Animal Production Research

Vol. 14, No. 4, 2025 (17-31)
doi: 10.22124/ar.2025.30934.1904
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of dietary supplementation with sources containing omega-3 and omega-6 fatty acids on the quality and fertility of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters

H. Pasha Zanussi[1], H. Manafi Rasi[1]*

1. Department of Animal Sciences, Agricultural Education and Extension Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran

(Received: 11-07-2025 – Revised: 05-08-2025 – Accepted: 06-08-2025 – Available online: 03-09-2025)

Abstract

Introduction: One of the major costs in commercial poultry production is the purchase and upkeep of roosters, which are the sires and key contributors to flock fertility. Although roosters make up only about 10 to 15% of the flock, their genetic quality accounts for over 50% of the flock's fertility. Finding cost-effective solutions, such as artificial insemination, to reduce the expenses associated with acquiring and maintaining breeding roosters is a major concern for producers. Unlike in mammals, artificial insemination is not used in birds because sperm quality and fertility decline after the freezing and thawing processes. Cryopreserving bird semen would allow us to use roosters with superior genetics without their presence. This would reduce genetic defects, lower costs, and help with the global distribution of semen. It would also decrease disease transmission risks, prevent extinction, and create gene banks for better breeds. Despite extensive efforts, developing an effective cryopreservation method for avian sperm remains a challenge. The lower fertility rates observed with cryopreserved poultry sperm, compared to other animals, are a significant hurdle for commercial applications. This difficulty may be related to the unique physiological features of bird sperm. Many hypotheses have been proposed about avian sperm, including the idea that poultry sperm contains a distinctive fatty acid profile, rich in omega-6 fatty acids. Supplementing sperm with essential fatty acids like omega-3 through dietary means has been shown to improve their reproductive performance. The success of cryopreservation heavily relies on maintaining sperm's biological functions, which are influenced by factors such as extenders, cooling rates, and thawing protocols. Research has focused on optimizing parameters for sperm survival after thawing, including motility, viability, membrane integrity, and structural stability. Despite these efforts, fertility rates above 60% using cryopreserved sperm have not been reached. Studies indicate that providing diets rich in omega-3 fatty acids can enhance various sperm quality parameters and boost fertility. Dietary fats' type and source affect sperm performance. This is because of their involvement in intricate molecular processes and their role as hormone and signaling pathway precursors, which are crucial for sperm function. Research on fatty acids' impact on sperm uses fresh samples. Data is lacking on whether dietary supplements containing essential fatty acids can improve cryopreserved and thawed sperm quality. In this study, besides assessing motility and viability, parameters such as plasma membrane integrity, sperm morphology, membrane stability, lipid peroxidation, and DNA fragmentation will be evaluated in the frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters.

Materials and methods: Thirty-six 42-week-old Ross 308 roosters were randomly allocated to four groups (n=6/group) and housed in individual cages under standard conditions (21-24°C, 75% humidity, 15L:9D photoperiod). Experimental diets included: 1) Control (no oil), 2) 2% flaxseed oil, 3) 2% sesame oil, and 4) 1% flaxseed + 1% sesame oil. All diets were isoenergetic and isonitrogenous, formulated using WUFFDA software.

* Corresponding author: Manafi48@gmail.com

CC BY

Semen was gathered using abdominal massage on days 1, 20, 40, and 60. It was immediately diluted (1:20) in Lake's extender, which had 5% glycerol, and held at 5°C for 2 hours. Afterward, it was frozen in 0.25 mL straws with liquid nitrogen vapor before being stored at -196°C. Thawing was performed in 4°C water for three minutes. Motility was assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). Viability was determined by eosin-nigrosine staining. Membrane integrity was measured with the hypo-osmotic swelling test (HOST). Lipid peroxidation (MDA) was measured using the thiobarbituric acid assay. Morphology was evaluated by phase-contrast microscopy. For fertility trials, pooled semen from each group was used to inseminate 20 hens/group (250 µL containing 300×10^6 sperm). They gathered the eggs for five days after insemination, placed them in the incubator, and candled them on day 10 to determine their fertility. The data obtained from this experiment were statistically analyzed using the GLM procedure in SAS software. The comparison of means was conducted using the Tukey test at $P<0.05$.

Results and discussion: Flaxseed oil (2% of diet) or a mix of flaxseed and sesame oil (1:1 ratio) improved total motility, progressive motility, sperm lipid peroxidation, membrane integrity, sperm viability, and fertility. These results were superior to control and sesame oil treatments ($P<0.05$). Fertility rates were significantly higher in the flaxseed (80%) and mixed oil (79%) groups compared to the control (60%, $P<0.05$), though hatchability did not differ significantly. The findings show that dietary flaxseed oil or its combination with sesame oil significantly enhances frozen-thaw sperm quality in broiler breeders. The improvements in motility, membrane integrity, and oxidative stability likely result from increased incorporation of omega-3 fatty acids (particularly DHA) into sperm membranes, improving fluidity and cryoresistance. The antioxidant properties of omega-3s may also mitigate freeze-thaw-induced lipid peroxidation.

Conclusions: The study suggests that adding 2% flaxseed oil or a 1:1 flaxseed-sesame mixture to rooster diets can improve frozen-thawed semen quality and fertility in commercial poultry. Future research should optimize fatty acid ratios and evaluate long-term reproductive performance. The protocol provides a practical approach to reducing male maintenance costs while enabling global semen distribution in breeding programs.

Keywords: Essential fatty acids, Freezing-thawing, Rooster, Sperm quality

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this project.

How to cite this article:

Pasha Zanussi, H., & Manafi Rasi, H. (2025). Effect of dietary supplementation with sources containing omega-3 and omega-6 fatty acids on the quality and fertility of frozen-thawed sperm of broiler breeder roosters. *Animal Production Research*, *14*(4), 17-31. doi: 10.22124/ar.2025.30934.1904

تحقیقات تولیدات دامی

سال چهاردهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۴ (۳۱-۱۷)

Animal Production Research

مقاله پژوهشی

اثر مکمل‌سازی جیره با منابع حاوی اسیدچرب امگا-۳ و امگا-۶ بر کیفیت و باروری اسپرم منجمد خروس‌های گله مادرگوشتی

حسین پاشا زانوسی[۱]، حسین منافی راثی[۱*]

۱- گروه علوم دامی، موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران ، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۵ – تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر منابع خوراکی حاوی اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ (کتان و کنجد) بر فراسنجه‌های کیفی، باروری و جوجه‌درآوری اسپرم خروس‌های گله مادر گوشتی پس از انجماد و یخ‌گشایی بود. در این آزمایش از ۲۴ قطعه خروس استفاده شد که در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار گروه آزمایشی مورد مطالعه قرار گرفتند. جیره‌های آزمایشی شامل: ۱- جیره تجاری (شاهد)، ۲- جیره حاوی دو درصد روغن کتان، ۳- جیره حاوی دو درصد روغن کنجد و ۴- جیره حاوی یک درصد روغن کتان و یک درصد روغن کنجد بودند. پس از دو هفته عادت‌دهی برای اسپرم‌گیری، خروس‌ها به‌مدت ۶۰ روز با تیمارهای مختلف خوراک‌دهی شدند. نمونه‌های منی در روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ آزمایش به‌روش ماساژ شکمی از خروس‌ها جمع‌آوری شده و منجمد شدند. فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم، یکپارچگی غشاء، زنده‌مانی، ریخت‌شناسی طبیعی و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم پس از انجماد-ذوب مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی راندمان باروری و جوجه درآوری، مرغ‌های مادر با اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده تیمارها در پایان آزمایش تلقیح شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای روغن کتان (۲ درصد جیره) و یا مخلوط روغن کتان و کنجد (به نسبت ۱ به ۱) بر فراسنجه‌های جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، پراکسیداسیون لیپید اسپرم و یکپارچگی غشای پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم و همچنین، بر باروری در مقایسه با تیمارهای شاهد و روغن کنجد موثر بوده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، به‌کارگیری روغن کتان و یا مخلوط مساوی روغن کتان و کنجد به‌میزان ۲ درصد جیره به‌منظور بهبود کیفیت اسپرم خروس جهت انجماد پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب ضروری، انجماد-یخ‌گشایی، خروس، کیفیت اسپرم

