

Effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm quality of aged broiler breeder roosters

Mahkam Alizadeh¹, Ali Aghaei^{2*}, Saleh Tabatabaei Vakili³, Mahmoud Nazari³

1-Ph. D student in Poultry Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2-*Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3-Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

*Corresponding Author's Email: aghaei@asnrukh.ac.ir

ali_ghaei110@yahoo.com

Introduction: In recent years, the emphasis on improving growth traits and increasing body weight in broiler lines has led to a significant decline in reproductive performance in broiler breeder flocks (Blesbas et al., 2004). Reduced fertility has become a major challenge in broiler breeder management. Although roosters account for only 10% of the flock population, their role in fertility is estimated to be as high as 50% (Cerolini et al., 2006; Akhlaghi et al., 2014). Among the main factors contributing to declining fertility, age and nutrition are of particular importance. Fertility reduction is often attributed to obesity, lower semen quality, decreased libido, and reduced mating efficiency (Romero et al., 2008). Peak reproductive performance in male chickens and turkeys is observed between 30 and 40 weeks of age and gradually declines, nearly ceasing by 75 weeks (Noiraud and Brillard, 1999). Sperm count and fertilizing capacity increase from 24 weeks to a peak at 39 weeks, then decline by 72 weeks of age (Kelso et al., 1997). Enhancing the reproductive potential of aging broiler breeder males is therefore essential (Fouad et al., 2020). Serine, a traditionally non-essential amino acid, plays critical roles in protein synthesis and cellular signaling (Metcalf et al., 2008; Hunter, 2012). Choline is an essential nutrient with key metabolic functions, including as a membrane phospholipid component, in hepatic lipid metabolism, and as a precursor of acetylcholine (Dudley, 1929). Choline is a methyl donor involved in methionine synthesis and indirectly functions in protein synthesis. In addition, it constitutes about 39% of the phospholipids in the plasma membrane and plays a role in cell maintenance and repair by synthesizing very low-density lipoproteins and providing phosphatidylcholine (Del Vesco et al, 2013). Despite numerous studies on the effects of unsaturated fatty acids, antioxidants, and some amino acids on sperm quality, no comprehensive study has been conducted on the interaction effects of the amino acid L-serine and choline supplementation in the nutrition of older broiler breeder roosters. This study investigated the effects of the amino acid serine and choline supplementation on sperm quality of older broiler roosters.

Materials and Methods: This experiment was conducted on 36 aged Ross 308 broiler breeder roosters aged 45 weeks. Birds were randomly assigned to six groups of six individuals each and housed under controlled environmental conditions in a standard poultry house. The study was designed as a factorial arrangement in a completely randomized design with three levels of L-serine and two levels of choline. Birds were adapted to semen collection through abdominal massage for two weeks before the experiment. Semen volume was measured using a graduated collection tube (Zamiri et al., 2010). Sperm concentration was determined using modified Blaise-Tweel extender with a pH of 7.4 and osmolality of 310 mosm/kg (Amini et al., 2015). Forward progressive motility was assessed by diluting semen samples in NaCl (1:20), placing a drop on a slide, covering it with a coverslip, and examining under a light microscope at 400× magnification (Akhlaghi et al., 2014). Plasma membrane functionality and integrity were assessed using the hypo-osmotic swelling test, while sperm viability and morphological abnormalities were determined by eosin-nigrosine staining (Tapeh et al., 2017).

Results and Discussion: results showed that that sperm concentration was significantly affected by different levels of serine and choline ($P \leq 0.05$). In the interaction of experimental treatments, the highest sperm concentration was observed in the group receiving 0.3% serine and 470 mg choline, indicating a positive effect of these compounds on spermatogenesis and increased sperm production. The highest sperm concentration (4.08) occurred in the treatment containing 0.3% serine, while the control group had the lowest concentration (3.46). Consistent with this finding, Ansari et al. (2016) reported that oral supplementation of the non-essential amino acid aspartate in the diets of aging broiler breeder roosters significantly increased sperm concentration with rising intake levels. The combined effect of L-serine and choline supplementation also increased the percentage of progressive sperm motility during the trial weeks; this synergistic effect was significant in weeks 4, 5, 8, and 9 ($P \leq 0.05$). The highest progressive motility (50.75%) was recorded in week 8, whereas the lowest value (35.00%) was observed in the control group. In agreement with these results, adding serine to rooster semen as a diluent has been shown to improve sperm quality and fertility (Chankitisakul et al., 2022). The interaction of serine and choline significantly enhanced total sperm motility from week 5 to week 9. The highest total motility (88.75%) was obtained in the treatment with 0.15% serine and 470 mg kg^{-1} choline in weeks 8 and 9, whereas the control diet yielded the lowest motility (70.00%), showing a significant difference from the combined treatment ($P \leq 0.05$). Analysis of sperm viability indicated that diets containing L-serine and choline had a significant effect on this trait ($P \leq 0.05$). The best viability was observed in the group receiving 0.3% serine with 470 mg kg^{-1} choline, reaching 88.75% in weeks 8 and 9, which was significantly higher than the group lacking serine and choline ($P \leq 0.05$). The lowest sperm viability (68.25%) occurred in the control treatment. L-serine, through its antioxidant properties and the regulation of genes involved in glutathione synthesis, increases glutathione concentration and reduces oxidative reactions (Zhou et al., 2018; Sim et al., 2015). The combined use of serine and choline significantly improved sperm membrane integrity and health compared with the control, with this increase becoming significant from week 6 to week 9 ($P \leq 0.05$). The highest membrane integrity (88.00%) was observed in week 9 with 0.3% serine, while the lowest value (68.75%) belonged to the group without serine and choline. Examination of sperm abnormalities revealed that treatments containing serine significantly affected this parameter ($P \leq 0.05$). Supplementation with L-serine at 0.15% and 0.3% reduced abnormal sperm percentages, with significant decreases observed in weeks 5 and 7. The lowest percentage of abnormal sperm (13.62%) occurred in the 0.3% serine group, which differed significantly from the diet lacking serine ($P \leq 0.05$). The effect of choline supplementation and the combined effect of serine and choline on abnormal sperm percentage were not significant ($P > 0.05$). These results agree with the findings of Long and Conn (2012), who reported that adding choline phosphate to duck semen extenders reduced acrosome head abnormalities.

Conclusion: The results of this study showed that the use of the amino acid L-serine and choline supplement in the diet can significantly increase sperm concentration, sperm membrane health, total sperm motility, sperm viability, progressive sperm motility, and reduce the percentage of sperm abnormalities in most weeks of the experiment, indicating the synergy of these two compounds in improving sperm quality in older broiler roosters, which can further increase the fertility and productivity of older broiler roosters in the poultry industry.

Keywords: L-serine, Choline, Broiler breeder roosters, Sperm quality, Membrane integrity, Fertility.

اثرات اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم خروس‌های مسن مادر گوشتی

مه‌کام علیزاده^۱، علی آقائی^{۲*}، صالح طباطبائی و کیلی^۳، محمود نظری^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۷/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۳

۱-دانشجوی دکتری تغذیه طیور، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲-استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳-دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

نویسنده مسئول: * aghaei@asnrukh.ac.ir

ali_ghaei110@yahoo.com

<https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94457.1260>

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر تغذیه‌ای اسیدآمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم در خروس‌های گله‌ی مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ بود. برای این منظور، ۳۶ قطعه خروس گله‌ی مادرگوشتی در سن ۴۵ هفتگی در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۲×۳ (سه سطح ال-سیرین و دو سطح کولین) در طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و شش تکرار استفاده شد. پس از دو هفته دوره عادت‌دهی، آزمایش به مدت هفت هفته ادامه یافت. تیمارهای آزمایشی شامل جیره‌هایی با سطوح صفر، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد ال-سیرین و دو سطح افزودن کولین (صفر و ۴۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) بودند. نمونه‌گیری اسپرم و بررسی کیفیت و کمیت آنها به‌صورت هفتگی از تمامی خروس‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت اسپرم، جنبش پیش‌رونده، تحرک کل، سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم، به‌طور معنی‌داری در تیمارهای حاوی سیرین و کولین نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. غلظت اسپرم، جنبایی پیش‌رونده و سلامت غشای اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۳ درصد مکمل سیرین به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. درصد تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سیرین و ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مکمل کولین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه فاقد سیرین و کولین افزایش پیدا کرد. درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی ناهنجار در تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سیرین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. مکمل کولین و اثر متقابل سیرین و کولین تاثیری بر ریخت‌شناسی ناهنجار نداشتند. افزودن سیرین و مکمل کولین به جیره سبب افزایش حدود ۱۵ درصدی در جنبایی اسپرم، افزایش حدود ۱۹ درصد در تحرک کل، افزایش تقریبی ۲۱ درصدی در زنده‌مانی و افزایش ۱۲ درصدی در سلامت غشای اسپرم شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از سطوح مورد مطالعه اسید آمینه ال-سیرین و مکمل کولین در جیره غذایی، موجب بهبود کیفیت اسپرم و احتمال افزایش باروری در خروس‌های مسن گله‌های مادر گوشتی می‌شود.

