/۷۲ ± ۰/۱۷ ^{b}
۱/٥	صفر	۸۱/٥۹ ± ۰/۸۰ ^{ab}	٤۷/۳۱ ± ۱/۷۲	۷٤/۱٤ ± ۲/۰۸ ^{ab}	۸۳/۸۹ ± ۱/٥۰ ^{ab}	٦/٤۳ ± ۰/۲٥ ^{bc}
	۲٤	٦۷/۷۰ ± ۰/۹۳ ^{ab}	۳۲/٤۱ ± ۰/۸٦ ^{b}	٦٦/٥٤ ±۲/۰۰ ^{ab}	۷۳/٤۳ ± ۱/۳٤ ^{ab}	٦/۸۰ ± ۰/۱۹ ^{c}
	٤۸	٥٥/٦۱ ± ۲/٤۹ ^{ab}	۲٤/۳۱ ± ۰/۸۳ ^{b}	٥۳/۹۹ ± ۱/٦٥ ^{b}	٦۱/۱۸ ± ۱/٥۲ ^{ab}	۷/۲۸ ± ۰/۲۱ ^{c}
	۷۲	۳۸/۱۳ ± ۱/٤۲ ^{b}	۱۲/۳۹ ± ۰/۹۸ ^{b}	۳۸/۹٦ ± ۱/٥۸ ^{b}	٤٤/٦۹ ± ۰/۹٥ ^{b}	۸/۰٥ ± ۰/۱۱ ^{c}
سه	صفر	۸۳/۳۷ ± ۱/۰۲ ^{a}	٤۹/٦۱ ± ۱/٤٥	۷٦/٥۹ ± ۱/٥۲ ^{a}	۸٦/۷۲ ± ۰/۸۲ ^{a}	٦/۱٤ ± ۰/۳۲ ^{c}
	۲٤	۷۰/۳۱ ± ۱/۳۹ ^{a}	۳٥/۸۳ ± ۰/۸۳ ^{a}	٦۹/۹۸ ± ۲/۲۸ ^{a}	۷٦/۲۲ ± ۱/٦٤ ^{a}	٦/٦۷ ± ۰/۲۸ ^{c}
	٤۸	٥۸/٦۰ ± ۲/۹٦ ^{a}	۲۸/۱۷ ± ۰/۹٤ ^{a}	٥۹/۳٥ ± ۱/٥۹ ^{a}	٦٥/۷٥ ± ۱/٦۲ ^{a}	۷/۲۱ ± ۰/۲٤ ^{c}
	۷۲	٤۲/۹۰ ± ۱/۰۳ ^{a}	۱٥/۷٤ ± ۰/۷۰ ^{a}	٤۲/۸۰ ± ۱/۳٦ ^{a}	٤۸/۹۹ ± ۰/۸٥ ^{a}	۷/۷۱ ± ۰/۱٥ ^{c}
٤/٥	صفر	۷۹/۹٤ ± /۷۰ ^{a}	٤٦/۳۷ ± ۱/۷۷	۷۰/۹۱ ± ۱/۳۸ ^{bc}	۸۲/۲٥ ± ۰/۹۲ ^{b}	۷/۹٤ ± ۰/۲۲ ^{a}
	۲٤	٦٥/۲٦ ± ۱/۱۳ ^{b}	۲۸/۹٦ ± ۰/۸۹ ^{c}	٦۳/٦۳ ± ۱/٤۹ ^{bc}	۷۱/۰۹ ± ۱/٥۳ ^{b}	۸/۳۹ ± ۰/۱۳ ^{a}
	٤۸	٥۱/۱٤ ± ۲/۳۰ ^{ab}	۱۹/۸۹ ± ۱/۱۸ ^{c}	٤۷/۹۷ ± ۱/۹۳ ^{c}	٥٦/۹۰ ± ۲/۲۳ ^{b}	۸/۷٥ ± ۰/۱۳ ^{a}
	۷۲	۳٤/۹۹ ± ۰/۹۱ ^{b}	۹/۸۰ ± ۰/۷۳^{c}	۳٥/٦٥ ± ۰/۹۹ ^{c}	٤۲/٥۰ ± ۰/۸۷ ^{b}	۹/۲٤ ± ۰/۱۳ ^{a}
اثر تیمار		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
اثر زمان		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه مارچوبه خوراکی (LSM± SE) بر پارامترهای حرکتی اسپرم قوچ عربی در زمان‌های مختلف نگهداری