* نویسندهٔ مسئول: Manafi48@gmail.com

doi: 10.22124/ar.2025.30934.1904

مقدمه

یکی از مهم‌ترین هزینه‌های تولید در گله‌های طیور تجاری لاین، اجداد و مادر، هزینه خرید و نگهداری خروس‌ها است. با توجه به اینکه خروس‌ها حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد جمعیت گله را تشکیل می‌دهند، بیش از ۵۰ درصد باروری گله مربوط به کیفیت خروس‌های گله است (Ommati et al., 2013). یکی از دغدغه‌های محققین و تولیدکنندگان این صنعت، دستیابی به انجام تلقیح مصنوعی کارآمد در گله‌های طیور است تا از این راه، هزینه‌های خرید و نگهداری خروس در گله را کاهش دهند. در پرندگان بر خلاف پستانداران، تلقیح مصنوعی خیلی مرسوم نیست و علت اصلی آن هم به‌واسطه کاهش کیفیت و باروری اسپرم در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی است (Yan et al., 2013). در صورت انجماد و ذخیره‌سازی اسپرم پرندگان، امکان استفاده از خروس‌های با پتانسیل ژنتیکی بالا در تمام نقاط جهان بدون حضور خروس در گله، کاهش نقص‌های ژنتیکی، کاهش هزینه‌های تولید، امکان ارسال اسپرم به تمام نقاط جهان، کاهش آلودگی‌ها و بیماری‌های مسری، جلوگیری از انقراض پرندگان در معرض خطر انقراض، ایجاد بانک ژنوم برای نژادهای بومی برتر و مزایای بی‌شماری دیگری را به‌همراه خواهد داشت (Hammerstedt & Graham, 1992; Kelso et al., 1997).

تاکنون تلاش‌های محققین برای توسعه یک روش مناسب برای انجماد اسپرم طیور موفق نبوده است (Long et al., 2006; Gliozzi et al., 2011). نرخ باروری پایین‌تر اسپرم منجمد طیور در مقایسه با دیگر گونه‌ها، یک چالش جدی برای تلقیح مصنوعی در گله طیور تجاری است (Hammerstedt & Graham, 1992; Safari Asl et al., 2018). این چالش ممکن است با برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی اسپرم طیور در ارتباط باشد (Cerolini et al., 1997) از طرف دیگر، تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی طی فرآیندهای انجماد-ذوب از مهمترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در اسپرم به‌وجود می‌آورند که در نتیجه آنها، اسپرم تحت تاثیر مجموعه‌ای از پدیده‌های آبشاری اکسیداتیو قرار می‌گیرد که در نهایت به کاهش باروری اسپرم منجر می‌شود(Batista et al., 2009; Masoudi et al., 2018). فرضیات متعددی در ارتباط با اسپرم پرندگان مطرح شده که طی آزمایش‌های مختلف به تئوری‌هایی تبدیل شده است، از جمله اینکه اسپرم ماکیان دارای ترکیب اسید چرب منحصر به فرد امگا-۶ است و غنی‌سازی اسیدهای چرب ضروری (امگا-۳) اسپرم از راه افزودن این اسیدهای چرب به خوراک طیور و تاثیر این انتقال بر کارکردهای زیستی اسپرم، سبب افزایش توانایی باروری آنها می‌شود (Blesbois et al., 1997; Pasha Zanussi et al., 2019).

انجماد موفقیت‌آمیز اسپرم پرندگان از راه حفظ کارکردهای زیستی آن، تحت تاثیر عوامل مختلفی خواهد بود. از جمله این عوامل می‌توان به رقیق‌کننده‌ها، نرخ کاهش دما و روش‌های ذوب اشاره نمود. محققان تلاش‌های زیادی برای بهینه‌سازی انجماد در جهت بهینه کردن فراسنجه‌هایی چون حفظ تحرک، سلامت و استحکام غشاء بعد از انجماد و ذوب انجام داده‌اند اما هنوز میزان باروری حاصل از اسپرم‌های انجمادی به بیش از ۶۰ درصد نرسیده است (Masoudi et al., 2018). محققین نشان دادند که با استفاده از منابع اسیدهای چرب امگا-۳ در جیره خروس‌ها، میزان فراسنجه‌های مختلف اسپرم و به تبع آن، باروری خروس‌ها افزایش می‌یابد (Pasha Zanussi et al., 2020). در این رابطه، منابع چربی، نوع و نسبت اسیدهای چرب از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در کیفیت اسپرم هستند زیرا دارای سازوکارهای دقیق مولکولی و مهم در عملکرد اسپرم بوده و به‌عنوان پیش‌سازهای هورمونی و عضو پیام‌رسان سلولی در باروری خروس‌ها نقش ایفا می‌کنند (Akhlaghi et al. 2014; Pasha Zanussi et al., 2019).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند فراسنجه‌هایی همچون جنبایی و زنده‌مانی اسپرم خروس می‌تواند طی انجماد تغییر کند (Zhandi & Sharafi, 2015). تاکنون تمام مطالعات تغذیه‌ای که تاثیر اسیدهای چرب بر بهبود فراسنجه‌های اسپرم را مورد مطالعه قرار دادند مربوط به فراسنجه‌های اسپرم تازه بوده است (Pasha Zanussi et al., 2019) و تحقیقی در ارتباط با استفاده از اسیدهای چرب ضروری به‌صورت تغذیه‌ای روی بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم در حالت انجماد و یخ‌گشایی صورت نگرفته است. در این تحقیق علاوه بر ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی و زنده‌مانی، فراسنجه‌هایی همچون سنجش میزان یکپارچگی غشای پلاسمایی، ریخت‌شناسی اسپرم، میزان پراکسیداسیون چربی‌های اسپرم و شکست DNA اسپرم نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تأثیر افزودن دو روغن گیاهی کنجد و تخم کتان به‌عنوان منابع اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ در جیره بر فراسنجه‌های اسپرم منجمد شده خروس‌های گله مادر گوشتی سویه راس۳۰۸ پس از یخ‌گشایی، از ۲۴ قطعه خروس در سن ۴۲ هفتگی با یکنواختی وزنی ۸۸ درصد، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و شش تکرار استفاده شد. خروس‌های خریداری شده به قفس‌های انفرادی در سالنی با شرایط محیطی استاندارد (دمای ۲۱ تا ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۵ درصد)، منتقل شدند. طی آزمایش، برنامه نوری که شامل ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی بود اعمال شد. خروس‌ها دارای دسترسی آزاد به آب بودند. جیره‌های آزمایشی برای تأمین مواد مغذی توصیه شده در راهنمای پرورش خروس سویه راس ۳۰۸، با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی WUFFDA تنظیم و مقدار مصرف روزانه هم مطابق راهنمای پرورش در نظر گرفته شد (جدول ۱).

کل جیره‌ها از نظر انرژی، پروتئین و سایر مواد مغذی به‌جز اسیدهای چرب یکسان بودند. ابتدا خروس‌ها به‌مدت دو هفته برای جمع‌آوری اسپرم به روش ماساژ شکمی و با محیط پرورش عادت‌دهی شدند. حجم منی، غلظت اسپرم و وزن اولیه خروس‌ها در ابتدای آزمایش ارزیابی شد و سپس، خروس‌ها به‌نحوی به هر تیمار اختصاص یافتند که میانگین هر یک از شاخص‌های ذکر شده در بین تیمارهای آزمایشی، تفاوت معنی‌داری نداشته باشند. جیره‌های آزمایشی شامل: ۱- جیره تجاری (شاهد)، ۲- جیره حاوی دو درصد روغن کتان، ۳- جیره حاوی دو درصد روغن کنجد و ۴- جیره حاوی یک درصد روغن کتان و یک درصد روغن کنجد بود. پروفایل اسید چرب روغن‌های مورد استفاده و همچنین، جیره‌های آزمایشی در جدول ۲ ارائه شده است. پروفایل اسیدهای چرب روغن‌ها و جیره‌های آزمایشی به کمک دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC/FID)، مدل CP-3800، مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای(FID) ستون موئینه (Bpx 70, Melbourn SGE, Australia)، اندازه‌گیری شد.

