مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۱ (۳۹۱-۳۷۹)

اثر ملاتونین و ویتامین E بر ویژگی‌های منی یخ زده خروس‌های بومی استان فارس

مهرداد معمار[۱]، احمد زارع شحنه[۲*]، سعید زین الدینی[۳]، حمید کهرام[۴] و محمد جواد ضمیری[۵]
۱، دانش آموخته‌ی دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و عضو هیات علمی دانشگاه یاسوج
۲، ۳، ۴، استاد و استادیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵، استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
(تاریخ دریافت : ۹۰/۱۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۱/۶/۲۹)

چکیده

هفتادو دو قطعه خروس ۹ ماهه بومی استان فارس به طور تصادفی به ۳ گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول در برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شد. گروه دوم در برنامه نوری همانند گروه اول نگهداری شدند و روزانه ۳ میلی گرم ملاتونین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به آن‌ها خورانده شد. گروه سوم در برنامه نوری ۲۴ ساعت روشنایی نگهداری شد. از خروس‌های هر سه گروه در ۴ نوبت در فاصله زمانی ۲۰ روز به روش مالش شکمی اسپرم گیری شد و نمونه‌های منی هر ۸ خروس در هر گروه با هم مخلوط شد. به مخلوط منی خروس‌های گروه اول به ترتیب ۴ و ۸ میکرو گرم در میلی لیتر ویتامین E یا ۳ و ۶ میلی مولار ملاتونین افزوده شد. آنگاه نمونه‌های منی خروس های هر سه گروه یخ زده شدند و پس از ۲ هفته یخگشایی شدند. ویژگی‌های منی مانند pH، جنبایی اسپرم، درصد اسپرم زنده، یکپارچگی غشای[۱] اسپرم و غلظت مالون دای آلدهاید [۲] (MDA) پیش از یخ زدن و پس از یخگشایی اندازه گیری شدند. برهم کنش تیمار و فرآیند یخ زدن تنها برای درصد اسپرم زنده وغلظت MDA معنی دار (P<۰/۰۵) بود. افزودن ملاتونین به منی باعث کاهش معنی دار درصد اسپرم زنده نسبت به تیمار شاهد شد در حالی که تنها ویتامین E در غلظت ۴ میکرو گرم در میلی لیتر باعث افزایش معنی دار درصد اسپرم زنده نسبت به تیمار شاهد شد. بیشترین و کمترین غلظت MDA به ترتیب در تیمارهای ۶ میلی مولار ملاتونین و ۴ میکرو گرم در میلی لیتری ویتامین E به دست آمد. یافته های پژوهش کنونی نشان داد که افزودن ویتامین E به منی خروس‌های بومی در مقایسه با افزودن ملاتونین به منی، توانست نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم‌های یخ زده را کاهش دهد و باعث بهبود کیفیت منی پس از یخگشایی شود.

واژه‌های کلیدی: ملاتونین، ویتامین E، منی یخ زده، اسپرم، پراکسیداسیون، خروس

مقدمه

پرندگان اهلی مانند ماکیان، بوقلمون، غاز و اردک در سراسر سال توانایی تولید مثلی دارند هر چند سازه های گوناگونی مانند نژاد، وزن بدن، سن و فصل بر تولید مثل و باروری آن‌ها تاثیر می گذارند. پراکنش فصلی فرآسنجه‌های تولید مثلی، بازتابی از تاثیر سازه‌هایی مانند نور، دما، رطوبت، تغذیه و موقعیت جغرافیایی زیستگاه پرنده است (Meamar & Zamiri, 2005).