تیمارها (درصد)	زمان (h)	VSL (µm/s)	ALH (µm)	Lin (درصد)	VCL (µm/s)	VAP (µm/s)	STR (درصد)	BCF (Hz)
صفر	صفر	۲۶/۷۱± ۰/۴۲^{b}	۲/۴۰ ± ۰/۰۵^{b}	۰/۳۵ ± ۰/۰۱ ^{a}	۵۸/۸۶ ± ۱/۸۴^{b}	۳۳/۱۴ ± ۰/۷۴	۰/۷۰ ±۰/۰۲	۱۰/۷۱ ±۰/۱۸^{ab}
	۲۴	۲۲/۸۶ ± ۰/۳۴^{b}	۱/۸۵ ± ۰/۰۴	۰/۴۲ ± ۰/۰۳	۴۷/۴۳ ± ۱/۹۵^{c}	۲۴/۴۳± ۰/۶۱^{b}	۰/۷۷±۰/۰۰۳^{a}	۱۰/۲۹ ± ۰/۱۸
	۴۸	۱۸/۷۱ ± ۰/۳ ^{b}	۱/۴۱ ±۰/۰۶ ^{b}	۰/۴۳ ± ۰/۰۱	۳۷/۲۹ ±۱/۶۱ ^{b}	۱۹/۸۶±۰/۳۴^{b}	۰/۸۰ ±۰/۰۱^{a}	۱۰/۵۷ ± ۰/۳۰
	۷۲	۱۵/۰۰ ± ۰/۳۱^{b}	۰/۹۱ ±۰/۰۴^{b}	۰/۴۹ ±۰/۰۱ ^{a}	۲۶/۴۳ ±۰/۷۵ ^{c}	۱۷/۰۰±۰/۳۱ ^{c}	۰/۸۳±۰/۰۰۴^{a}	۱۲/۱۴±۰/۲۶ ^{a}
۱/۵	صفر	۲۷/۵۷ ±۰/۳۷^{ab}	۲/۴۹ ± ۰/۰۴^{ab}	۰/۳۳±۰/۰۰۴^{b}	۷۱/۸۶ ± ۲/۷۰^{a}	۳۴/۷۱ ± ۰/۵۷	۰/۶۷ ± ۰/۰۲	۱۰/۸۶ ± ۰/۱۴^{a}
	۲۴	۲۴/۸۶ ± ۰/۲ ^{a}	۱/۹۲ ± ۰/۰۴	۰/۳۸± ۰/۰۲	۵۶/۴۳± ۲/۶۹^{ab}	۲۶/۲۹±۰/۵۲ ^{a}	۰/۷۱ ±۰/۰۱^{b}	۱۰/۲۹ ± ۰/۱۸
	۴۸	۲۰/۲۹ ± ۰/۲ ^{a}	۱/۴۹±۰/۰۴^{ab}	۰/۴۳±۰/۰۱	۳۹/۰۰± ۱/۵۶ ^{b}	۲۱/۴۳±۰/۳۷ ^{a}	۰/۷۶ ±۰/۰۱ ^{b}	۱۰/۷۱ ± ۰/۲۹
	۷۲	۱۶/۸۶ ±۰/۲۶ ^{a}	۱/۰۲±۰/۰۲^{ab}	۰/۴۷ ± ۰/۰۱^{ab}	۳۰/۴۳ ±۰/۶۹ ^{b}	۱۸/۴۳±۰/۳۰ ^{b}	۰/۸۰±۰/۰۱ ^{b}	۱۱/۱۴ ±۰/۳۴ ^{b}
سه	صفر	۲۸/۲۹ ±۰/۴۷ ^{a}	۲/۵۲±۰/۰۳ ^{ab}	۰/۳۴±۰/۰۰۳^{ab}	۷۶/۴۳ ±۱/۴۸ ^{a}	۳۴/۴۳ ± ۰/۷۲	۰/۶۷± ۰/۰۱	۱۰/۷۱±۰/۱۸^{ab}