نمونه‌های اسپرم در روزهای یک، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ آزمایش جمع‌آوری شد. نمونه‌های اسپرم اخذ شده از تمام خروس‌ها به‌صورت مجزا و در زمان‌های یاد شده در میکروتیوب‌های مدرج یک میلی‌لیتری، جمع‌آوری شدند و سپس به درون فلاسک عایق با دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شده و جهت اندازه‌گیری شاخص‌های کیفی منی، حداکثر ظرف ۲۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شدند. غلظت اسپرم، پس از رقیق‌سازی منی با آب مقطر به نسبت یک به ۲۰۰، به کمک لام نئوبار هموسایتومتر اندازه‌گیری شد.

به‌منظور انجماد اسپرم‌های اخذ شده از خروس‌ها از بافر لیک برای رقیق‌سازی استفاده شد. (Masoudi et al., 2018). رقیق‌کننده مورد استفاده در این پژوهش، دارای ترکیبات فروکتوز، پتاسیم‌استات، سدیم‌گلوتامات، پلی-وینیل‌پرولیدون، منیزیم استات، گلیسین، لیستین سویا و گلیسرول (پنج درصد) بود. بلافاصله بعد از جمع‌آوری مایع منی به نسبت یک حجم منی و ۲۰ حجم محیط انجماد، آن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رقیق شد. سپس، لوله مایع منی در ظرف محتوی۱۰۰ سی سی آب ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. پس از تجزیه و تحلیل اولیه شاخص‌های اسپرمی (حجم بین نیم تا یک میلی لیتر، غلظت بیشتر از ۱۰۹× ۲/۵ اسپرم در میلی‌لیتر، تحرک بیشتر از ۷۰ درصد و ریخت‌شناسی اسپرم غیرطبیعی کمتر از ۱۰ درصد، در هر انزال به‌عنوان اسپرم طبیعی در نظر گرفته شدند)، برای سرد شدن تدریجی و تعادل با محیط انجماد (به‌ویژه گلیسرول)، ظرف آب محتوی لوله‌های اسپرم به‌مدت دو ساعت در یخچال با دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، جهت حفظ دمای مایع منی، ظرف آب محتوی مایع منی روی قالب‌های یخ قرار داده شد و بلافاصله در داخل پایوت‌های انجماد ۰/۲۵ میلی‌لیتر کشیده شد. پایوت‌های محتوی اسپرم به‌مدت هفت دقیقه در بالای سطح ازت مایع (پنج سانتی‌متر) قرار گرفتند و سپس، به سرعت در ازت مایع غوطه‌ور شده و برای نگهداری به تانک ازت منتقل شدند. برای یخ‌گشایی مایع منی، پایوت‌ها از ازت مایع خارج شده و به‌مدت سه دقیقه در آب چهار درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس، محتوای آنها به داخل میکروتیوپ‌ها تخلیه شد.

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

Table 1. Ingredients and chemical composition[1] of experimental diets

Foodstuffs (%)	Control	Experimental diets[2]
Corn	68.15	61.45
Soybean meal	8	8
Wheat bran	19.5	22.7
Sodium Bicarbonate	0.15	0.15
table salt	0.25	0.25
Dicalcium phosphate	1.17	1.15
DL–Methionine	0.05	0.1
Bentonite	1.25	2.5
Calcium carbonate	1.08	1.1
Mineral premix	0.25	0.25
Vitamin premix	0.25	0.25
Vegetable oil	0	2
Vitamin E (mg/kg)	200	200
Calculated chemical compositions		
Metabolizable energy (kcal/kg)	2750	2750
Crude protein (%)	11.8	11.8
Calcium (%)	0.70	0.70
Non-phytate phosphorus (%)	0.35	0.35

[1] Based on NRC (1994). [2] For the preparation of experimental diets, three experimental diets including 2% flaxseed oil, 2% sesame oil, 1% flaxseed oil, and 1% sesame oil were added to the basal diet, respectively.

جدول ۲- ترکیب اسیدهای چرب روغن‌ها و جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد)

Table 2. Fatty acid composition of oils and experimental diets (%)

Fatty acids	Oils		Experimental diets			
	Flaxseed	Sesame	Control	Flaxseed oil	Sesame oil	A mixture of flaxseed and sesame oil
Myristic 14:0	0	0	0	0	0	0
Palmitic 16:0	6.41	9.71	0.47	0.61	0.68	0.64
Stearic 18:0	3.99	4.89	0.08	0.16	0.18	0.17
Arachidic 20:0	0	0.47	0	0	0.01	0
Saturated fatty acids[1]	10.40	15.07	1.03	1.24	1.34	1.29
Oleic 18:1	17.79	41.54	0.97	1.33	1.80	1.57
Unsaturated with a double bond[2]	17.79	41.65	0.97	1.33	1.81	1.57
Linoleic18:2 n-6	16.28	42.60	1.46	1.78	2.31	2.05
Linolenic 18:3 n-3	54.18	0.48	0.05	1.13	0.05	0.60
Arachidonic 20:4 n-6	1.35	0.20	0	0.03	0	0.01
Total unsaturated fatty acids n-6	17.63	42.80	1.46	1.81	2.31	2.06
Total unsaturated fatty acids n-3	54.18	0.48	0.04	1.13	0.05	0.60
Unsaturated with multiple double bonds[3]	71.80	43.27	1.51	2.94	2.36	2.54
Ratio of n-3 to n-6	3.07	0.01	0.03	0.62	0.02	0.29

[1] SFA: Total fatty acids 14:0 ,16:0, 18:0, and 20:0
[2] MUFA: Total fatty acids 16:1, 18:1, 20:1, and 22:1
[3] PUFA: Total fatty acids 18:2, 18:3, 20:4, 20:5, and 22:6

جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم به کمک نرم افزار کاسا اندازه‌گیری شد. برای این منظور، هشت میکرولیتر نمونه اسپرم رقیق شده با بافر PBS روی لام مخصوص از پیش گرم شده ریخته شده و جنبایی کل و پیش‌رونده با کمک کامپیوتر اندازه‌گیری شد (Shahverdi et al, 2015). برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپرم از روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد (Akhlaghi et al., 2014). برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی از روش استاندارد با محلول هانکوک و با شمارش حداقل ۳۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگ‌نمایی۱۰۰، درصد اسپرم‌های غیرطبیعی و اسپرم با آکروزوم غیرطبیعی محاسبه شد (Safari et al., 2018).

برای اندازه‌گیری یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم، از روش استاندارد با کمک محلول هایپواسموتیک هاست (HOST) و میکروسکوپ نوری فازکنتراست با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ استفاده شد. در هر نمونه، حداقل ۴۰۰ اسپرم شمارش شدند

و درصد اسپرم‌های با دم گره خورده (غشای سالم) و اسپرم‌های با دم گره نخورده (غشای بدون عملکرد) محاسبه شدند (Safari et al., 2018).

غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی در منی، به‌وسیله آزمون TBARS[۲] با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد (Botsoglou & Fletouris, 1994). برای اندازه‌گیری میزان شکست DNA اسپرم از روش Sperm Chromatin Structure Assay با رنگ‌آمیزی اکریدین اورانژ استفاده شد (Evenson & Wixon, 2005). نمونه‌ها با بافر دناتوراسیون قلیایی شامل HCl و Triton X-۱۰۰، در یخ دناتوره شده و سپس با بافر TNE شستشو شدند. سپس، اسپرم‌ها در محلول اکریدین اورانژ در بافر سیترات-فسفات، به‌مدت حداکثر سه دقیقه در تاریکی رنگ‌آمیزی شده و بلافاصله با فلوئسایتومتر مورد تحلیل قرار گرفتند. با رسم نمودار دوبعدی و تفکیک جمعیت‌های سالم و دناتوره، درصد شکست DNA محاسبه و گزارش شد. برای اندازه‌گیری پروفایل اسید چرب اسپرم، در پایان آزمایش (روز ۶۰) و پس از اسپرم‌گیری، برای حصول حجم کافی لیپید جهت واکنش متیلاسیون و تضمین تکرارپذیری بالا در تجزیه GC/FID، اسپرم‌های سه خروس هم وزن هر تیمار با هم تلفیق شدند و دو نمونه از هر تیمار به آزمایشگاه ارسال شد. تجزیه اسید چرب اسپرم و ارزیابی‌های مربوط به باروری و جوجه‌درآوری با استفاده از روش تلقیح مصنوعی توصیه شده (Akhlaghi et al., 2014) با اندکی اصلاحات انجام شد. تلقیح دو بار در هفته و در ساعت ۴ بعد از ظهر انجام شد. برای این منظور، ۲۰ مرغ مادر گوشتی سویه راس ۳۰۸ در سن ۳۵ هفتگی برای هر تیمار (در مجموع، ۸۰ مرغ) از پرورش‌دهنده مرغ مادر خریداری شد. مرغ‌های خریداری شده برای عادت‌دهی به سیستم قفس، به‌مدت دو هفته در قفس نگهداری شدند. شرایط محیطی شامل دما، رطوبت و نور بر اساس استاندارد راهنمای پرورش مرغ مادر سویه راس ۳۰۸ با دقت بالا تنظیم و کنترل شد. دوز تلقیح برای هر مرغ برابر با ۲۵۰ میکرولیتر ($۱۰^۶\times$ ۳۰۰ اسپرم برای هر مرغ) بود (Safari et al., 2018). تخم‌مرغ‌های مربوط به هر تیمار تا پنج روز بعد از آخرین روز تلقیح، جمع‌آوری و شماره‌گذاری شدند. تخم‌مرغ‌ها در دمای ۱۳ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۵ درصد ذخیره و نگهداری شدند. برای هر تیمار حدود ۲۰۰ تخم قابل جوجه‌کشی (هر هفته، ۵۰ تخم‌مرغ) بعد از انجام ضدعفونی (۱۵ میلی‌لیتر فرمالین و ۰/۶ گرم پرمنگنات) در دستگاه جوجه‌کشی تمام اتوماتیک (ویکتوریا، ایتالیا) با دمای ۳۷/۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در روز ۱۰ جوجه‌کشی، میزان باروری تخم‌مرغ‌ها با دستگاه نوربینی (کندلینگ) ارزیابی شد و در روز ۲۱ جوجه‌کشی، میزان جوجه‌درآوری تیمارها بر اساس تعداد تخم‌مرغ‌های بارور قرار داده شده در دستگاه، محاسبه شد.

داده‌های مربوط به فراسنجه‌های اسپرم در زمان‌های مختلف (یک، ۲۰، ۴۰ و ۶۰) جمع‌آوری و به‌ترتیب با استفاده از رویه MIXED برای اندازه‌گیری‌های تکرار شده و رویه GLM برای داده‌های تک مشاهده‌ای با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی-کرامر استفاده شد. بررسی اثر تیمارها بر مولفه‌های باروری و جوجه‌درآوری با آزمون خی دو بررسی شدند.

نتایج

نتایج آثار تیمارها روی فراسنجه‌های کیفی اسپرم در جدول ۳ نشان می‌دهد که منابع مختلف روغن و مدت زمان تغذیه منابع روغن (زمان) در فراسنجه‌های یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی اسپرم، اثر معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$) و در میزان پراکسیداسیون غشاء اسپرم، تنها اثر جیره (منابع روغن) معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). در ارتباط با صفت یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی، بالاترین درصد یکپارچگی غشاء و زنده‌مانی به‌ترتیب مربوط به تیمار روغن کتان و مخلوط روغن کتان و کنجد بود که با سایر تیمارها از جمله تیمار شاهد و تیمار کنجد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

نتایج مربوط به مقایسه میانگین تیمارها برای صفت پراکسیداسیون غشای اسپرم نشان می‌دهد که کمترین میزان پراکسیداسیون غشاء مربوط به تیمارهای کتان و مخلوط کتان و کنجد است که با تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین، در خصوص فراسنجه‌هایی مانند ریخت‌شناسی غیرطبیعی اسپرم، شکست DNA و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد.

نتایج آثار تغذیه منابع روغن در فراسنجه‌های حرکتی اسپرم خروس‌ها پس از انجماد و یخ گشایی در جدول ۴ مشاهده

می‌شود. فراسنجه‌هایی مانند جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده اسپرم به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) تحت تاثیر جیره مصرفی و مدت زمان مصرف جیره (زمان) به‌وسیله خروس‌ها قرار گرفتند ($P<۰/۰۵$). مقایسه میانگین تیمارها در این صفات نشان می‌دهد که تیمارهای کتان و مخلوط کتان و کنجد با تیمار شاهد و کنجد، تفاوت معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$). اثر مدت زمان تغذیه منابع روغن (زمان) تنها در فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده معنی‌دار بوده، اما اثرمتقابل مدت زمان تغذیه و نوع روغن تنها در فراسنجه جنبایی پیش‌رونده معنی‌دار شده است.

همان‌گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد بین تیمارها در روزهای ۰، ۲۰ و ۴۰ آزمایش، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و تنها در روز ۶۰ آزمایش بین تیمارهای حاوی روغن (کتان و مخلوط آنها) با تیمار شاهد، تفاوت معنی‌داری مشاهده شده است ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری که بیشترین میزان جنبایی پیش‌رونده مربوط به تیمار حاوی روغن کتان است. هیچ‌یک از میانگین تیمارها در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و۶۰ برای جنبایی کل اسپرم، تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما در میزان جنبایی پیش‌رونده تنها در روز ۶۰، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی روغن کتان و مخلوط کتان و کنجد با تیمارهای شاهد و روغن کنجد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین، نتایج نشان می‌دهند که منابع روغن در میزان پراکسیداسیون چربی‌های منی به‌طور کلی و در روزهای ۴۰ و ۶۰، تفاوت معنی‌داری در تیمارها ایجاد کرد. شکل ۲ مقایسه تیمارها در زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ را برای این فراسنجه نشان می‌دهد. تیمار حاوی روغن کتان و مخلوط کتان و کنجد دارای کمترین مقدار پراکسیداسیون غشاء بوده و با تیمار حاوی روغن کنجد و تیمار شاهد، تفاوت معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$). سایر فراسنجه‌های اسپرم از جمله ریخت‌شناسی، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء و شکست DNA تحت تاثیر مدت زمان تغذیه منابع روغن قرار نگرفتند (جدول ۳) و تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در روزهای ۰، ۲۰،۴۰ و ۶۰ آزمایش مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$) (جدول ۵).

همچنین، نتایج تحقیق نشان می‌دهد که تیمارهای حاوی روغن کتان (دو درصد جیره) و مخلوط مساوی روغن کتان و کنجد (یک درصد جیره از هر روغن) به‌طور معنی‌داری بالاترین نرخ باروری را ایجاد کرده است که با تیمار روغن کنجد و تیمار شاهد، تفاوت معنی‌داری دارد ($P<۰/۰۵$)، اما افزودن منابع مختلف روغن و مخلوط مساوی از آن‌ها، تاثیر معنی‌داری بر نرخ جوجه درآوری نداشته است (جدول ۶).

بحث

این فرضیه مطرح است که تولید اسپرم غیرطبیعی طی اسپرماتوژنز در بدن خروس اتفاق می‌افتد (Towhidi et al., 2013) و فرآیندهای انجمادی تاثیری روی اختلالات ثانویه اسپرم ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد که فراسنجه‌هایی چون ریخت‌شناسی، شکست DNA و فراسنجه‌های سرعتی اسپرم مانند LIN، VCL و ALH تحت تاثیر سن، نوع روغن و آثار متقابل آن‌ها قرار نگرفت. گمان می‌رفت که اسیدهای چرب PUFA می‌توانند با اثر بر هورمون‌های جنسی FSH و LH و همچنین به‌عنوان منبع مهم انرژی، اسپرماتوژنز را در سلول‌های سرتولی حمایت کنند و سبب بهبود ریخت‌شناسی اسپرم شوند، اما این امر محقق نشد.