واژگان کلیدی: اسید آمینه سیرین، تحرک اسپرم، خروس مادر گوشتی، سلامت غشای اسپرم، کیفیت اسپرم.

مقدمه

در سال‌های اخیر، تمرکز بر بهبود صفات رشد و افزایش وزن در لاین‌های گوشتی، موجب کاهش قابل‌توجهی در عملکرد تولیدمثلی سویه‌های مولد شده است (Blesbas et al., 2004). امروزه کاهش باروری یکی از چالش‌های مهم در پرورش

گله‌های مادر گوشتی محسوب می‌شود. با وجود اینکه خروس‌ها تنها ۱۰ درصد از جمعیت گله‌های مادر را تشکیل می‌دهند، اما نقش آنها در باروری تا ۵۰ درصد اهمیت دارد (Cerolini et al., 2006; Akhlaghi et al., 2014). از میان عوامل مؤثر در کاهش باروری، سن و تغذیه اهمیت بیشتری دارند. کاهش باروری می‌تواند به عواملی مانند اضافه‌وزن، کاهش کیفیت منی، افت میل جنسی و کاهش کارایی جفت‌گیری نسبت داده شود (Romero et al., 2008). حداکثر بازده تولیدمثلی در خروس‌ها و بوقلمون‌های نر بین ۳۰ تا ۴۰ هفتگی مشاهده می‌شود، اما پس از آن کاهش می‌یابد و در حدود ۷۵ هفتگی تقریباً متوقف می‌شود (Noiraud and Brillard, 1999). طی این دوره، شمار اسپرم و قابلیت بارورسازی آن از ۲۴ هفتگی تا اوج باروری در ۳۹ هفتگی افزایش یافته و سپس تا ۷۲ هفتگی کاهش می‌یابد (Kelso et al., 1997). نشان داده شد که تغییرات گسترده‌ای در ترکیب لیپید اسپرم پرندگان با مسن‌تر شدن پرنده اتفاق می‌افتد. در اسپرم خروس نسبت‌های کل فسفولیپید، فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل کولین تغییرات برجسته‌ای را در دوره تولید مثلی نشان می‌دهد که با باروری مرتبط است (Cerolini et al., 2003). فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین عموماً مهم‌ترین گروه فسفولیپیدها در اسپرم خروس محسوب می‌شوند، آنها به طور معمول با یک دامنه‌ی گسترده‌ای از اجزاء دیگر مثل، فسفاتیدیل سرین و اسفنگو میلین همراه می‌باشند (Darin-Bennett et al., 1974). کاهش اسپرم‌سازی و کیفیت اسپرم خروس همراه با کاهش در هر دو اسید چرب ۴n-۶:۲۲ و ۴n-۶:۲۰ موجود در فسفولیپیدهای اسپرم است. قابل توجه است که نسبت بالای اسیدهای چرب ۴n-۶:۲۲ در کل فسفولیپیدهای اسپرم همبستگی منفی بالایی با افزایش سن خروس و همبستگی مثبت با جنبایی و توان باروری دارد. یافته‌ها نشان می‌دهد که بین کاهش توان سلول‌های بیضه در سنتز و ساخت اسیدهای چرب ۴n-۶:۲۲ از فسفولیپیدها و کاهش شمار و کیفیت اسپرم با افزایش سن همبستگی وجود دارد (Etches, 1996). در خروس‌های مسن مادر گوشتی بهبود پتانسیل تولید مثلی بسیار مهم است (Fouad et al., 2020). سرین یک اسید آمینه‌ای است که به طور سنتی به عنوان یک ترکیب غیر ضروری در نظر گرفته می‌شود، اما در سنتز پروتئین و سیگنال‌دهی سلولی نقش حیاتی دارد (Metcalf et al., 2008; Hunter, 2012). افزودن سرین به جیره غذایی می‌تواند استرس اکسیداتیو را کاهش داده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد (Zhou et al., 2018). از سوی دیگر، افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند منجر به تحلیل سلول‌های بیضه شده و در نهایت کاهش وزن بیضه و تولید اسپرم را به دنبال داشته باشد (Sarabia et al., 2013). فسفاتیدیل سرین، که به عنوان یکی از اجزای کلیدی فسفولیپیدهای غشایی شناخته می‌شود، تأثیر مستقیمی بر باروری دارد. طبق مطالعات، میزان اسید چرب ۴n-۶:۲۲ (اسید دکوزاترا انوئیک) در فسفاتیدیل سرین اسپرم بیش از ۳۳ درصد وزن تام اسیدهای چرب را تشکیل می‌دهد که نشان‌دهنده نقش حیاتی این مولکول در تنظیم عملکردهای غشایی اسپرم پرندگان است (Salem et al., 1986; Surai et al., 1998). کولین یک ماده مغذی ضروری با سه عملکرد متابولیک حیاتی است: به عنوان یک جزء از فسفولیپیدهای غشایی، تنظیم متابولیسم لیپیدهای کبدی و جلوگیری از تجمع چربی در کبد و همچنین به عنوان پیش‌ساز استیل کولین در سیستم عصبی است این مولکول همچنین با سنتز لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم و تأمین فسفاتیدیل کولین به طور غیرمستقیم در متابولیسم لیپیدی شرکت می‌کند (Do Nascimento et al., 2022). کولین به عنوان دهنده‌ی گروه‌های متیل در سنتز متیونین و به طور غیرمستقیم در سنتز پروتئین عمل می‌کند. علاوه بر این، حدود ۳۹ درصد از فسفولیپیدها موجود در غشای پلازما را تشکیل می‌دهد و با سنتز لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار کم و تأمین فسفاتیدیل کولین در نگهداری و ساخت سلول نقش دارد (Del Vesco et al., 2013). اهمیت کولین و مشتقات آن، نظیر فسفاتیدیل کولین، در بهبود کیفیت اسپرم و باروری اردک مورد توجه بسیاری از مطالعات قرار گرفته است (Long and Conn, 2012). فسفولیپیدها نوع اصلی لیپید موجود در غشای اسپرم پرندگان را تشکیل می‌دهند که فسفاتیدیل کولین ۳۹٪ از کل محتوای فسفولیپیدی را تشکیل می‌دهد (Surai et al., 1998). با وجود بررسی‌های متعدد در زمینه اثر

اسیدهای چرب غیراشباع و آنتی اکسیدان ها و برخی اسیدهای آمینه بر کیفیت اسپرم، تاکنون تحقیق جامعی در مورد اثرات متقابل اسید آمینه ال سرین و مکمل کولین در تغذیه خروس های مسن گله های مادر گوشتی صورت نگرفته است. این پژوهش به بررسی اثرات اسید آمینه سرین و مکمل کولین بر کیفیت اسپرم خروس های مسن گوشتی پرداخته است.

مواد و روش ها

در این پژوهش ابتدا اسید آمینه ال سرین و مکمل کولین از شرکت اکسیر تامین تجارت ماندگار (ایکس شیمی)، تهران، ایران خریداری شد.

پرندگان، جایگاه و شرایط پرورش

این پژوهش، جهت انجام بخش مزرعه ای از ۳۶ قطعه خروس مسن مادر گوشتی راس ۳۰۸ تهیه شده از یک مزرعه تجاری با شرایط ظاهری سالم و تقریباً یکنواخت با سن ۴۵ هفته و میانگین وزن اولیه (4500 ± 200) انجام شد. خروس ها در یک سالن پرورش استاندارد، تحت شرایط محیطی کنترل شده، به ۶ گروه ۶ تایی دسته بندی و به طور کاملاً تصادفی در آشیانه ها نگهداری شدند. هر آشیانه حاوی یک آبخوری معلق و یک دانخوری بود. آب به صورت آزاد در طول آزمایش ارائه شد. خروس ها در طول دوره آزمایش از جیره های غذایی تنظیم شده و به مقدار معین به صورت یک بار در روز تغذیه شدند. روشنایی به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. دمای سالن در محدوده ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی گراد در طول دوره آزمایش حفظ شد.