	۲۴	۲۴/۷۱ ± ۰/۴۲^{a}	۱/۹۶ ± ۰/۰۳	۰/۳۷ ± ۰/۰۱	۶۱/۵۷ ±۲/۴۵ ^{a}	۲۷/۲۹±۰/۵۲ ^{a}	۰/۷۰±۰/۰۱ ^{b}	۱۰/۲۹ ± ۰/۱۸
	۴۸	۲۰/۱۴ ±۰/۳۴ ^{a}	۱/۵۵±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۴۱ ± ۰/۰۱	۴۴/۵۷ ±۰/۸۹ ^{a}	۲۲/۱۴±۰/۳۴ ^{a}	۰/۷۶ ±۰/۰۱ ^{b}	۱۰/۷۱ ± ۰/۱۸
	۷۲	۱۷/۵۷±۰/۳۷ ^{a}	۱/۰۵ ±۰/۰۴ ^{a}	۰/۴۵ ± ۰/۰۱^{b}	۳۴/۷۱±۱/۰۲ ^{a}	۱۹/۵۷±۰/۳۰ ^{a}	۰/۸۰±۰/۰۱ ^{b}	۱۱/۱۴ ±۰/۲۶^{b}
۴/۵	صفر	۲۶/۷۱ ±۰/۴۲^{b}	۲/۵۶ ±۰/۰۴ ^{a}	۰/۳۱ ±۰/۰۰۳^{c}	۵۹/۷۱±۲/۹۳ ^{b}	۳۳/۴۳ ± ۰/۵۳	۰/۷۱±۰/۰۱	۱۰/۲۹ ±۰/۱۸^{b}
	۲۴	۲۳/۸۶±۰/۳۴ ^{ab}	۱/۹۶± ۰/۰۴	۰/۳۹ ± ۰/۰۲	۵۰/۱۴±۲/۰۳ ^{bc}	۲۶/۴۳±۰/۵۷ ^{a}	۰/۷۶ ±۰/۰۱ ^{a}	۱۰/۲۹ ± ۰/۱۸
	۴۸	۱۹/۵۷±۰/۳۰^{ab}	۱/۵۸ ± ۰/۰۶ ^{a}	۰/۴۳ ± ۰/۰۱	۳۹/۸۶± ۱/۵۲ ^{b}	۲۱/۲۹±۰/۲۹ ^{a}	۰/۷۹ ±۰/۰۱ ^{a}	۱۰/۵۷ ± ۰/۲۰
	۷۲	۱۷/۲۹± ۰/۲۹ ^{a}	۰/۹۵±۰/۰۴ ^{ab}	۰/۴۸±۰/۰۱ ^{a}	۲۹/۸۶ ±۰/۹۱ ^{b}	۱۸/۲۹±۰/۴۲ ^{b}	۰/۸۴ ±۰/۰۱ ^{a}	۱۱/۸۶±۰/۲۶^{ab}
اثرتیمار		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۵۳
اثر زمان		۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵). VSL (سرعت اسپرم در مسیر مستقیم)، VAP (میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم)، VCL (سرعت اسپرم در مسیر منحنی)، ALH (تحرک عرضی سر اسپرم)، Lin (درصد خطی بودن تحرک)، STR (معیار حرکت مستقیم اسپرم)، BCF (فرکانس حرکات جانبی، تناوب عرضی زنش).