نتایج این تحقیق موافق مطالعات قبلی است که در آنها، انجمادسازی روی ریخت‌شناسی اسپرم تاثیر نداشت (Naijian et al., 2013; Emamverdi et al., 2015; Zhandi & Sharafi, 2015). همچنین، یافته‌های سایر تحقیقات که از منابع امگا-۳ و امگا-۶ در جیره خروس‌ها استفاده کردند نشان دادند که این منابع روی صفات مذکور در اسپرم تازه خروس‌ها نیز بهبودی ایجاد نکرده است (Cerolini et al., 1997, 2003; Olubowale, et al., 2014; Safari Asl et al., 2018; Pasha Zanussi et al., 2019). محققین دیگری هم اظهار داشتند که افزودن روغن کتان به جیره بلدرچین ژاپنی در ریخت‌شناسی و حجم منی آنها بهبود معنی‌داری نداشت (Al-Daraji et al., 2010). در مقابل، سایر محققین اظهار داشتند PUFAها درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی طبیعی را طی ذخیره‌سازی سرد افزایش می‌دهند (Strzezek et al., 2004).

بهبود معنی‌دار در فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی در تیمارهای روغن کتان و مخلوط روغن کتان و کنجد در این آزمایش با نتایج محققینی که از همین منابع، بهبود معنی‌داری در صفات مذکور در اسپرم تازه خروس‌ها (Zanini et al., 2003; Safari Asl et al., 2018; Pasha Zanussi et al., 2019) و در بزها (Bongalhardo et al., 2009) مشاهده کردند مطابقت دارد. این محققین نشان دادند که اصلاح و غنی‌سازی اسیدهای چرب PUFA اسپرم تازه از راه تغذیه این

منابع در جیره پرنده، می‌تواند سبب بهبود کیفیت فراسنجه‌های جنبایی کل و پیش‌رونده در اسپرم‌ها بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی شوند چرا که در تیمار شاهد و تیمارهایی که منبع امگا-۶ دریافت کردند به‌دلیل عدم تناسب نسبت اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ یا کمبود اسیدهای چرب دکوزا هگزانوئیک اسید در ساختار اسپرم آن‌ها، سبب شد که در برابر فرآیند انجماد مقاومت مناسبی نداشته باشند و از میزان تحرک آن‌ها کاسته شده است. از طرفی، بهبود معنی‌دار جنبایی پیش‌رونده اسپرم در تیمار روغن کتان در مقایسه با تیمار شاهد آزمایش، نشان می‌دهد که با افزایش سن خروس‌ها، این مولفه اسپرم (دکوزا هگزانوئیک اسید) دچار کاهش شده و حضور اسیدهای چرب امگا-۳ جیره‌ای بر این چالش غلبه کرده و آن‌ها را بهبود بخشیده است.

کاهش کیفیت فراسنجه‌ها و نرخ باروری اسپرم تازه در خروس‌هایی که جیره تجاری (جیره یکسان با جیره شاهد این تحقیق) دریافت می‌کردند همراه با افزایش سن خروس‌ها نسبت به جیره‌هایی که غنی از منابع امگا-۳ بودند به‌وسیله بسیاری از محققین گزارش شده است (Cerolini et al., 1997; Safari Asl et al., 2018; Pasha Zanussi et al., 2019). نتایج این محققین نشان داد که سن دارای اثر معنی‌دار بر همه ترکیبات چربی به‌جز کلسترول، کاردیولیپین، اسید استئاریک و اسید آراشیدونیک است. همچنین، گزارش شد که در خروس‌های مادر گوشتی، چربی کل اسپرم با افزایش سن زیاد می‌شود (بیش از دو برابر) و مقدار فسفولیپیدها به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. این تغییرات گسترده در ترکیب لیپیدهای اسپرم با کاهش عمده فعالیت‌های متابولیکی و آنزیمی همراه است. بنابراین، تغییرات فراسنجه‌های اسپرم با افزایش سن می‌تواند به‌دلیل تغییرات در مقدار و نوع فسفولیپید اسپرم باشد.(Speake et al. 1995)

جدول ۳- اثر تغذیه منابع روغن بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌ها پس از انجماد و یخ‌گشایی منی

Table 3. Effect of feeding oil sources on sperm quality parameters of roosters after freezing and thawing of semen

Item	Experimental diets				SEM	*P*-value		
	Control	Sesame oil	Flaxseed and sesame oil	Flaxseed oil		Diet	Time	Diet×Time
Membrane peroxidation (nmol/mL)	4.10^{b}	4.20^{ab}	3.25^{d}	3.54^{cd}	0.19	0.000	0.088	0.100
Membrane integrity (%)	61.41^{c}	60.95^{c}	68.90^{a}	66.70^{b}	1.12	0.000	0.006	0.640
Abnormal Morphology (%)	22.30	20.04	18.40	19.75	1.50	0.270	0.180	0.470
Viability (%)	61.13^{c}	63.26^{bc}	69.60^{ab}	72.00^{a}	1.34	0.000	0.001	0.260
DNA fraction (%)	8.72	7.67	8.80	9.80	0.60	0.560	0.009	0.480

$^{a-d}$ Different superscript letters in each row are significantly different (P<0.05)

جدول ۴- اثر تغذیه منابع روغن بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم خروس پس از انجماد و یخ‌گشایی منی

Table 4. Effect of feeding oil sources on rooster sperm motility parameters after thawing frozen semen

Sperm motility parameters	Experimental diets				SEM	*P*-value		
	Control	Sesame oil	Flaxseed and sesame oil	Flaxseed oil		Diet	Time	Diet×Time
Total Mobility (%)	58.75^{b}	58.63^{b}	65.15^{a}	65.30^{a}	0.58	0.002	0.025	0.25
Progressive mobility (%)	18.4^{b}	18.67^{b}	22.00^{a}	22.90^{a}	1.2	0.011	0.002	0.05
VAP	33.90	32.50	40.20	40.50	0.74	0.05	0.20	0.41
VSL	44.80	42.60	48.50	47.80	0.52	0.045	0.08	0.12
VCL	126.80	125.25	132.20	133.50	1.65	0.80	0.15	0.13
ALH	7.80	7.70	7.90	7.80	1.4	0.78	0.85	0.23
LIN	39.00	39.50	38.45	39.80	0.87	0.50	0.52	0.45
STR	50.52	49.90	53.60	52.53	0.98	0.09	0.11	0.35

VAP: Average path velocity, VSL: Straight-line velocity, VCL: Curvilinear velocity, ALH: Amplitude of lateral head displacement, LIN: Linearity, STR: Straightness

$^{a-b}$ Different superscript letters in each row are significantly different (P<0.05)

جدول ۵- اثر مدت زمان تغذیه منابع روغن بر فراسنجه‌های اسپرم خروس، بعد از انجماد و یخ‌گشایی

Table 5. Effect of feeding duration of oil sources on rooster sperm parameters after thawing frozen semen