تیمارهای آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با سه سطح اسید آمینه سرین و دو سطح کولین انجام شد. تیمارها شامل: (۱) جیره حاوی صفر درصد اسید آمینه سرین + صفر درصد کولین، (۲) صفر درصد سرین + ۴۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم کولین، (۳) ۰/۱۵ درصد اسید آمینه سرین + صفر درصد مکمل کولین، (۴) ۰/۱۵ درصد اسید آمینه سرین + ۴۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم کولین، (۵) ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین + جیره حاوی صفر درصد مکمل کولین، و (۶) ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین + ۴۷۰ میلی گرم کولین بودند. جیره پایه، بر اساس تأمین مواد مغذی توصیه شده در راهنمای پرورش خروس راس سویه ۳۰۸، (۲۰۱۹) تنظیم شد. اجزا تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره مورد استفاده در تغذیه خروس ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (درصد)

Table1-The Ingredient and nutrient composition of basal diets (%)

اجزای جیره	درصد	ترکیب شیمیایی	درصد
Ingredients (g)	%	Chemical composition	%
ذرت	56.00	انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری/کیلوگرم)	2800
Corn		Metabolizable Energy	
		(kcal/kg)	
کنجاله سویا	9.00	پروتئین خام	12.62
Soybean meal		Crude protein	
سیوس گندم	19.25	کلسیم	0.75
Wheat bran		Calcium	
جو	10.00	فسفر قابل دسترس	0.37
Barley		Available phosphorus	

روغن	2.25	لیزین	0.55
Fat		Lysine	
جوش شیرین	0.20	متیونین	0.39
Sodium bicarbonate		Methionine	
دی کلسیم فسفات	1.30	متیونین + سیستئین	0.64
Dicalcium phosphate		Cysteine + Methionine	
پودر صدف	1.05	والین	0.55
Oyster shell		Valine	
نمک	0.27	ترئونین	0.45
Salt		Threonine	
دی ال - متیونین	0.18	سدیم	0.19
DL_methionine		Sodium	
مکمل ویتامین	0.25	کلر	0.19
Vitamin premix*		Chlorine	
مکمل معدنی	0.25		
Mineral premix**			

* هر کیلوگرم جیره حاوی: ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۱۸ واحد بین المللی ویتامین E، ۲ میلی گرم ویتامین K₃، ۱/۸ میلی گرم ویتامین B₁، ۵/۵ میلی گرم ویتامین B₂، ۱۰ میلی گرم ویتامین B₃، ۳۰ میلی گرم B₅، ۳ میلی گرم ویتامین B₆، ۱ میلی گرم ویتامین B₉، ۰/۰۱۵ میلی گرم ویتامین B₁₂، ۰/۲ میلی گرم ویتامین H₂ بود.

** هر کیلوگرم جیره حاوی ۱۲۰ میلی گرم منگنز، ۴۰ میلی گرم آهن، ۱۲۰ میلی گرم روی، ۱۶ میلی گرم مس، ۲ میلی گرم ید و ۰/۳ میلی گرم سلنیوم بود.

* Supplied per kg diet: vitamin A, 9000 IU; Vitamin D₃, 2000 IU; Vitamin E, 18 IU; Vitamin K₃, 2 mg; Vitamin B₁, 1.8 mg; riboflavin, 55 mg; niacin, 10 mg; pantothenic acid, 30 mg; pyridoxine, 3 mg; Vitamin B₉ 1mg; Vitamin B₁₂, 0.015 mg; Vitamin H₂, 0.2 mg.

** Supplied per kg diet: 120 mg manganese, 40 mg Iron, 120 mg Zinc, 16 mg Copper, 2 mg Iodine, 0.3 mg Selenium.

ارزیابی فراسنجه های کیفی اسپرم

تمامی خروس ها به مدت دو هفته قبل از شروع آزمایش به منظور کاهش استرس و عادت دهی با محیط با روش ماساژ شکمی برای اسپرم گیری عادت دهی شدند. در گرفتن نمونه منی دقت لازم بر جلوگیری از آلوده نشدن منی با مدفوع و ادراک به عمل آمد. نمونه های اسپرم تمامی خروس ها بلافاصله بعد از جمع آوری در داخل یونولیت حاوی آب ۳۷ درجه سانتی گراد برای جلوگیری از شوک دمایی و نور خورشید، به آزمایشگاه منتقل شدند. فراسنجه های مورد بررسی که شامل غلظت منی، تحرک کل، جنبایی پیشرونده، یکپارچگی عملکرد و سلامت غشا اسپرم، درصد اسپرم های نابهنجار، زنده ماندن اسپرم بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی حجم و غلظت منی

برای اندازه گیری حجم منی از لوله جمع آوری مدرج استفاده شد (Zamiriet al., 2010) برای تعیین غلظت اسپرم، به منظور رقیق سازی اسپرم از بلستویل تعدیل یافته با اسیدیت ۷/۴ و اسمولاریته ۳۱۰ میلی مول بر کیلوگرم (Amini et al., 2015) استفاده شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از نمونه برداشته شد و با دقت و به آرامی به فضای بین لام ثنوبار و لامل تزریق شد، سپس لام ثنوبار، شامل چهارخانه در گوشه و یک خانه در مرکز، شمارش و با استفاده از رابطه ۱ غلظت هر میلی لیتر منی محاسبه شد (Akhlaghi et al., 2014).

$$C = N \times 5 \times 200 \times 10^4$$

رابطه ۱

در این رابطه: C، غلظت اسپرم در هر میلی لیتر و N، مجموع تعداد اسپرم شمارش شده در پنج خانه است.

ارزیابی تحرک و جنبایی پیش رونده اسپرم

برای تعیین تحرک اسپرم به سمت جلو، نمونه‌های تازه مایع منی در محلول NaCl با نسبت ۲۰:۱ رقیق شدند، یک قطره از نمونه مایع منی رقیق شده روی یک لام قرار داده شد و با یک لام پوشانده شد. در نهایت، بررسی میکروسکوپی تحرک اسپرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $400\times$ مشاهده شد (Akhlaghi et al., 2014).

ارزیابی سلامت و یکپارچگی غشای پلاسمایی

برای ارزیابی فعالیت غشای پلاسمایی و یکپارچگی عملکردی غشای اسپرم، از آزمون تورم هایپواسموتیک استفاده شد. در این آزمایش، بخشی از مایع منی (۱۰ میکرولیتر) با محلول هایپواسموتیک (۱۰۰ میکرولیتر) حاوی ۵۷/۶ میلی‌مولار فروکتوز و ۱۹/۲ میلی‌مولار سترات سدیم انکوبه شد. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. پس از آن، ۲۰۰ سلول در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ کنتراست فاز مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم با دم متورم و پیچ‌خورده نشان دهنده سالم بودن غشای اسپرم است.

ارزیابی زنده ماندن و ناهنجاریهای اسپرم

بررسی زنده ماندن و ناهنجاریهای اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی اتوزین-نیگروزین تعیین شد. برای این ارزیابی، ۱۰ میکرولیتر مایع منی و ۱۰ میکرو لیتر از رنگ اتوزین-نیگروزین به طور کامل مخلوط شده، گسترش تهیه شد و اجازه داده شد تا لام در هوا خشک شود. سپس لام زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌های با رنگ صورتی و قرمز مرده و اسپرم‌هایی که بی‌رنگ بودند به عنوان اسپرم زنده در نظر گرفته شدند. اسپرم با سرهای جدا شده، سرهای انحرافی، سر بد شکل، دم خمیده، دم پیچ‌خورده، دم دوتایی و قطرات پروتوپلاسمی، غیر طبیعی در نظر گرفته شد (Tapeh et al., 2017). در این رنگ‌آمیزی سر اسپرم‌های مرده به دلیل نقص در غشاء، رنگ را جذب کرده و قرمز می‌شوند، در حالی که اسپرم‌های زنده، رنگ را به خود نمی‌گیرند (Anderasek et al., 2018).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل برای بررسی تأثیر سطوح جیره‌ای اسید آمینه سرین و مکمل کولین در جیره خروس‌های مسن مادرگوشتی و اثرات متقابل بین دو فاکتور جیره‌ای با روش GLM در نرم افزار آماری SAS (مدل ۹/۱) آنالیز شدند. پیش از انجام آنالیز، نرمال بودن توزیع داده‌های آزمایشی با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و رویه UNIVARIATE مورد آزمون قرار گرفت. مدل آماری به کار رفته عبارت است از؛

$$y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + e_{ijk} \quad \text{رابطه ۲}$$

در این رابطه: y_{ijk} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، C_i اثر سطوح کولین، T_j اثر سطوح سرین، $(CT)_{ij}$ اثر متقابل سرین و کولین و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است. نتایج در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شدند و میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف اسید آمینه ال سرین و مکمل کولین بر غلظت اسپرم خروس‌های مسن مادرگوشتی در جدول شماره ۲ گزارش شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش نشان داد که غلظت اسپرم در تیمارهای مختلف به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف سرین و کولین قرار گرفت ($P \leq 0.05$)، به طوری که غلظت اسپرم تیمارهای دریافت کننده مکمل ال-سرین و کولین در بالاترین سطوح استفاده، باعث افزایش معنی‌دار غلظت اسپرم از هفته چهارم تا هفته نهم نسبت به گروه کنترل شد ($P \leq 0.05$). در اثر متقابل تیمارهای آزمایشی بیشترین مقدار غلظت اسپرم در تیمار

حاوی ۰/۳ درصد سرین و ۴۷۰ میلی گرم کولین مشاهده شد که نشان دهنده تأثیر مثبت این ترکیبات بر اسپرماتوژنز و افزایش تولید اسپرم است. بالاترین مقدار غلظت اسپرم (۴/۰۸) میلیارد در میلی لیتر در تیمار حاوی ۰/۳ درصد سرین بود. از سوی دیگر، تیمار شاهد کمترین میزان غلظت اسپرم (۳/۴۶) میلیارد در میلی لیتر را در بین تمامی تیمارها داشت. که نشان می دهد فقدان این مکمل ها می تواند تولید و کیفیت اسپرم را محدود کند. همسو با این گزارش، در مطالعه ای استفاده از سطوح مختلف اسید آمینه ی غیر ضروری آسپارتات به صورت کپسول خوراکی در جیره خروس های مسن مادرگوشتی با افزایش سطوح مصرف، افزایش معنی داری را در غلظت اسپرم نشان داد (Ansari et al, 2016). گزارش شده است که استفاده از مکمل ال آرژنین یا افزودنی های مشتق شده از اسید آمینه ال آرژنین در جیره غذایی خروس های مسن، باعث افزایش غلظت اسپرم، بهبود جنبایی پیشرونده اسپرم، نفوذ اسپرم، افزایش زنده مانی، افزایش سطح تستوسترون در گردش خون و افزایش باروری و توانایی تولید مثلی در خروس های مولد مسن می شود (Abbaspour et al, 2019) که با یافته های حاصل از این تحقیق هم خوانی دارد.