1. Membrane Integrity
2. Malondialdehyde

* نویسنده مسئول: احمد زارع شحنه تلفن: ۰۹۱۲۳۶۱۴۲۵۹ E-mail:azareh@ut.ac.ir

یکی از دشواری‌های پرورش صنعتی پرندگان اهلی، ناتوانی در نگهداری طولانی مدت منی است. نگهداری منی پرندگان به شکل مایع یا یخ زده معمولا باعث کاهش برگشت ناپذیر جنبایی و تغییرات مورفولوژیکی اسپرم می‌شود که کاهش باروری را در پی خواهد داشت (Donoghue & Wishart, 2000). یخ زدن اسپرم ماکیان پیشینه‌ای دراز مدت دارد. نخستین گزارش از یخ زدن موفق اسپرم خروس در سال ۱۹۷۸ منتشر شد (Lake & Stewart, 1978) و تاکنون پژوهش‌های فراوانی برای بهبود بازدهی این تکنولوژی انجام شده است (Blesbois et al., 2008; Donoghue (& Wishart, 2000 با این وجود، درجه موفقیت یخ زدن اسپرم پرندگان بالا نیست؛ زیرا سازه‌های فراوانی مانند روش یخ زدن و یخگشایی (Blanco et al., 2000; Chalah et al., 1999)، کیفیت منی پیش از یخ زدن، مقدار ATP ذخیره شده در اسپرم (Long, 2006)، ویژگی‌های بیوفیزیکی و بیولوژیکی اسپرم مانند سیالیت، تراوایی و ترکیبات لیپیدی غشا (Blesbois et al., 2005) و نیز تفاوت‌های گونه‌ای (Blanco et al., 2000; Han et al., 2005) و نژادی (Makhafola et al., 2009) برکارایی این تکنولوژی تاثیر می گذارند. غشای اسپرم پستانداران، ماهی‌ها و پرندگان نه تنها دارای تراکم زیاد لیپیدهای متصل به اتر است بلکه غلظت فسفولیپیدها و استرول‌ها نیز در غشای اسپرم آن‌ها بالا است.

فسفولیپیدهای غشای اسپرم پرندگان سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۶ مانند آراکیدونیک[1] اسید و دوکوزاتترا انوییک اسید[2] است، و از این رو به واکنش پراکسیداسیون بسیار حساس است (Breque et al., 2003). از پی‌آمدهای پراکسیداسیون لیپیدها هنگام نگهداری برون تنی اسپرم، تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش اسیدهای چرب غیراشباع و تغییر سیالیت غشا است. رادیکال‌های آزاد سبب تشدید واکنش‌های پراکسیداسیون می شوند که تخریب پروتین های غشا و کروماتین اسپرم و سرانجام کاهش جنبایی و توان باروری اسپرم را در پی دارد (Zaniboni & Cerolini, 2009). به طور طبیعی، کاهش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشای اسپرم به سه سطح محافظتی وابسته است: الف) آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسمیوتاز[3] (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز[4] (GSH-PX)؛ ب) آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب یا چربی مانند ویتامین‌های C، A، E و اسید اوریک؛ ج) فسفولیپازها، پروتئازها و ترانسفرازها که مسئول ترمیم غشا و حذف ترکیبات حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا هستند (Breque et al., 2003). پژوهش‌های فراوانی (Bucak et al., 2009; Khalili et al., 2009; Pena et al., 2003; Shoae & Zamiri, 2008) برای تعیین تاثیر آنتی اکسیدان‌های گوناگون بر تولید مثل پستانداران انجام شده است؛ که در میان آن‌ها، ویتامین E و سلنیوم نقشی اصلی در حفاظت اسپرم در برابر پراکسیداسیون بر عهده دارند (Breque et al., 2003). در پرندگان، وجود مقدار فراوان اسیدهای چرب غیر اشباع مانند آراکیدونیک اسید و دوکوزا تترا انوییک اسید شرایط مناسبی را برای پیوند ویتامین E به غشا و در نتیجه، حفاظت آن در برابر پراکسیداسیون ایجاد می کند؛ به گونه‌ای که خوراندن ویتامین E به پرنده منجر به افزایش غلظت این ویتامین درغشای اسپرم و پلاسمای منی و نیز کاهش نرخ پراکسیداسیون می شود (Surai et al., 2000; Surai et al., 1998; Surai et al., 1997). روش دیگر برای کاهش نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم افزودن این ویتامین به منی است (Cerolini et al., 2006; Long & Kramer, 2003)، هر چند پژوهش‌های تکمیلی (Surai, 1999; Surai et al., 2000) نشان دادند که خوراندن ویتامین E به پرنده در مقایسه با افزودن آن به منی تاثیر بیشتری بر کاهش پراکسیداسیون غشای اسپرم داشت. از دیگر یافته‌های افزودن این ویتامین به منی، افزایش نرخ جنبایی، درصد اسپرم زنده و باروری در پی نگهداری برون تنی اسپرم است (Ahmadi & Zamiri, 2007; Boostani & Zamiri, 2006; Blesbois et al., 1993; Long &