بعد از ۴۸ ساعت نگهداری منی به حالت مایع، پارامتر سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بود. تحرک عرضی سر اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ۴/۵ درصد عصاره بالاتر بود. پارامترهای حرکتی تناوب عرضی زنش و درصد خطی‌بودن تحرک اسپرم در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند. سرعت اسپرم در مسیر منحنی در رقیق‌کننده حاوی ۱/۵ و سه درصد عصاره بالاتر بود. میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در سطوح عصاره بالاتر بود. پارامتر معیار حرکت مستقیم اسپرم در سطوح صفر و ۴/۵ درصد عصاره بالاتر بود (P<۰/۰۵).

پس از ۷۲ ساعت ذخیره منی، مقدار سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در رقیق‌کننده حاوی سطوح عصاره بالاتر بود. تحرک عرضی سر اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره بالاتر بود. درصد خطی‌بودن تحرک اسپرم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره کم‌تر از سطح صفر

بود. پارامترهای حرکتی سرعت اسپرم در مسیر منحنی و میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصاره بالاتر بودند. پارامتر معیار حرکت مستقیم اسپرم در سطوح صفر و ٤/٥ درصد عصاره بالاتر بود. تناوب عرضی زنش اسپرم در سطح صفر بالاتر بود (P<۰/۰٥).

بررسی اثر زمان بر پارامترهای حرکتی اسپرم قوچ عربی نشان داد که در رقیق‌کننده حاوی سه درصد عصار گیاه مارچوبه فراسنجه سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در زمان‌های مختلف نگهداری عملکرد بهتری نسبت به سایر سطوح داشته است (P<۰/۰٥). تحرک عرضی سر اسپرم در رقیق‌کننده حاوی ٤/٥ درصد عصاره مارچوبه بهترین عملکرد را در زمان‌های مختلف نگهداری داشته است (P<۰/۰٥). پارامتر درصد خطی‌بودن تحرک اسپرم در سطح صفر بهترین عملکرد را داشته است (P<۰/۰٥). اثر زمان در فراسنجه سرعت اسپرم در مسیر منحنی در رقیق‌کننده حاوی درصد عصاره مارچوبه و معنی‌دار است (P<۰/۰٥). اثر زمان بر فراسنجه میانگین سرعت اسپرم در مسیر مستقیم در تمام سطوح عصاره مارچوبه معنی‌دار بود و سطح سه درصد عصاره بهترین عملکرد را در جلوگیری کاهش متوسط سرعت اسپرم را داشته است (P<۰/۰٥). پارامتر معیار حرکت مستقیم اسپرم در طول زمان‌های مختلف نگهداری در سطوح صفر و ٤/٥ درصد عصاره مارچوبه معنی‌دار بود (P<۰/۰٥). در طول زمان‌های مختلف نگهداری پارامتر تناوب عرضی زنش در سطح صفر معنی‌دار بود (P<۰/۰٥)

پژوهش‌های انجام‌شده در رابطه با اثرات گیاهان دارویی بر معیارهای اسپرم نشان‌دهنده اثر بخشی بسیاری از آن‌ها در کاهش ناباروری است [١٥]. گیاهان منبع غنی از ترکیبات فنولی (فلاونوئیدها، تانن و آنتوسیانین) هستند که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها به‌شمار می‌آیند. فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاهان با میزان ترکیبات فنولی رابطه مستقیم دارد. ترکیبات فنولی از طریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهار می‌کنند [١٧]. هم‌چنین حرکت اسپرم، به‌شدت تحت تأثیر تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد و همبستگی منفی بین پارامترهای حرکتی اسپرم و میزان رادیکال‌های آزاد در محیط اسپرم، وجود دارد و پارامترهای حرکتی اسپرم شامل VSL، VAP، VCL و ALH تحت تأثیر اثرات منفی ازیاد رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند [٤]. در پژوهش حاضر مارچوبه باعث بهبود تحرک‌کل و پیش‌روند و شاخص‌های حرکتی اسپرم شد، در واقع گیاه مارچوبه غنی از ترکیبات ثانویه مثل فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و گلوتاتیون است که خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی‌ای دارند [١٤]. مطابق با پژوهش حاضر گیاه رازیانه، هم‌چون مارچوبه دارای مقادیر فراوانی فلاونوئید است، به‌طوری‌که بخشی مهمی از توان آنتی‌اکسیدانی در این گیاه، به‌دلیل ترکیبات فلاونوئیدی آن است، با افزودن عصاره گیاه رازیانه به منی قوچ قزل، اثرات معنی‌داری بر تحرک و پارامترهای حرکتی اسپرم شامل VSL، VAP، VCL، ALH و Lin مشاهده شد، به‌طوری‌که در غلظت‌های متوسط، اثرات مثبت ولی در غلظت‌های زیاد، اثرات منفی بر فراسنجه‌های مذکور داشتند [١١].