جدول ۲- اثر اسید آمینه ال-سرین و مکمل کولین بر غلظت اسپرم (میلیارد در میلی لیتر) خروس های مسن مادرگوشتی

Table2- The effect of L-Serine Amino acid and choline supplementation on sperm concentration (billion per milliliter) of aged broiler roosters.

تیمارها Treatments	هفته سوم Third week	هفته چهارم Fourth week	هفته پنجم Five week	هفته ششم Six week	هفته هفتم Seventh week	هفته هشتم Eight week	هفته نهم Nine week
*S							
0	3.59 ^b	3.67 ^b	3.65 ^b	3.69 ^b	3.66 ^b	3.64 ^c	3.62 ^b
0.15	3.69 ^a	3.78 ^a	3.78 ^a	3.79 ^a	3.78 ^a	3.90 ^b	3.97 ^a
0.3	3.64 ^{ab}	3.77 ^a	3.82 ^a	3.81 ^a	3.82 ^a	4.01 ^a	4.04 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.022	0.019	0.017	0.022	0.012	0.026	0.045
**C							
0	3.61 ^b	3.74	3.71 ^b	3.75	3.72 ^b	3.79 ^b	3.82 ^b
470	3.67 ^a	3.74	3.80 ^a	3.78	3.80 ^a	3.91 ^a	3.94 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.018	0.015	0.014	0.018	0.015	0.022	0.037
C × S							
0 × 0	3.55	3.62 ^b	3.56 ^c	3.61 ^b	3.59	3.47 ^c	3.46 ^c
470 × 0	3.62	3.72 ^a	3.75 ^b	3.76 ^a	3.74	3.80 ^b	3.78 ^b
0 × 0.15	3.67	3.80 ^a	3.76 ^b	3.81 ^a	3.76	3.89 ^b	3.92 ^{ab}
470 × 0.15	3.70	3.75 ^a	3.79 ^{ab}	3.77 ^a	3.80	3.91 ^{ab}	4.03 ^a
0 × 0.3	3.60	3.79 ^a	3.79 ^{ab}	3.84 ^a	3.80	4.01 ^a	4.08 ^a
470 × 0.3	3.68	3.75 ^a	3.85 ^a	3.82 ^a	3.85	4.02 ^a	4.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.032	0.026	0.025	0.031	0.026	0.037	0.064
سطح احتمال معنی داری P-Value							
S	0.0192	0.0019	<0.0001	0.0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.0371	0.8791	0.0002	0.2289	0.0016	0.0011	0.0345
S×C	0.6673	0.0185	0.0111	0.0134	0.1062	0.0005	0.0206

*S: درصد سرین افزوده شده به جیره ، C** : کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری باشند ($P \leq 0.05$).

Percentage of serine added to the diet C^{**}: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

نتایج ارائه شده در جدول ۳ گواه این مطلب است که جیره‌هایی که حاوی سرین و کولین تفاوت معنی داری به لحاظ درصد جنبایی پیشرونده اسپرم با گروه فاقد این مکمل‌ها را نشان دادند ($P \leq 0.05$). اثرات متقابل دو ماده آزمایشی ال-سرین و مکمل کولین، افزایش درصد جنبایی پیش رونده اسپرم را در هفته‌های آزمایش نشان داد که این هم‌افزایی دو تیمار در هفته‌های چهارم و پنجم و هشتم و نهم معنی دار بود ($P \leq 0.05$). بالاترین درصد جنبایی (۵۰/۷۵) در هفته هشتم بود. کمترین درصد جنبایی پیشرونده مربوط به تیمار شاهد (۳۵/۰۰) بود. افزودن سرین و مکمل کولین به جیره سبب افزایش حدود ۱۵ درصدی در جنبایی اسپرم پرندگان مسن شد. موافق با این نتایج، افزودن اسید آمینه سرین به منی خروس به عنوان نگهدارنده و رقیق کننده منی باعث افزایش کیفیت اسپرم و باروری شد (Chankitisakul et al, 2022). حرکت اسپرم نسبتاً شدید و تند است و برای حفظ تحرک نیاز به تولید آدنوزین تری فسفات زیادی دارد، تعداد زیاد میتوکندری موجود در قطعه میانی اسپرم، این میزان انرژی را فراهم می‌آورد (Guthrie et al, 2008). بنابراین با افزایش تعداد میتوکندری، انرژی لازم جهت حرکت اسپرم فراهم می‌گردد و با توجه به وجود سرین و کولین در ساختار غشای سلول و میتوکندری، بالارفتن جنبایی پیش رونده و تحرک اسپرم در نتیجه‌ی افزودن سرین و کولین به جیره در مطالعه حال حاضر منطقی به نظر می‌رسد.

جدول ۳- اثر اسید آمینه ال-سرین و مکمل کولین بر جنبایی پیشرونده اسپرم (درصد) خروسهای مسن مادر گوشتی

Table3- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on forward motility sperm (percentage) of old broiler roosters

تیمارها Treatments	هفته سوم Third week	هفته چهارم Fourth week	هفته پنجم Five week	هفته ششم Six week	هفته هفتم Seventh week	هفته هشتم Eight week	هفته نهم Nine week
S [*]							
0	42.87	39.50	40.25 ^b	40.87 ^b	39.62 ^b	38.75 ^b	39.37 ^b
0.15	41.12	40.25	42.12 ^{ab}	42.12 ^b	45.50 ^a	48.25 ^a	48.75 ^a
0.3	41.25	41.75	44.50 ^a	45.62 ^a	46.25 ^a	49.12 ^a	49.87 ^a
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.754	0.709	0.888	1.109	1.258	0.823	0.959
C ^{**}							
0	42.33	39.75	42.33	42.25	42.41	44.25 ^b	45.00
470	41.17	41.25	42.25	43.50	45.17	46.50 ^a	47.00
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.616	0.579	0.725	0.905	1.027	0.672	0.783
C × S							
0 × 0	44.50	37.00 ^b	37.50 ^c	40.00	36.25	35.00 ^d	35.00 ^c
47 × 0	41.25	42.00 ^a	43.00 ^{ab}	41.75	43.00	42.50 ^c	43.75 ^b
0 × 0.15	41.25	40.50 ^a	43.00 ^{ab}	41.75	44.75	47.00 ^b	50.00 ^a
47 × 0.15	41.00	40.00 ^a	41.25 ^b	42.50	46.25	49.50 ^{ab}	47.50 ^{ab}
0 × 0.3	41.25	41.75 ^a	46.50 ^a	45.00	46.25	50.75 ^a	50.00 ^a
47 × 0.3	41.25	41.75 ^a	42.50 ^{ab}	46.25	46.25	47.50 ^{ab}	49.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.067	1.003	1.257	1.569	1.778	1.165	1.356

SEM							
سطح احتمال معنی دار							
P-Value							
S	0.2154	0.1013	0.0118	0.0197	0.0028	<0.0001	<0.0001
C	0.1973	0.0837	0.9362	0.3421	0.0744	0.0295	0.0877
S×C	0.2639	0.0245	0.0036	0.9506	0.1662	0.0009	0.0014

S*: درصد سرین افزوده شده به جیره ، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C*: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