1. Arachidonic acid (C20:4n-6)
2. Docosatetraenoic acid (C22:4n-6)
3. Superoxide dismutase
4. Glutathione peroxidase

Kramer, 2003). از دیگر آنتی اکسیدان‌های مورد توجه در پژوهش‌های تولید مثلی پرندگان و دام‌ها (Guyomarch et al.,2001; Ramadan et al., 2009; Singh & Haldar, 2007; Soukhtehzari et al., 2009)، هورمون ملاتونین است. گیرنده‌های این هورمون روی نورون ها هیپوتالاموسی کنترل کننده گنادوتروپ‌ها، روی گنادوتروپ‌ها در هیپوفیز پیشین و نیز گنادهای نر و ماده وجود دارند (Reiter et al., 2009) که نشان دهنده اهمیت این هورمون در کنترل کنش‌های دستگاه تولید مثلی آنها است. فزون بر این، ملاتونین با بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند SOD و GSH-PX، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز از راه گیرنده های غشایی، سیتوپلاسمی و یا هسته ای موجب تقویت سیستم آنزیمی-آنتی اکسیدانی سلول می شود. این هورمون هم چنین می تواند به طور مستقیم با از بین بردن رادیکال‌های آزاد به ویژه رادیکال‌های هیدروکسیل و پروکسیل از پراکسید شدن غشای سلول و مرگ آن جلوگیری کند (Rodriguez et al., 2004). درجه تاثیر گذاری این هورمون بر نرخ پراکسیداسیون، جنبایی و درصد اسپرم زنده در شرایط برون تنی، به مقدار این هورمون بستگی دارد (Jang et al., 2010; Succu et al., 2011; Tanyildizi et al., 2006).

از آنجایی که گزارشی درباره افزودن هم زمان ملاتونین به منی و خوراندن آن به خروس با هدف بررسی تاثیر برون تنی و درون تنی آن بر ویژگی‌های منی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم یخ زده داده نشده است، پژوهش کنونی با هدف ارزیابی این آثار و نیز مقایسه آن با تاثیر ویتامین E انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۷۲ خروس بارور ۹ ماهه متعلق به گله مرغ و خروس‌های مرکز مطالعات مرغ بومی فارس استفاده شد. در ابتدا برای خو کردن خروس‌ها به برنامه انزال گیری با روش مالش شکمی، یک دوره ۲ هفته‌ای در نظر گرفته شد. سپس خروس‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۲۴ تایی دسته بندی شدند:

گروه اول با برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی. گروه دوم با همان برنامه نوری گروه اول همراه با دریافت روزانه ۳ میلی‌گرم ملاتونین خوراکی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن که در ساعت ۵ عصر به خروس ها خورانده شد. نمونه ملاتونین مورد استفاده کپسول‌های ۳ میلی گرمی خوراکی ساخت شرکت کانادایی نوتریسنچری[1] بود که پس از حل کردن محتویات کپسول‌ها در آب مقطر، محلول حاصل به وسیله درنچر[2] به مقدار لازم به هر خروس خورانده شد (هم زمان به خروس های گروه های دیگر نیز به همین روش فقط آب مقطر خورانده شد). گروه سوم با برنامه نوری ۲۴ ساعت روشنایی به منظور رساندن غلظت ملاتونین خون به پایین‌ترین سطح ممکن (Cheung et al., 2003).