در این پژوهش افزودن عصاره در سطح ٣ درصد باعث افزایش معنی داری در غشای فعال اسپرم، زنده‌مانی و کاهش ناهنجاری اسپرم شده، پژوهش‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که عصاره هیدروالکلی مارچوبه دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی است و می‌تواند رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را به میزان قابل توجهی از بین ببرد. در این میان فلاونوئیدها بیش‌ترین تأثیر را بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مارچوبه داشتند [٥]. فلاونوئیدها از ترکیبات فراوان موجود در گیاهان هستند و با تنظیم مقدار تنفس سلولی میتوکندری اسپرم از استرس

اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید جلوگیری می‌کنند، به‌طوری‌که بر تمام پارامترهای کیفی اسپرم اثر مثبت می‌گذارند [٦]. هم‌چنین در پژوهش دیگر در راستای نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که گیاه بلوبری (*Aniba canelilla*) سرشار از ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدها هستند و افزودن عصاره این گیاهان به اسپرم گاومیش تحت شرایط مایع سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی و پارامترهای حرکتی VCL، VAP، VSL، ALH و BCF می‌شود [۲].

در پژوهشی افزودن عصاره هیدروالکلی آویشن به رقیق‌کننده بر پایه تریس- زرده تخم مرغ سبب بهبود کیفیت فراسنجه‌های کیفی اسپرم (تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم) قوچ مغانی بعد از فرایند انجماد شد، هم‌چنین پارامترهای حرکتی اسپرم شامل VSL، VAP و VCL در سطح ٤mL/dL عصاره هیدروالکلی آویشن بهبود یافت، درحالی‌که پارامتر ALH از فراسنجه‌های حرکتی اسپرم در مقایسه با گروه شاهد بی‌تفاوت بود. عملکرد پارامترهای STR وLIN در سطوح بالاتر استفاده از عصاره آویشن پایین‌تر بود [۲۳] که با پژوهش حاضر مطابقت داشت. اصلی‌ترین ترکیبات موجود در گیاه مارچوبه ساپونین‌ها می‌باشند ۹۰ درصد از ساپونین‌های گیاه مارچوبه از نوع ساپونین فورستانول پروتودیوسین است که عامل اصلی خاصیت باروری در گیاه مارچوبه می‌باشد [۱۹]. مشابه با پژوهش حاضر در گیاهانی از نظر ترکیبات مشابه گیاه مارچوبه مانند گیاه خارخاسک (*Tribulus terrestris*) که حاوی پلی‌فنول‌های زیادی است و دارای رده وسیعی از اجزا، مانند اسیدهای فنولیک و فلاونول‌ها می‌باشد. هم‌چنین گیاه خارخاسک که دارای ترکیبات فعال زیستی فراوانی است و این ترکیبات شامل ساپونین‌ها نیز می‌باشد. به‌طوری‌که ساپونین فورستانول، پروتودیوسین اصلی‌ترین متابولیت ثانویه موجود در آن است [۱۰]. افزودن عصاره هیدروالکلی خارخاسک دارای اثرات مفیدی هم‌چون، افزایش سلامت DNA، تحرک پیشرونده، سلامت غشا و افزایش زنده‌مانی و کاهش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی، بر اسپرم در نگهداری با دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بود [۱۲].