در نتایج بررسی تحرک کل اسپرم در جدول ۴، ال سرین و مکمل کولین به کار برده شده در جیره نقش مهمی در افزایش معنی داری تحرک کل نسبت به تیمار فاقد سرین و کولین نشان دادند ($P \leq 0.05$). اثر متقابل سرین و کولین باعث افزایش معنی داری در تحرک اسپرم شد که این افزایش از هفته پنجم تا هفته نهم بود. بالاترین درصد تحرک کل اسپرم (۸۸/۷۵) مربوط به تیمار حاوی ۰/۱۵ درصد سرین و ۴۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم کولین در هفته هشتم و نهم بود. کمترین درصد تحرک اسپرم مربوط به جیره شاهد بود (۷۰/۰۰) که اختلاف معنی داری با اثر متقابل دو تیمار داشت ($P \leq 0.05$). هم افزایی دو تیمار سبب افزایش حدود ۱۹ درصد در تحرک اسپرم را نشان داد. طول دوره اسپرماتوژنز در خروس تقریباً ۱۵ روز می باشد (Durape, 2007). عدم تأثیر معنی دار تیمارهای آزمایشی بر این فراسنجه در دو هفته اول آزمایش به دلیل عدم تکمیل یک دوره کامل اسپرماتوژنز می باشد. در جدول ۵ که تحلیل داده های مربوط به درصد زنده مانی اسپرم است نشان داد که تیمارهای حاوی اسید آمینه ال سرین و مکمل کولین تأثیر معنی داری بر این شاخص دارند ($P \leq 0.05$). در اثرات متقابل دو تیمار آزمایشی، بهبود زنده مانی اسپرم در تیمارهای دریافت کننده ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین همراه با ۴۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم مکمل کولین مشاهده گردید. بالاترین درصد زنده مانی در اثر متقابل سرین و کولین (۸۸/۷۵) در هفته هشتم و نهم مشاهده شد، که اختلاف معنی داری با گروه فاقد سرین و کولین داشت ($P \leq 0.05$). پایین ترین درصد اسپرمهای زنده مربوط به تیمار شاهد (۶۸/۲۵) مشاهده شد. مکمل سرین و کولین سبب افزایش تقریبی ۲۱ درصدی در زنده مانی اسپرم شد. محصولات جانبی طبیعی حاصل از متابولیسم اکسیداتیو، رادیکال های آزاد را تشکیل می دهند که برای اسپرم بسیار سمی هستند و باعث کاهش درصد زنده مانی اسپرم می شوند (Wishart, 1984). پراکسیداسیون لیپید با کاهش فسفولیپیدهای غشایی همراه است که زنده مانی و عملکرد اسپرم را به خطر می اندازد (Jones and Mann, 1976; Fujihara and Hawarth, 1978; Aitken, 1994; Kelso et al, 1996). در مطالعه ای که از مکمل های سیستمین و ارگوتامین و اسید آمینه ال سرین به عنوان رقیق کننده منی جهت انجماد استفاده شده بود مشخص گردید که افزودن سرین به منی باعث کاهش پراکسیداسیون و افزایش تحرک، جنبایی پیشرونده، زنده مانی اسپرم شد (Tananurak et al, 2020) که یافته های این مطالعه با آن مطابقت دارد. نشان داده شده است که فسفولیپیدهای متصل به غشاء، به ویژه فسفاتیدیل کولین، در طول ذخیره سازی در شرایط آزمایشگاهی اسپرم طیور از بین می روند (Blesbois et al., 1999; Douard et al., 2000). پراکسیداسیون لیپید و تجزیه آنزیمی مکانیسمی است که باعث از دست دادن شدید فسفولیپیدهای غشای اسپرم در طول ذخیره سازی مایع منی و کاهش زنده مانی اسپرم می شود (Douard et al., 2005). در مطالعه ای افزودن مکمل کولین در نگهدارنده مایع منی، به جلوگیری از بین رفتن فسفولیپیدهای غشایی اسپرم کمک کرد و همچنین باعث فعالیت فسفولیپازهای درون زایی شد که مولکول های آسیب دیده ناشی از استرس اکسیداتیو سلولی را ترمیم یا باعث تحلیل غشاء پس از پراکسیداسیون می شود که در نهایت منجر به افزایش زنده مانی و سلامت غشای اسپرم می شود (Long and Conn, 2012)، که نتایج این آزمایش موید آن می باشد.

از آنجایی که ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم به دلیل خاصیت به شدت غیر اشباع لیپیدهای اسپرم و آسیب پذیری این ترکیبات در برابر آسیب های پروکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن پایین است و این آسیب پذیری بالا دلیل اصلی ناباروری جنس نر محسوب می شود (Aitken, 1995) از این رو، وجود سیستم های آنتی اکسیدانی بی نقص در اسپرم و پلاسمای منی پرندگان برای محافظت گامت ها در برابر چنین اثرات زیانباری، حائز اهمیت می باشد (Surai et al., 2001) کمبود مولفه های کلیدی سیستم آنتی اکسیدانی را می توان به عنوان دلیلی بر کاهش باروری تحت برخی از شرایط در نظر گرفت، برای مثال در انتهای چرخه تولید مثلی خروس، بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز در منی بیش از ۱۰ برابر کاهش می یابد (Kelso et al., 1997)، بنابراین استفاده از مکمل هایی مثل عنصر سلنیوم (جز ضروری گلوتاتیون پراکسیداز) در جیره خروس ها، فعالیت این آنزیم را در بیضه ها، اسپرم ها و پلاسمای منی افزایش، و حساسیت اسپرم به پراکسیداسیون لیپید را کاهش داد. (Surai et al., 1998) مکمل ال سیرین با توجه به ویژگی های آنتی اکسیدانی مرتبط با کاهش واکنش های اکسیداتیو از طریق کنترل بیان ژن های مرتبط با سنتز گلوتاتیون باعث افزایش غلظت گلوتاتیون می شود (Zhou et al., 2018; Sim et al., 2015). همچنین سیرین سبب کاهش مقدار مالون دی آلدئید، و افزایش سوپراکسیداز و آنزیم کاتالاز (Zhou et al., 2018) می شود در نتیجه مصرف اسید آمینه ال سیرین به میزان قابل توجهی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز افزایش می یابد و با تکثیر و تمایز اسپرم باعث افزایش باروری می شود (Wang et al., 2016). پس می توان نتیجه گرفت، افزودن مکمل هایی چون اسید آمینه ال سیرین با خاصیت آنتی اکسیدانی به جیره خروس های مادر مسن برای جلوگیری از این کاهش در انتهای چرخه تولید مثلی ضروری به نظر می رسد.

جدول ۴- اثر اسید آمینه ال-سیرین و مکمل کولین بر تحرک کل (درصد) اسپرم خروس های مسن مادر گوشتی

Table 4- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on sperm total motility (percentage) of old broiler roosters

تیماها Treatments	هفته سوم Third week	هفته چهارم Fourth week	هفته پنجم Five week	هفته ششم Six week	هفته هفتم Seventh week	هفته هشتم Eight week	هفته نهم Nine week
*S							
0	76.62	76.25	76.125 ^b	75.37 ^b	73.75 ^b	75.37 ^b	77.00 ^b
0.15	76.25	78.25	81.37 ^a	81.87 ^a	83.75 ^a	86.12 ^a	88.37 ^a
0.3	76.37	78.25	81.88 ^a	83.75 ^a	85.00 ^a	88.12 ^a	88.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.035	0.970	0.958	0.988	1.178	0.890	0.767
SEM							
**C							
0	75.25	76.75	78.67	79.17	78.33 ^b	80.67 ^b	82.17 ^b
470	77.58	78.41	80.91	81.50	83.33 ^a	85.75 ^a	86.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین	0.845	0.792	0.782	0.806	0.962	0.727	0.626
SEM							
C × S							
0 × 0	75.00	75.00	71.25 ^b	71.25 ^c	67.50 ^c	68.25 ^c	70.00 ^c
470 × 0	78.25	77.50	81.00 ^a	79.50 ^b	80.00 ^b	82.50 ^b	84.00 ^b
0 × 0.15	75.00	77.75	82.25 ^a	81.25 ^{ab}	83.75 ^{ab}	85.00 ^{ab}	88.00 ^a
470 × 0.15	77.50	78.75	80.50 ^a	82.50 ^{ab}	83.75 ^{ab}	87.25 ^a	88.75 ^a
0 × 0.3	75.75	77.50	82.50 ^a	85.00 ^a	83.75 ^{ab}	88.75 ^a	88.50 ^a
470 × 0.3	77.00	79.00	81.25 ^a	82.50 ^{ab}	86.25 ^a	87.50 ^a	87.50 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.464	1.371	1.355	1.397	1.677	1.260	1.084
SEM							

سطح احتمال معنی دار							
P-Value							
S	0.9667	0.2682	0.0007	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.0668	0.1541	0.0570	0.0557	0.0017	0.0001	<0.0001
S×C	0.7907	0.8576	0.0006	0.0040	0.0035	<0.0001	<0.0001

S*: درصد سرین افزوده شده به جیره ، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C**: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

جدول ۵- اثر اسیدآمینه ال-سرین و مکمل کولین بر زنده ماندن اسپرم (درصد) خروسهای مسن مادر گوشتی

Table5- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on sperm viability (percentage) of old broiler roosters

تیمارها	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم	هفته نهم
Treatments	Third week	Fourth week	Five week	Six week	Seventh week	Eight week	Nine week
S*							
0	73.12	76.50	74.37 ^b	75.25 ^b	76.50 ^b	74.75 ^c	74.87 ^b
0.15	74.62	76.62	80.37 ^a	81.50 ^a	82.50 ^a	83.37 ^b	86.12 ^a
0.3	74.37	78.62	82.50 ^a	82.50 ^a	83.12 ^a	88.62 ^a	87.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.291	0.901	0.937	0.740	0.902	0.799	0.853
SEM							
C**							
0	72.75	76.41	78.92	77.67 ^b	79.17 ^b	80.58 ^b	80.83 ^b
470	75.33	78.08	79.25	81.83 ^a	82.25 ^a	83.92 ^a	85.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.054	0.735	0.765	0.604	0.737	0.652	0.697
SEM							
C × S							
0 × 0	71.25	74.75	71.75 ^c	70.50 ^b	71.25 ^b	70.25 ^d	68.25 ^c
470 × 0	75.00	78.25	77.00 ^b	80.00 ^a	81.75 ^a	79.25 ^c	81.50 ^b
0 × 0.15	73.25	76.25	82.50 ^a	80.00 ^a	82.50 ^a	83.00 ^b	85.50 ^a
470 × 0.15	76.00	77.00	78.25 ^{ab}	83.00 ^a	82.50 ^a	83.75 ^b	86.75 ^a
0 × 0.3	73.75	78.25	82.50 ^a	82.50 ^a	83.75 ^a	88.50 ^a	88.75 ^a
470 × 0.3	75.00	79.00	82.50 ^a	82.50 ^a	82.50 ^a	88.75 ^a	86.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.827	1.274	1.325	1.047	1.276	1.130	1.208
SEM							
سطح احتمال معنی دار							
P-Value							
S	0.6845	0.2021	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	0.1004	0.1267	0.7631	0.0001	0.0084	0.0020	0.0005
S×C	0.7912	0.4752	0.0077	0.0008	0.0004	0.0016	<0.0001