Feeding duration (days)	Experimental diets				*P*-value		
	Control	Sesame oil	Flaxseed and sesame oil	Flaxseed oil	Diet	Time	Diet×Time
			Total mobility (%)				
0	62.33	64.00	66.00	68.67	0.54	0.21	0.90
20	57.67	62.00	61.75	59.25	0.34	0.12	0.75
40	57.50	57.50	69.25	68.67	0.62	0.13	0.11
60	57.50	51.00	63.60	64.60	0.08	0.16	0.20
			Morphology (%)				
0	33.27	18.33	20.33	21.33	0.40	0.30	0.50
20	21.33	21.00	23.25	20.00	0.35	0.23	0.40
40	20.50	22.50	14.00	18.67	0.10	0.21	0.18
60	20.00	18.33	16.00	19.00	0.19	0.13	0.15
			Membrane integrity (%)				
0	65.33	66.00	70.67	69.00	0.30	0.15	0.41
20	61.00	64.00	67.50	62.50	0.23	0.23	0.52
40	62.00	60.50	72.25	70.33	0.21	0.19	0.17
60	57.33	53.33	65.20	65.00	0.13	0.32	0.50
			Viability (%)				
0	67.33	67.67	74.67	82.33	0.90	0.40	0.54
20	60.00	65.33	63.50	73.25	0.75	0.35	0.34
40	58.50	57.50	71.00	64.67	0.11	0.10	0.62
60	59.00	64.00	69.20	67.80	0.20	0.19	0.08
			Sperm DNA fragmentation (%)				
0	8.33	7.00	7.00	6.33	0.50	0.30	0.80
20	8.32	12.33	5.50	8.75	0.40	0.23	0.56
40	4.50	4.50	10.00	7.00	0.18	0.21	0.12
60	18.33	11.33	8.20	12.80	0.15	0.13	0.11

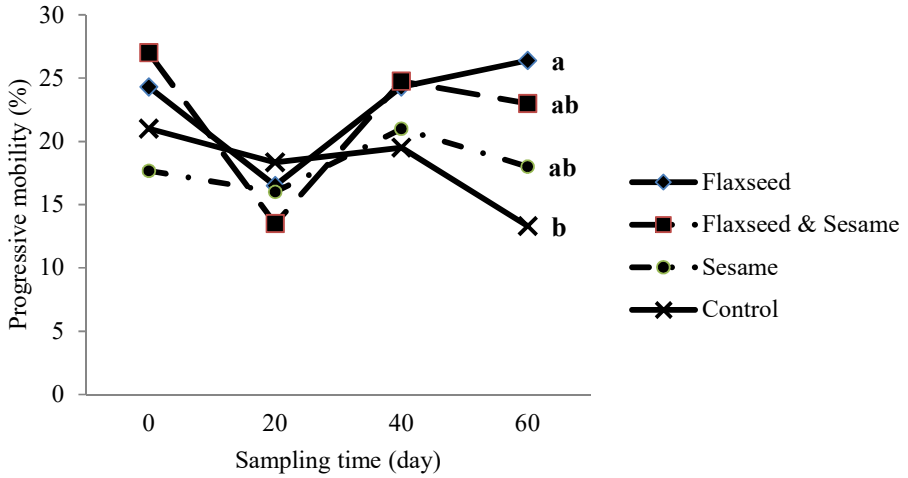

Fig. 1. Progressive sperm motility percentage after thawing frozen semen at different feeding times

شکل ۱- درصد جنبایی پیش‌رونده اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی در زمان‌های مختلف تغذیه

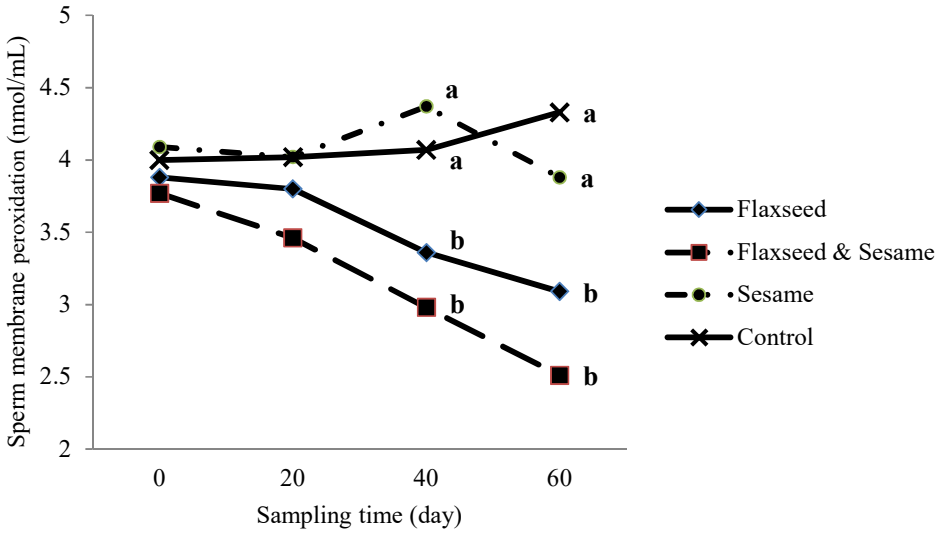

Fig. 2. Sperm peroxidation at different times of feeding oil sources after thawing frozen semen

شکل ۲- پراکسیداسیون اسپرم پس از انجماد و یخ گشایی در زمان‌های مختلف تغذیه منابع روغن

جدول ۶- باروری و جوجه درآوری تخم‌مرغ‌های بارور شده با اسپرم منجمد خروس‌های تغذیه شده با منابع روغن

Table 6. Fertilization and hatching of eggs fertilized by roosters fed with oil sources

	Experimental Diets				
Reproductive traits	Control	Sesame oil	Flaxseed oil	Flaxseed and sesame oil	*P*-value
Fertility[1] (%)	60[c]	70[bc]	80[a]	79[a]	0.02
Hatching[2] (%)	79	80.5	81.5	80	0.08

[1] Fertility percentage on day 10 of incubation was calculated based on the number of incubable eggs in the machine.
[2] Hatching percentage on day 21 of incubation was calculated based on the number of fertilized eggs laid in the machine.
[a-c] Different superscript letters in each row are significantly different (P<0.05)

محققین اظهار داشتند که جیره حاوی روغن کتان در مقایسه با جیره تجاری به‌طور آشکاری سبب افزایش معنی‌دار میزان دکوزا پنتانوئیک اسید و دکوزا هگزانوئیک اسید اسپرم خروس‌ها می‌شوند (Pasha Zanussi et al. 2019). از طرفی، روغن کتان سرشار از اسید لینولنیک است که پیش‌ساز مناسبی برای اسیدهای چرب امگا-۳ بلند زنجیر نظیر دکوزا هگزانوئیک اسید است. محققین افزایش اسید چرب دکوزاترانوئیک اسید در پروفایل اسید چرب اسپرم خروس‌های تغذیه شده با منابع امگا-۳ را نیز گزارش کردند (Kelso et al., 1997). علت عدم افزایش دکوزا هگزانوئیک اسید در پژوهش مذکور را می‌توان به منبع اسید چرب نسبت داد به‌طوری که این محققین از روغن گل مغربی که منبع غنی اسیدچرب امگا-۶ بود استفاده کردند ولی در تحقیق حاضر از روغن کتان که منبع غنی C18:3 است استفاده شده است. همچنین، مشخص شده است که میزان طویل‌سازی دکوزاپنتانوئیک اسید در میکروزمال و متعاقب آن، تبدیل برگشت به دکوزا هگزانوئیک اسید در پروکسیمال بیضه ممکن است خیلی کم یا حتی وجود نداشته باشد. این دیدگاه این حقیقت را حمایت می‌کند که دکوزا تترانوئیک اسید (22:4n-6) به‌عنوان آخرین محصول از طویل سازی و غیراشباع سازی اسید لینولئیک (تیمارهای حاوی روغن کنجد) در اسپرم خروس است و به دکوزا پنتانوئیک اسید تبدیل نمی‌شود. بنابراین، تیمارهای حاوی روغن کنجد در این تحقیق، عملکرد مناسبی در خصوص فراسنجه‌های مختلف اسپرم نشان ندادند. همچنین، متعاقب غنی‌سازی جیره خروس با روغن ماهی که غنی از اسید چرب امگا-۳ بود، اسپرم خروس غنی از دکوزا هگزانوئیک اسید شد، در حالی که علیرغم غنی بودن جیره از ایکوزاپنتانوئیک اسید، این اسید چرب در فسفولیپیدهای اسپرم تشخیص داده نشد (Cerolini et al., 2003). سیالیت از خواص فیزیکی اسپرم است که به حرکت‌های متنوع اسپرم به‌سوی تخمک کمک می‌کند. اسیدهای چرب