مارچوبه از لحاظ گلوتاتیون اسید غنی می‌باشد در پژوهشی در راستای نتایج این پژوهش نشان دادند که افزودن گلوتاتیون به اسپرم رقیق‌شده بز سبب بهبود پارامترهای تحرک، زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی، VSL، VAP، VSL، ALH و BCF پس از انجماد و یخ‌گشایی می‌شود [۸]. هم‌چنین افزودن گلوتاتیون به رقیق‌کننده اسپرم قوچ بر پایه تریس- زرده تخم‌مرغ، مانع از کاهش زیاد تحرک اسپرم، کاهش سلامت غشا، افت میزان سرعت خطی اسپرم، طی نگهداری منی به حالت مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شد. هم‌چنین به‌واسطه کنترل میزان غلظت $GLUT_{4,8}$ (حامل گلوکز ۴ و ۸)، که یک هگزوز ترانسفراز موجود در میتوکندری می‌باشد، افزایش فراوانی آن‌ها در میتوکندری سلول اسپرم، افزایش واکنش‌های اکسیداسیون را به‌دنبال خواهد داشت. بنابراین گلوتاتیون، واکنش‌های اکسیداسیونی، در میتوکندری سلول اسپرم قوچ، را کاهش می‌دهد [۲۱] که با نتایج حاضر مطابق داشت. هم‌چنین گیاه مارچوبه از لحاظ وجود گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید به‌عنوان بیش‌ترین اسید آمینه‌ها در این گیاه نیز غنی می‌باشد [۱۳]. گلوتامین دارای اثرات مثبت بر فراسنجه‌های کیفی و پارامترهای حرکتی سرعت اسپرم قوچ مرینوس تحت شرایط مایع بود این اسید آمینه در طول غشای پلاسمایی اسپرم با اسیدهای چرب ترکیب شده و از پراکسیداسیون لیپید و در نتیجه از کاهش تحرک، زنده مانی و کاهش سرعت حرکت اسپرم جلوگیری می‌کند [١٦]. آسپارتیک اسید دارای اثرات مفید بر بهبود پارامترهای کیفی و فراسنجه‌های حرکتی VCL، VSL و VAP در اثر افزودن به اسپرم انسان بوده است [۲۲].

از ویژگی‌های منحصربه‌فرد عصاره مارچوبه میزان بالایی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سلنیوم و کلسیم می‌باشد [۱ و ۲٤]. بنابراین یکی از راه‌هایی که احتمال دارد عصاره مارچوبه باعث بهبود فراسنجه‌های اسپرمی شده باشد، گلوتاتیون پراکسیداز از آنزیم‌های سلنوپروتئین موجود در منی است و وجود سلنیوم در محیط اسپرم از طریق تقویت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز که کوفاکتور این آنزیم بوده با بهبود پارامترهای کیفی زنده‌مانی، سلامت غشإ پلاسمایی و کاهش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی از طریق جلوگیری از قطعه‌قطعه‌شدن اسپرم و تقویت DNA به تقویت باروری بزهای نر کمک می‌کند [۲۰]. وجود کلسیم در محیط اسپرم و ذخیره بیش‌تر کلسیم در داخل آن از طریق افزایش cAMP که فعالیت آن وابسته به کلسیم است بر روی عملکرد پروتئین کیناز A تأثیر مثبت گذاشته و حرکت تاژک اسپرم را تقویت کرده و حرکت اسپرم و سرعت حرکت اسپرم را ازیاد می‌کند پارامترهای VSL، VCL، ALH و BCF در اسپرم قوچ تحت تأثیر مقدار کلسیم محیط اسپرم می‌باشند [۳]. با توجه به نتایج این پژوهش، افزودن عصاره به میزان سه درصد در رقیق‌کننده منی باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم در مدت نگهداری به حالت مایع می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مدیریت و کارکنان ایستگاه دامپروری، آزمایشگاه مرکزی و حوزه معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌خاطر همکاری در اجرای این پژوهش، تشکرو قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورداستفاده

1. Amaro-Lopez M, Zurera-Cosano G, Moreno-Rojas, R (1998) Trends and nutritional significance of mineral content in fresh white asparagus spears. *Journal Food Science 49*: 353-363.
2. Becerra VAB (2017) Effect of the addition of Aniba Canelilla, Blueberry and Green Tea Polyphenol on the in vitro viability of buffalo sperm (Bubalus Bubalis) cooled at 5º C.
3. Colás C, Cebrián-Pérez JA and Muiño-Blanco T (2010). Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *International journal of andrology*, *33*(1): e187-e197.
4. De Castro LS, De Assis PM, Siqueira AF, Hamilton TR, Mendes CM and Losano JD, Assumpção ME (2016) Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
5. Fan R, Yuan F, Wang N, Gao Y and Huang Y (2015) Extraction and analysis of antioxidant compounds from the residues of Asparagus officinalis L. *Journal of food science and technology*, 52(5): 2690-2700.
6. Ferramosca A, Lorenzetti S, Di Giacomo M, Lunetti P, Murrieri F, Capobianco L and Zara V (2021) Modulation of human sperm mitochondrial respiration efficiency by plant polyphenols. *Antioxidants,* 10(2): 217.
7. Forouzanfar M, Fazilati M, Hosseini SM, Moulavi F, Hajian M, Salehi SA and Nasr-Esfahani MH (2007) Investigation of different glycerol and egg yolk concentration on freezing Bakhtiari ram semen. Journal of Iranian Anatomical Sciences, 5: 17-25
8. Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B and Gardón JC (2013) Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive biology*, 13(1): 24-33
9. Hammerstedt RH and Graham JK (1992) Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. Cryobiology, 29(1): 26-38.
10. Kamboj P, Aggarwal M, Puri S and Singla SK (2011) Effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on oxalate-induced oxidative stress in rats. *Indian journal of nephrology*, 21(3): 154.

11. Karimi A, Besharati M and Nemati Z (2018) Protective effects of fennel (Foeniculum vulgare) extract onfrozen-thowed sperm of Ghezel ram. Journal of Animal Environment, 10(4): 83-90. (In Persian).
12. Khaleghi S, Bakhtiari M, Asadmobini A and Esmaeili F (2017) *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters in vitro. *Journal of evidence-based complementary and alternative medicine*, 22(3): 407-412. (In Persian).
13. Lee EJ, Yoo KS and Patil BS (2010) Development of a rapid HPLC-UV method for simultaneous quantification of protodioscin and rutin in white and green asparagus spears. *Journal of food science,* 75(9): 703-709.
14. Naghdi Badi H, Qavami N, Mehrafarin A and Qaderi A (2011) A Review on Garden Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) as a Medicinal and Multipurpose Plant. Journal Medical Plants. 10 (39): 1-13.
15. Nantia EA, Moundipa PF, Monsees TK and Carreau S (2009) Medicinal plants as potential male anti-infertility agents: a review. *Basic and Clinical Andrology,* 19(3): 148-158.
16. Pall E, Cenariu M, Groza I, Ciupe S, Sinteonean L and Bogdan L (2018) Effect of ascorbid acid and L-glutamine on ram sperm parameters. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 51(2): 85-91.
17. Pokorný J (2007) Are natural antioxidants better–and safer–than synthetic antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6): 629-642.
18. Ros-Santaella JL and Pintus E (2021) Plant Extracts as Alternative Additives for Sperm Preservation. *Antioxidants*, 10(5): 772.
19. Schwarzbach A, Schreiner M and Knorr D (2006) Effect of cultivars and deep freeze storage on saponin content of white asparagus spears (*Asparagus officinalis* L.). *European Food Research and Technology*, 222(1): 32-35
20. Shi LG, Yang RJ, Yue WB, Xun WJ, Zhang CX, Ren YS, Shi L, Lei FL. 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4): 248-254.
21. Shi, L, Jin T, Hu Y, Ma Z and Niu H Ren Y (2020) Effects of reduced glutathione on ram sperm parameters, antioxidant status, mitochondrial activity and the abundance of hexose transporters during liquid storage at 5°C. *Small Ruminant Research*, 106139.
22. Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S and Gualtieri R (2013) Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1): 1-10.
23. Vahedi V, Hedayat Evrigh N, Behroozlak M and Dirandeh E (2018) Antioxidant effects of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on ram sperm quality during cryopreservation. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(2): 263-269. (In Persian).
24. Zhu XL, Li CX, Zhang L and Zhu YD (2020) Research advance in bioactive constituents and major biological activities of *Asparagus officinalis L. journal food science*, 9(1): 74-81.