S*: درصد سرین افزوده شده به جیره ، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C**: mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

نتایج حاصل از بررسی سلامت غشای اسپرم در جدول ۶ نشان داد که اثر متقابل سرین و کولین سبب افزایش بهبود یکپارچگی و سلامت غشای اسپرم شد و نسبت به گروه شاهد روند افزایشی داشت که این افزایش درصد سلامت غشای اسپرم از هفته ششم تا هفته نهم معنی‌دار شد ($P \leq 0.05$). بالاترین درصد سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی ۰/۳ درصد سرین (۸۸/۰۰) در هفته‌ی نهم و پایین‌ترین درصد سلامت غشا مربوط به گروه فاقد سرین و کولین (۶۸/۷۵) بود. هم‌افزایی دو تیمار سبب افزایش ۱۲ درصدی در سلامت غشای اسپرم پرندگان شد. در تحقیق لانگ و کان (Long and Conn, 2012) که با استفاده از مکمل کولین بر عملکرد منی ذخیره شده اردک از ۴ تا ۲۴ ساعت انجام شد، استفاده از ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر مکمل فسفاتیدیل کولین، زنده‌مانی، سلامت غشای اسپرم و تحرک اسپرم ذخیره شده را نسبت به گروه شاهد بهبود بخشید که با نتایج این آزمایش و اثرات مثبت مکمل کولین در جیره همخوانی دارد. پراکسیداسیون غشای اسپرم یکی از عوامل بسیار مهم در کاهش کیفیت اسپرم می‌باشد (Guthrie et al., 2008). لیپیدهای غشای سلول اسپرم نقش اساسی در قابلیت لقاح اسپرم دارند (Masoudi et al., 2016). یکی از دلایل اصلی ناباروری در خروس‌ها، محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع چندانگانه در اسپرم‌ها است که آنها را مستعد پراکسیداسیون لیپید می‌کند (Asl et al., 2018). اسپرم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایینی دارد؛ بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های پلاسمای منی با مهار گونه‌های فعال اکسیژن از اسپرم محافظت می‌کنند (Zhao et al., 2011). اسپرم پرندگان با محتوای بالای اسیدهای چرب چند غیراشباع زنجیره بلند که برای حفظ تحرک اسپرم ضروری هستند، مستعد پراکسیداسیون لیپیدی هستند. گونه‌های واکنشی تولید شده بر اثر پراکسیداسیون لیپیدی ممکن است به عملکرد غشای اسپرم و تحرک آنها آسیب رسانده و پتانسیل باروری را در خروس‌های مسن کاهش دهند. بنابراین، دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش کلیدی در حفظ کیفیت مایع منی دارد (Surai et al., 2006). سلامت غشا یکی از مهم‌ترین فاکتورها در قابلیت باروری اسپرم است، زیرا غشای اسپرم، به دلیل شکل طویل باریک و دنباله‌دار در اسپرماتوزوئیدهای پرندگان و افزایش سطح به حجم آنها نسبت به اسپرم پستانداران افزایش سطح زیادی دارد بنابراین نسبت غشا پلاسمایی اسپرماتوزوئید پرندگان بیشتر است و سلامت و انعطاف‌پذیری و تحرک سلول اسپرم که ارتباط مستقیمی با غشای سلول دارد نقش مهمی در بالا رفتن کیفیت منی و تسهیل فرایندهای باروری دارد (Steele et al., 1994). اسپرم‌ها سلول‌هایی به شدت قطبی، شامل نواحی سر، قطعه میانی و دم با عملکردهای مجزا می‌باشند. فسفولیپیدهایی که غشای پلاسمایی و غشاهای آکروزومی ناحیه سر اسپرم را تشکیل می‌دهند، در فعالیت‌های دینامیکی مختلف مربوط به فرایند امتزاج غشاها (که نقش تعیین‌کننده‌ای در واکنش آکروزومی و آمیزش اسپرم و تخم دارد) نقش دارند. واکنش آکروزومی هنگامی روی می‌دهد که بین اسپرم و تخمک تماس حاصل گردد. اجزای مولکولی پوشش محافظ تخم (لایه پری ویتیلین در پرندگان) به‌طور اختصاصی با گیرنده‌های پروتئینی ویژه موجود در غشا پلاسمایی سر اسپرم اتصال برقرار می‌کنند (Ashizawa et al., 2006)، بنابراین، بررسی یک روش زیست سازگار مانند یک افزودنی خوراکی با قدرت افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی می‌تواند به طور قابل توجهی از باروری خروس‌ها محافظت کند (Nemati et al., 2022). مشخص شده است که اسید آمینه سرین در طول نگهداری با دولا‌یه‌های فسفولیپیدی غشا تعامل دارند و باعث تثبیت غشای سلولی می‌شوند، همچنین غلظت املاح سمی را کاهش داده و سلول‌ها را در برابر اثرات دنا‌توره‌کننده هاپراسمولالیتیه در طول انجماد منی محافظت می‌کند (Partyka and Nizański, 2021). در مطالعه‌ای، نشان داده شد که افزودن سرین به پلاسمای منی خروس بعنوان نگهدارنده، سبب حفظ یکپارچگی DNA در منی منجمد شده، یکپارچگی غشاء و آکروزوم، پتانسیل غشاء میتوکندری، کاهش شاخص مالون دی‌آلدهید، افزایش قدرت اسپرم و در نتیجه تمام شاخص‌های کیفیت اسپرم در شرایط آزمایشگاهی و در نهایت در توانایی لقاح اسپرم منجمد-یخ‌گشایی شده مؤثر بود (Santiago-Moreno et al., 2021). افزایش درصد سلامت غشای اسپرم و زنده‌مانی می‌تواند سبب افزایش سرعت در حرکت و افزایش زنده‌مانی اسپرم در داخل اویدکت تا رسیدن به محل لقاح

می‌شود (Cerolini, et al., 2006). از آنجایی که فسفاتیدیل سرین به صورت نسبتی از فسفولیپید تام اسپرم همبستگی مثبتی با قابلیت باروری دارد (Cerolini et al., 1997) و همچنین فسفاتیدیل سرین اسپرم ۳۳ درصد وزن تام اسیدهای چرب را دارا می‌باشد که به مراتب بیشتر از مقدار آن در دیگر انواع فسفولیپیدها است (Surai et al., 1998). در نتیجه افزایش معنی‌دار سلامت غشای اسپرم در تیمارهای حاوی اسید آمینه سرین و مکمل کولین نسبت به گروه شاهد منطقی به نظر می‌رسد.

جدول ۶- اثر اسید آمینه ال-سرین و مکمل کولین بر سلامت غشاء اسپرم (درصد) خروسهای مسن مادر گوشتی

Table 6- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on sperm membrane health (percentage) of old broiler breeder roosters

تیمارها Treatments	هفته سوم Third week	هفته چهارم Fourth week	هفته پنجم Five week	هفته ششم Six week	هفته هفتم Seventh week	هفته هشتم Eight week	هفته نهم Nine week
*S							
0	77.62	75.87 ^b	75.00 ^b	75.62 ^b	76.88 ^b	76.00 ^b	74.37 ^b
0.15	76.25	77.50 ^{ab}	81.37 ^a	82.12 ^a	83.13 ^a	86.75 ^a	86.25 ^a
0.3	76.00	79.37 ^a	81.87 ^a	82.75 ^a	82.50 ^a	86.50 ^a	87.75 ^a
انحراف استاندارد میانگین	0.929	0.951	0.892	0.848	0.945	0.722	0.974
SEM							
**C							
0	75.75	76.67	78.67	78.08 ^b	79.33 ^b	81.33 ^b	80.58 ^b
470	77.50	78.50	80.17	82.25 ^a	82.33 ^a	84.83 ^a	85.00 ^a
انحراف استاندارد میانگین	0.758	0.777	0.728	0.692	0.771	0.589	0.796
SEM							
C × S							
0 × 0	76.50	73.50	72.50	70.00 ^b	71.75 ^b	71.00 ^c	68.75 ^c
470 × 0	78.75	78.25	77.50	81.25 ^a	82.00 ^a	81.00 ^b	80.00 ^b
0 × 0.15	75.00	77.50	81.00	81.75 ^a	83.75 ^a	86.75 ^a	85.00 ^a
470 × 0.15	77.50	77.50	81.75	82.50 ^a	82.50 ^a	86.75 ^a	87.50 ^a
0 × 0.3	75.75	79.00	82.50	82.50 ^a	82.50 ^a	86.25 ^a	88.00 ^a
470 × 0.3	76.25	79.75	81.25	83.00 ^a	82.50 ^a	86.75 ^a	87.50 ^a
انحراف استاندارد میانگین	1.313	1.364	1.261	1.199	1.336	1.021	1.378
SEM							
سطح احتمال معنی‌دار P-Value							
S	0.4290	0.0565	<0.0001	<0.0001	0.0003	<0.0001	<0.0001
C	0.1201	0.1127	0.1624	0.0005	0.0132	0.0005	0.0010
S×C	0.7134	0.1940	0.0646	0.0003	0.0007	0.0001	0.0013