PUFA به دلیل دارا بودن چندین پیوند دوگانه، خاصیت انعطاف‌پذیری و سیالیت بیشتری نسبت به اسیدهای چرب اشباع دارند، از این رو با افزودن این اسیدهای چرب در جیره، مقدار آن‌ها در بخش‌های مختلف بدنه، سر و دم اسپرم، افزایش یافته و سبب افزایش جنبایی کل و پیش-رونده اسپرم و در نهایت، بهبود نرخ باروری می‌شود. در مجموع، نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که دستکاری پروفایل اسید چرب اسپرم خروس در جهت افزایش میزان اسید چرب دکوزا هگزانوئیک اسید در آن، با افزودن منابع اسیدچرب امگا-۳ در جیره امکان‌پذیر است و بهبود مولفه‌های اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی این تحقیق در تیمار کتان یا تیمار مخلوط کتان و کنجد را می‌توان به بالا بودن دکوزا هگزانوئیک اسید در اسپرم این تیمارها ربط داد. تعادل در مقدار اسیدهای چرب غیراشباع اسپرم برای حیات و عملکرد مناسب آن ضروری است به‌طوری که با افزایش میزان اسیدهای چرب دکوزا هگزانوئیک اسید برای افزایش سیالیت غشای پلاسمایی و سلول اسپرم، بدن با کاهش در مقدار دکوزا تترانوئیک اسید و آرشیدونیک اسید، این میزان را متعادل می‌کند. نظریه‌های مختلفی در مورد اثر اسیدهای چرب PUFA به‌ویژه دکوزا هگزانوئیک اسید بر افزایش باروری مطرح است، از جمله اثر آن‌ها در ساختار غشای اسپرم، سیالیت و یا سازگاری اسپرم به پراکسیداسیون، به‌طوری که با کمک تغییر فسفولیپیدهای خاص، اسیدهای چرب و یا اصلاح نسبت اسیدهای چرب امگا-۶ به امگا-۳، به‌طور انفرادی یا با هم، از راه بهبود زنده‌مانی، افزایش توانایی حرکت اسپرم در اویدکت (به‌ویژه در مخزن ذخیره اسپرم در مرغ) یا در متصل شدن اسپرم به تخمک یا همه این موارد با هم، موجب بهبود باروری می‌شوند (Blesbois et al. 1997). محققین متعددی اصلاح نسبت اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ جیره و به‌دنبال آن، اصلاح این نسبت در اسپرم جنس نر را روشی برای بهبود کیفیت و عملکرد اسپرم دانسته‌اند که از این راه، بهبود مولفه‌های اسپرم و افزایش نرخ باروری اتفاق خواهد افتاد (Kelso et al. 1997; Surai et al. 2001; Khatibjoo et al. 2011; Feng et al 2015; Safari Asl et al., 2018). جیره‌های معمول و تجاری گله‌های مادر سرشار از اسیدهای چرب امگا-۶ بوده و نسبت بین اسیدچرب امگا-۳ به امگا-۶ در آن‌ها بسیار پایین است. در این تحقیق نیز این نسبت در جیره شاهد یا تجاری (۰/۰۳) و با افزودن منابع خوراکی امگا-۳ مانند روغن کتان به جیره‌های آزمایش این نسبت در تیمار روغن کتان به ۰/۶۲ و در جیره مخلوط روغن کتان و کنجد به ۰/۲۹ افزایش یافت. با توجه به نتایج تحقیقات محققین که پیش‌تر بیان شد، افزایش این نسبت در جیره سبب افزایش معنی‌داری در نسبت امگا-۳ به امگا-۶ پروفایل اسیدچرب اسپرم می‌شود (Pasha Zanussi et al., 2019).

پیشنهاد شده است که میزان مطلق اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ در جیره مرغ مادر گوشتی ممکن است مهم‌تر از میزان نسبت امگا-۳ به امگا-۶ باشد (Khatibjoo et al., 2011). به نظر می‌رسد علاوه بر مقدار مطلق اسیدهای چرب PUFA، نوع (تعداد کربن، باند دوگانه و منبع) اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶، نتایج متفاوتی در کیفیت اسپرم و باروری خروس مادر گوشتی ایجاد می‌کنند، به‌طوری که Safari et al. (2018) مناسب‌ترین نسبت را ۰/۱۶ اعلام نموده و نشان دادند که نسبت ۰/۲۳ تاثیر مثبت چندانی در کیفیت اسپرم نداشته است. Khatibjoo et al. (2011) نیز بهترین نسبت را ۰/۲۵ و Pasha Zanussi et al. (2019) نسبت ۰/۲۹ را اعلام نموده‌اند. در این تحقیق نیز تیمار حاوی روغن کتان با نسبت امگا-۳ به امگا- برابر با ۰/۶۲، نسبتی بهینه بوده است.

فراسنجه مهم دیگری که مورد ارزیابی قرار گرفت، میزان پراکسیداسیون محتوای لیپید غشای اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که کمترین میزان پراکسیداسیون غشای اسپرم در تیمارهای کتان و مخلوط کتان و کنجد بود. بالا بودن ذاتی اسیدهای چرب غیراشباع در ساختار غشای اسپرم و پلاسمای منی، میزان پراکسیداسیون آنها را افزایش می‌دهد، به‌طوری که این مورد یکی از عوامل مهم ناباروری محسوب می‌شود. همچنین، محققین گزارش کردند که علت کاهش باروی با افزایش سن در خروس‌ها، کاهش توان آنتی‌اکسیدانی آن‌ها و به تبع آن، افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید غشایی و کاهش میزان اسیدهای چرب امگا-۶ است (Kelso et al., 1996; Akhlaghi et al., 2014). افزودن منابع اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ به جیره خروس‌های مسن نشان داد که تنها جیره‌هایی که با ویتامین E مکمل شده بودند منجر به افزایش غلظت این ویتامین در غشای اسپرم و پلاسمای منی تازه شده و سبب کاهش نرخ پراکسیداسیون شدند (Pasha Zanussi et al., 2019).

یافته‌های مربوط به فراسنجه‌های زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی با سایر نتایج مربوط به فراسنجه‌های اسپرم مشابه بود، به‌طوری که در بین تیمارها، تیمارهای حاوی روغن کتان و مخلوط کتان و کنجد، بالاترین زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم را داشتند. عواملی چون افزایش میزان دکوزا هگزانوئیک اسید و دکوزا پنتانوئیک اسید در چربی‌های اسپرم، کاهش میزان پراکسیداسیون چربی‌های اسپرم، اصلاح نسبت اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ اسپرم، افزایش انرژی از راه افزایش میزان چربی‌های اسپرم در تیمارهای حاوی روغن کتان و مخلوط کتان و کنجد سبب شد که اسپرم خروس‌های این تیمارها دارای زنده‌مانی و یکپارچگی غشای اسپرم بالاتری بعد از فرآیند انجماد و یخ‌گشایی داشته باشند.

نتیجه‌گیری کلی

هزینه بالای نگهداری خروس‌ها، استفاده از خروس‌های با قابلیت‌های ژنتیکی بالا بدون نگهداری در محل پرورش و بالا بودن هزینه خرید اجداد و مادر گوشتی عواملی هستند که محققان را در استفاده از تلقیح مصنوعی پرندگان تجاری تشویق می‌کنند، اما مشکل عمده استفاده از این راه‌کار در این صنعت، انجماد اسپرم پرندگان تجاری است. راهکارهای متفاوتی برای برون‌رفت از این چالش به‌کار گرفته می‌شود اما رویکرد تغذیه‌ای آن هم دستکاری در محتوای چربی جیره خوراکی، راه‌کاری سودمند و کم خطر برای افزایش ظرفیت انجمادپذیری اسپرم به‌نظر می‌رسد. با توجه به ساختار اسپرم و نوع عملکرد فیزیولوژیکی آن، کارآمدترین روش تغییر در جیره، افزودن منابع اسیدهای چرب PUFA است چرا که کارکردهای چندمنظوره در سلول از جمله منبع انرژی، ایجاد سیالیت و انعطاف‌پذیری غشاء، به‌عنوان پیش‌ساز هورمون‌های جنسی و تحریک سیگنال‌های سلولی را به‌همراه دارد. از این‌رو، مکمل‌سازی جیره با اسیدهای چرب غیراشباع در سن ۴۵ هفتگی که شروع افت باروری در خروس‌ها است می‌تواند نقش چشمگیری در بهبود کیفیت اسپرم بعد از انجماد نیز داشته باشد. با توجه به تاثیر مثبت حاصل از افزودن روغن کتان (دو درصد جیره) یا مخلوط روغن کتان و کنجد(یک درصد از هر کدام) بر بیشتر فراسنجه‌های اسپرم مانند جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، زنده‌مانی، پراکسیداسیون چربی‌های منی و یکپارچگی غشای پلاسمایی و باروری اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی، پیشنهاد می‌شود برای بهبود راندمان باروری در تلقیح مصنوعی مرغ‌های گله‌های مادر از این منابع در جیره خروس‌های گله مولد استفاده شود.