S*: درصد سرین افزوده شده به جیره، C**: کولین افزوده شده به جیره، میلی‌گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet, C** mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

بررسی میزان درصد ناهنجاری‌های اسپرم جدول ۷ نشان داد که تیمارهای حاوی سرین تأثیر معنی‌داری بر این شاخص دارند ($P \leq 0.05$)، به طوری‌که افزودن ال‌سرین در دو سطح ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد، باعث کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار شد که این کاهش در هفته پنجم و هفتم معنی‌دار شد. کمترین درصد اسپرم ناهنجار (۱۳/۶۲) در تیمار حاوی ۰/۳ درصد

سرین مشاهده شد که تفاوت معنی داری با جیره فاقد سرین نشان داد ($P \leq 0.05$). اثر مکمل کولین و اثر متقابل اسید آمینه سرین و کولین بر درصد اسپرم های ناهنجار معنی دار نبود ($P > 0.05$). این نتایج با گزارش لانگ و همکاران (Long and Conn, 2012) که برای ذخیره سازی منی اردک از مکمل کولین فسفات استفاده و کاهش درصد ناهنجاری های آکروزم سر اسپرم را گزارش کرده بودند، مطابقت دارد. در تحقیقی دیگر از اسید آمینه آل سرین به عنوان رقیق کننده، جهت ذخیره سازی اسپرم خروس در دمای ۵ درجه سانتی گراد در طول ۱۲۰ ساعت استفاده شد و افزایش تحرک پیشرونده، زنده مانی و عملکرد میتوکندریایی و کاهش درصد اسپرم های ناهنجار در گروه های حاوی رقیق کننده سرین نسبت به گروه شاهد، گزارش شد (Kheawkanha et al, 2023) که همسو با نتایج این تحقیق می باشد. با توجه به اینکه تحرک اسپرم و کم بودن درصد اسپرم های ناهنجار معیاری برای کیفیت و زنده مانی اسپرم در ارتباط با باروری در طیور است (Froman et al., 2002; Bowling et al., 2003) بنابراین میتوان نتیجه گرفت که کاهش درصد اسپرم های ناهنجار در تیمارهای حاوی اسید آمینه سرین و مکمل کولین باعث افزایش کیفیت منی و در نهایت بهبود کیفیت باروری در این آزمایش شد.

جدول ۷- اثر اسید آمینه آل-سرین و مکمل کولین بر اسپرم های ناهنجار (درصد) خروسهای مسن مادر گوشتی

Table 7- The effect of L-Serine amino acid and choline supplementation on abnormal sperm (percentage) of old broiler roosters

تیمارها Treatments	هفته سوم Third week	هفته چهارم Fourth week	هفته پنجم Five week	هفته ششم Six week	هفته هفتم Seventh week	هفته هشتم Eight week	هفته نهم Nine week
*S							
0	14.75	14.62	14.62 ^a	14.25	14.37 ^a	14.37	14.12
0.15	14.50	14.50	14.25 ^{ab}	14.12	14.25 ^{ab}	13.75	13.87
0.3	14.50	14.37	13.75 ^b	14.37	13.62 ^b	13.87	13.87
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.186	0.177	0.200	0.195	0.212	0.257	0.253
**C							
۰	14.50	14.58	14.42	14.25	14.08	14.00	14.17
470	14.67	14.42	14.00	14.25	14.08	14.00	13.75
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.152	0.144	0.163	0.159	0.173	0.210	0.207
C × S							
0 × 0	14.75	15.00	14.75	14.50	14.25	14.50	14.50
470 × 0	14.75	14.25	14.50	14.00	14.50	14.25	13.75
0 × 0.15	14.25	14.50	14.50	14.00	14.50	13.50	14.00
470 × 0.15	14.75	14.50	14.00	14.25	14.00	14.00	13.75
0 × 0.3	14.50	14.25	14.00	14.25	13.50	14.00	14.00
470 × 0.3	14.50	14.50	13.50	14.50	13.75	13.75	13.75
انحراف استاندارد میانگین SEM	0.263	0.250	0.282	0.276	0.300	0.363	0.358
سطح احتمال معنی دار P-Value							
S	0.5594	0.6147	0.0210	0.6703	0.0492	0.2183	0.7272
C	0.4486	0.4249	0.0877	1.0000	1.0000	1.0000	0.1716
S×C	0.5594	0.1435	0.8885	0.3165	0.3743	0.5047	0.7272

*S: درصد سرین افزوده شده به جیره ، **C: کولین افزوده شده به جیره، میلی گرم در کیلوگرم.

در هر ستون میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P \leq 0.05$).

S*: Percentage of serine added to the diet C** mg in kg of choline added to the diet.

In each columns mean with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از اسید آمینه آل سرین و مکمل کولین در جیره می تواند باعث افزایش معنی دار غلظت اسپرم، سلامت غشای اسپرم، تحرک کل اسپرم، زنده ماندن اسپرم، تحرک پیشرونده اسپرم و کاهش درصد ناهنجاری های اسپرم در بیشتر هفته های آزمایش بود که نشان دهنده هم افزایی این دو ترکیب در بهبود کیفیت اسپرم در خروس های مسن مولد گوشتی شد و این امر می تواند باعث افزایش باروری و بهره وری هر چه بیشتر از خروس های مسن مادر گوشتی در صنعت طیور شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت فراهم نمودن امکانات پژوهش، تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Aitken, R. J. (1994). A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 6(1), 19-23. <https://doi.org/10.1071/RD9940019>
2. Aitken, R.J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, fertility and development*, 7(4), 659-668. <https://doi.org/10.1071/RD9950659>
3. Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z. A., Zhandi, M., Deldar, H., & Peebles, E. D. (2014). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Poultry Science*, 93(5), 1236-1244. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03617>
4. Amini, M. R., Kohram, H., Zare Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H., & Nabi, M. M. (2015). The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell and tissue banking*, 16, 587-592. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9506-9>
5. Andraszek, K., Banaszewska, D., & Biesiada-Drzazga, B. (2018). The use of two staining methods for identification of spermatozoon structure in roosters. *Poultry science*, 97(7), 2575-2581. <https://doi.org/10.3382/ps/pey056>
6. Ansari, M., Zhandi, M., Kohram, H., Zaghari, M. and Sadeghi, M. (2016). The effect of D-aspartic acid on sperm quality of broiler breeder roosters. *Iranian Journal of animal Science*, 47(1), 165-174. <https://doi.org/10.22059/ijas.2016.61669>
7. Ashizawa, K., Wishart, G. J., Katayama, S., Takano, D., Ranasinghe, A. R. A. H., Narumi, K., & Tsuzuki, Y. (2006). Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or-type 2A. *Reproduction*, 131(6), 1017-1024. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01069>
8. Asl, R. S., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Torshizi, M. A. K., & Shahverdi, A. (2018). Dietary fish oil supplemented with vitamin E improves quality indicators of rooster cold-stored semen through reducing lipid peroxidation. *Cryobiology*, 84, 15-19. DOI: [10.1016/j.cryobiol.2018.08.008](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.008)

9. Blesbois, E., Douard, V., Germain, M., Boniface, P., & Pellet, F. (2004). Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology*, 61(2-3), 537-549. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00207-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00207-3)
10. Blesbois, E., Grasseau, I., & Hermier, D. (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 C. *Theriogenology*, 52(2), 325-334. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00132-6)
11. Bowling, E. R., Froman, D. P., Davis, A. J., & Wilson, J. L. (2003). Attributes of broiler breeder males characterized by low and high sperm mobility. *Poultry science*, 82(11), 1796-1801. <https://doi.org/10.1093/ps/82.11.1796>
12. Cerolini, S., Pizzi, F., Gliozzi, T., Maldjian, A., Zaniboni, L. and Parodi, L. (2003). Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *Worlds Poultry Science Journal*, 59: 65–75. <https://doi.org/10.1079/WPS20030003>
13. Cerolini, S., Zaniboni, L., Maldjian, A., & Gliozzi, T. (2006). Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*, 66(4), 877-886. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.022>
14. Chankitisakul, V., Boonkum, W., Kaewkanha, T., Pimprasert, M., Ratchamak, R., Authaida, S., & Thananurak, P. (2022). Fertilizing ability and survivability of rooster sperm diluted with a novel semen extender supplemented with serine for practical use on smallholder farms. *Poultry Science*, 101(12), 102188. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102188>
15. Dale, H. H., & Dudley, H. W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *The Journal of physiology*, 68(2), 97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002598>
16. Darin-Bennett, A., Poulos, A., & White, I. G. (1974). The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *Reproduction*, 41(2), 471-474. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410471>
17. Del Vesco, A. P., Gasparino, E., Neto, A. R. O., Rossi, R. M., Soares, M. A. M., & da Silva, S. C. C. (2013). Effect of methionine supplementation on mitochondrial genes expression in the breast muscle and liver of broilers. *Livestock Science*, 151(2-3), 284-291. Doi: [10.1016/j.livsci.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.11.005)
18. Do Nascimento, R. C., Souza, C. M. M., Bastos, T. S., Kaelle, G. C. B., de Oliveira, S. G., & Félix, A. P. (2022). Effects of an herbal source of choline on diet digestibility and palatability, blood lipid profile, liver morphology, and cardiac function in dogs. *Animals*, 12(19), 2658. <https://doi.org/10.3390/ani12192658>
19. Douard, V., Hermier, D., & Blesbois, E. (2000). Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biology of reproduction*, 63(5), 1450-1456. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1450>
20. Douard, V., Hermier, D., Labbe, C., Magistrini, M., & Blesbois, E. (2005). Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during in vitro storage. *Theriogenology*, 63(1), 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.020>
21. Durape, N. M. (2007). Phytochemicals improve semen quality and fertility. *Mortality*, 3, 2-4b. <https://doi.org/10.22059/jap.2019.280344.623396>
22. Etches, R. J. 1996. Reproduction in poultry. Centre for Agriculture and Biosciences International Wallingford, UK. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093225492>.
23. Fouad, A. M., El-Senousey, H. K., Ruan, D., Xia, W., Chen, W., Wang, S., & Zheng, C. (2020). Nutritional modulation of fertility in male poultry. *Poultry science*, 99(11), 5637-5646. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.083>

24. Froman, D. P., Pizzari, T., Feltmann, A. J., Castillo-Juarez, H., & Birkhead, T. R. (2002). Sperm mobility: mechanisms of fertilizing efficiency, genetic variation and phenotypic relationship with male status in the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1491), 607-612. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1925>
25. FUJIHARA, N., & Howarth Jr, B. (1978). Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. *Poultry science*, 57(6), 1766-1768. <https://doi.org/10.3382/ps.0571766>
26. Guthrie, H. D., Welch, G. R., & Long, J. A. (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology*, 70(8), 1209-1215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.017>
27. Hunter, T. (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1602), 2513-2516. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0013>
28. Jones, R., & Mann, T. R. R. (1976). Lipid peroxides in spermatozoa; formation, rôle of plasmalogen, and physiological significance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 193(1113), 317-333. <https://doi.org/10.1098/rspb.1976.0050>
29. Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. C., & Speake, B. K. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Reproduction*, 106(2), 201-206. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060201>
30. Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. H., and Speake, B. K. (1997). The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(1), 65-69. Doi: [10.1016/s0305-0491\(97\)00024-2](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(97)00024-2)
31. Kheawkanha, T., Chankitisakul, V., Thananurak, P., Pimprasert, M., Boonkum, W., & Vongpralub, T. (2023). Solid storage supplemented with serine of rooster semen enhances higher sperm quality and fertility potential during storage at 5 C for up to 120 h. *Poultry Science*, 102(6), 102648. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102648>
32. Long, J. A., & Conn, T. L. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. *Poultry science*, 91(8), 1990-1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>
33. Masoudi, R., Sharafi, M., Shahneh, A. Z., Towhidi, A., Kohram, H., Zhandi, M., ... & Shahverdi, A. (2016). Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin-and egg yolk-based extenders. *Theriogenology*, 86(6), 1583-1588. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2016.05.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.018)
34. Metcalf, E. S., Dideon, B. A., Blehr, R., Schlimgen, T., Bertrand, W., Varner, D. D., & Hausman, M. S. (2008). Effects of DMSO and L-Ergothioneine on post-thaw semen parameters in stallions: preliminary results. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 332-333. DOI:10.9775/kvfd.2009.1646
35. Nemati, Z., Dehgani, P., Besharati, M., & Amirdahri, S. (2022). Dietary carob fruit (*Ceratonia siliqua* L.) supplementation improves spermatogenesis, semen quality and embryonic death via antioxidant effect in aging broiler breeder roosters. *Animal Reproduction Science*, 239, 106967. Doi: [10.1016/j.anireprosci.2022.106967](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106967).
36. Noirault, J., & Brillard, J. P. (1999). Effects of frequency of semen collection on quantitative and qualitative characteristics of semen in turkey breeder males. *Poultry science*, 78(7), 1034-1039. <https://doi.org/10.1093/ps/78.7.1034>

37. Partyka, A., & Niżański, W. (2021). Supplementation of avian semen extenders with antioxidants to improve semen quality—Is it an effective strategy. *Antioxidants*, 10(12), 1927. [Doi: 10.3390/antiox10121927](https://doi.org/10.3390/antiox10121927).
38. Romero-Sanchez, H., Plumstead, P. W., Leksrisompong, N., Brannan, K. E., & Brake, J. (2008). Feeding broiler breeder males. 4. Deficient feed allocation reduces fertility and broiler progeny body weight. *Poultry science*, 87(4), 805-811. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00285>
39. Salem Jr, N., Kim, H. Y., & Yergey, J. A. (1986). Docosahexaenoic acid: membrane function and metabolism. *Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods*, 15, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-644360-8.50019-4>
40. Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Perez-Cerezales, S., Castano, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. C., ... & Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PloS one*, 14(1), e0209910. DOI: [10.1371/journal.pone.0209910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910)
41. Sarabia Frago, J., Pizarro Díaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodriguez-Bertos, A., & Barger, K. (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(2), 345-352. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00285>
42. Sim, W. C., Yin, H. Q., Choi, H. S., Choi, Y. J., Kwak, H. C., Kim, S. K., & Lee, B. H. (2015). L-serine supplementation attenuates alcoholic fatty liver by enhancing homocysteine metabolism in mice and rats. *The Journal of nutrition*, 145(2), 260-267. <https://doi.org/10.3945/jn.114.199711>
43. Steele, M. G., Meldrum, W., Brillard, J. P., & Wishart, G. J. (1994). The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer in vitro and in vivo. *Reproduction*, 101(3), 599-603. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1010599>
44. Surai, P. F., Cerolini, S., Wishart, G. J., Speake, B. K., Noble, R. C., & Sparks, N. H. (1998). Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. *Poultry and Arian Biolog*, 9 (1) 1998, 11- 23.
45. Surai, P. F., Fujihara, N., Speake, B. K., Brillard, J. P., Wishart, G. J., & Sparks, N. H. C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen-Review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 14(7), 1024-1050. DOI:[10.5713/ajas.2001.1024](https://doi.org/10.5713/ajas.2001.1024)
46. Surai, P. F., Sparks, N. H. C., & Speake, B. K. (2006). The role of antioxidants in reproduction and fertility of poultry. (September) Xii. *Eur. Poultry. Conf. Sep*, pp. 10–14.
47. Surai, P., Kostjuk, I., Wishart, G., Macpherson, A., Speake, B., Noble, R., & Kutz, E. (1998). Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biological trace element research*, 64, 119-132. <https://doi.org/10.1007/BF02783329>
48. Tapeh, R. S., Zhandi, M., Zaghari, M., & Akhlaghi, A. (2017). Effects of guanidinoacetic acid diet supplementation on semen quality and fertility of broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 89, 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.012>. (In Persian)
49. Thananurak, P., Chuaychu-Noo, N., Thélie, A., Phasuk, Y., Vongpralub, T., & Blesbois, E. (2020). Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. *Poultry Science*, 99(2), 1185-1198. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.040>

50. Wang, Q., Sun, L. C., Liu, Y. Q., Lu, J. X., Han, F., & Huang, Z. W. (2016). The synergistic effect of serine with selenocompounds on the expression of SelP and GPx in HepG2 cells. *Biological trace element research*, 173, 291-296. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0665-8>
51. Wishart, G. J. 1984. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *Reproduction*, 71(1), 113-118. Wishart, G. J. (1984). Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *Reproduction*, 71(1), 113-118. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0710113>
52. Zamiri, M. J., Khalili, B., Jafaroghli, M., & Farshad, A. (2010). Seasonal variation in seminal parameters, testicular size, and plasma testosterone concentration in Iranian Moghani rams. *Small Ruminant Research*, 94(1-3), 132-136. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.07.013>
53. Zhao, X., Yang, Z. B., Yang, W. R., Wang, Y., Jiang, S. Z., & Zhang, G. G. (2011). Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. *Poultry science*, 90(8), 1720-1727. DOI:10.3382/ps.2010-01280
54. Zhou, X., He, L., Zuo, S., Zhang, Y., Wan, D., Long, C., ... & Yin, Y. (2018a). Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.009> *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(2), 488-498. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.009>
55. Zhou, X., Zhang, Y., Wu, X., Wan, D., & Yin, Y. (2018b). Effects of dietary serine supplementation on intestinal integrity, inflammation and oxidative status in early-weaned piglets. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(3), 993-1002. <https://doi.org/10.1159/000491967>