فهرست منابع

Akhlaghi, A., Ahangari, Y. J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z.A., Zhandi, M., Deldar, H., Rezvani, M. R., Dadpasand, M., Hashemi, S. R., & Poureslami, R. (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*, 1236-1244. doi: 10.3382/ps.2013-03617

Al-Daraji, J. H., Al-Mashadani, H. A., Al-Hayani, W. K., Al-Hassani, A. S., & Mirza, H. A. (2010). Effect of n-3 and n-6 fatty acid supplemented diets on semen quality in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). *International Journal of Poultry Science*, *9*(9), 656-663. doi: 10.3923/ijps.2010.656.663

Batista, M., Nino, T., Alamo, D., Castro, N., & Santana, M. (2009). Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*, *71*(8), 1307-1315. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.024

Blesbois, E., Lessire, M., Grasseau, I., Hallouis, H. M., & Hermier, D. (1997). Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biology of Reproduction*, *56*(5), 1216-1220. doi: 10.1016/S0093-691X (03)00207-3

Bongalhardo, D. C., Leeson, S., & Buhr, M. M. (2009). Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. *Poultry Science*, *88*, 1060-1069. doi:10.3382/ps.2008-00392

Botsoglou, N. A., & Fletouris, D. J. (1994). Rapid, sensitive, and specific Thio barbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(9), 1931-1937. doi: 10.1021/jf00045a019

Cerolini, S., Kelso, K. A., Noble, R. C., Speake, B. K., Pizzi, F., & Cavalchini, L. G. (1997). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biology of Reproduction*, *57*, 976-980. doi: 10.1095/biolreprod57.5.976

Cerolini, S., Pizzi, F., Gliozzi, T., Maldjian, A., Zaniboni, L., & 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. doi: 10.1079/WPS20030003

Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M., Akhlaghi, A., Khodaei Motlagh, M., Dadkhah, F., & Dadashpour Davachi, N. (2015). Flow cytometric and microscopic evaluation of post-thawed ram semen cryopreserved in chemically defined home-made or commercial extenders. *Animal Production Science*, *55*, 551-558. doi: 10.1071/AN13215

Evenson, D. P., & Wixon, R., (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*, 532-537. doi: 10.1016/j.taap.2005.03.021

Feng, Y., Ding, Y., Liu, J., Tian, Y., Yang, Y., Guan, S., & Zhang, C. (2015). Effects of dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in the young breeder rooster. *BMC Veterinary Research*, *11*, 73. doi: 10.1186/s12917-015-0394-9

Gliozzi, T. M., Zaniboni, L., & Cerolini, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*, 75(9), 1613-1622. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.01.001

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan,J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, *11*(1), 73-88. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x

Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C, Sparks, N. H. C., & Speake, B. K. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, *106*, 201-206. doi: 10.1530/jrf.0.1060201

Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. H. C., & 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*, *118B*, 65-69. doi:10.1016/S0305-0491(97)00024-2

Khatibjoo, A., Kermanshahi, H., Alimon, R., Golian, A., & Zaghari, M. (2011). Effect of omega6: omega3 fatty acid ratios on semen quality of Malaysian village roosters. *Global Veterinaria*, *6*(2), 213-219.

Long, J. A., (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges?. *Poultry Science*, *85*, 232-236. doi:10.1093/ps/85.2.232

Masoudi, R., Sharafi, M., Zare Shahneh, A., Kohram, H., Nejati-Amiri, E., Karimi, H., Khodaei-Motlagh, M., & Shahverdi, A. (2018). Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, *198*, 193-201. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.019

Naijian, H. R., Kohram, H., Shahneh, A. Z., & Sharafi, M. (2013). Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Small Ruminant Research*, *113*, 371-375. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.03.015

Olubowale, O. S., Greyling, J. P. C., & Ratio, M. B. (2014). Effects of dietary lipid sources on the semen quality of Hy-Line silver-brown cockerels. *The Journal of Animal & Plant Science*, *24*(4), 991-997.

Ommati, M. M., Zamiri, M. J., Akhlaghi, A., Atashi, H., Jafarzadeh, M. R., Rezvani, M. R., & Saemi, F. (2013). Seminal characteristics, sperm fatty acids and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (Salvia officinalis) extract. *Animal Production Science*, *53*, 548-554. doi: 10.1071/AN12257

Pasha Zanussi, H. P., Shariatmadari, F., Sharafi, M., & Ahmadi, H. (2019). Dietary supplementation with flaxseed oil as source of Omega-3 fatty acids improves seminal quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. *Theriogenology*, *130*, 41-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.030

Pasha Zanussi, H., Shariatmadari, F., Sharafi, M., & Ahmadi, H. (2020). The effect of flaxseed and sesame oils in diet on reproductive performance of elderly roosters of broiler breeder flocks. *Animal Production*, *22*(1), 79-92. doi: 10.22059/jap.2019.279366.623389 [In Persian]

Safari Asl, R., Shariatmadari, F., Sharafi, M., Karimi Torshizi, M. A., & Shahverdi, A. (2018). Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged ross breeder roosters fed a diet supplemented with a moderate ratio of n-3: n-6 fatty acids. *Poultry Science*, *97*(11), 4113-4121. doi: 10.3382/ps/pey278

Shahverdi, A., Sharafi, M., Gourabi, H., Yekta, A. A., Esmaeili, V., & Sharbatoghli, M. (2015). Fertility and flowcytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, *83*(1), 78-85. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.07.044

Speake, B. K., Kelso, K., Cerolini, S, Noble, R. C., & Sparks, N. H. C. (1995). Changes in the polyunsaturated fatty acid composition and antioxidant capacity of spermatozoa during ageing in the avian: a relationship with reduced fertility. The Proceedings of 2nd International Congress of ISSFAL, Maryland, USA. P. 64.

Strzezek, J., Fraser, L., Kuklinska, M., & Dziekonska, A. (2004). Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reproductive Biology*, *4*(3), 271-278.

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*, 1024-1050. doi:10.5713/ajas.2001.1024

Towhidi, A., Zeinoaldini, S., Ardebili, R., Dadashpour Davachi, N., & Nasiri, A. H. (2013). Combined n-3 fatty acids and α-tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. *Iranian Journal of Biotechnology*, *11*(4), 238-243.doi: 10.5812/ijb.14469

Yan, L., Bai, X., Fang, Z., Che, L., Xu, S., & Wu, D. (2013). Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. *Lipids Health Disease*, *12*, 33. doi: 10.1186/1476-511X-12-33

Zanini, S. F., Torres, C. A. A., & Bragagnolo, N. (2003). Evaluation of the ratio of ω6: ω3 fatty acids and vitamin E levels in the diet on the reproductive performance of cockerels. *Archives of Animal Nutrition*, *57*(6), 429-442. doi: 10.1080/0003942032000161072

Zhandi, M., & Sharafi, M. (2015) Negative effect of combined cysteine and glutathione in soy lecithin-based extender on post-thawed ram spermatozoa. *Cell Tissue Bank*, *16*(3), 443-448. doi: 10.1007/s10561-014-9488-z