خروس‌ها در جایگاه های جداگانه روی بستر نگهداری شدند و از ابتدا تا پایان پژوهش با یک نوع جیره غذایی به مقدار ۱۰۰ گرم به ازای هر خروس تغذیه شدند. از خروس‌های این سه گروه در ۴ نوبت به مدت ۶۰ روز، به فاصله‌های ۲۰ روز (زمان تقریبی فرآیند اسپرماتوژنز در خروس) انزال گیری شد. در هر نوبت انزال گیری، نمونه‌های منی دسته ۸ تایی خروس ها در هر گروه با هم مخلوط شدند (نمونه هایی که دارای مدفوع یا خون بودند به مخلوط منی افزوده نشدند). هر کدام از مخلوط های منی دسته ۸ تایی خروس های گروه اول، به ۵ بخش مساوی تقسیم شد و سپس مقدار لازم از رقیق کننده لیک[3] (Lake, 1968) برای رقیق کردن ۱ به ۱ این بخش ها تهیه، و دمای آن‌ها به ۳۹ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. هر یک از محلول‌های رقیق کننده به دوقسمت مساوی تقسیم شدند؛ یک قسمت به آرامی به نمونه منی هربخش افزوده شد و به قسمت دیگر، گلیسرول به شیوه‌ای افزوده شد که غلظت آن در مخلوط نهایی منی و رقیق کننده پیش از یخ زدن ۱۱ درصد باشد (Tselutin et al., 1999). سپس، یکی از این ۵ محلول رقیق کننده که گلیسرول به آن‌ها افزوده شده بود برای رقیق کردن منی تیمار شاهد کنار گذاشته شد و به دیگر محلول‌های رقیق کننده، ویتامین E یا

1. Nutri century
2. Drencher
3. Lake

ملاتونین افزوده شد تا مخلوط نهایی منی و رقیق کننده به تر تیب ۴ و ۸ میکرو گرم در میلی لیتر ویتامین E، یا ۳ و ۶ میلی مولار ملاتونین داشته باشد (ویتامین E با نام تجاری ترولوکس[1] و ملاتونین ساخت شرکت آمریکایی سیگما[2] بودند). برای رقیق کردن مخلوط منی دسته‌های ۸ تایی خروس های گروه‌های دوم و سوم نیز، رقیق کننده لیک تهیه و دمای آنها به ۳۹ درجه سانتی گراد رسانده شد. همانند گروه اول، محلول رقیق کننده به دو بخش مساوی تقسیم و یک قسمت به نمونه منی و به قسمت دیگر، گلسیرول افزوده شد. در این گامه، مخلوط‌های منی و رقیق کننده و نیز محلول‌های رقیق کننده دارای گلیسرول، برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، محلول‌های رقیق کننده دارای گلیسرول در هر گروه به آرامی و قطره قطره به مخلوط‌های منی رقیق شده مربوط به خود افزوده شده و نمونه‌های حاصل دوباره برای ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Tselutin et al., 1999). در پایان این گامه، نمونه‌ها به استراهای دارای حجم ۰/۵ میلی لیتر منتقل وانتهای آن‌ها با پودر پلی وینیل الکل بسته شد. یخ زدن نمونه‌ها با یک روش ابتکاری همانند روش برنامه ریزی شده برای یخ زدن اسپرم پرندگان انجام شد (Tselutin et al., 1999). به طور خلاصه، پس از کنترل دمای درون مخزن ذخیره نیتروژن در ارتفاع های متفاوت از بالای مخزن تا سطح نیتروژن با یک نمونه دماسنج میله‌ای دیجیتال (Alla, France) و نشانه گذاری روی نشانگر (خط کش پلاستیکی)، دمای نمونه‌ها با وارد کردن تدریجی آن‌ها به بخش دارای بخار مخزن نیتروژن به میزان ۷ درجه سانتی گراد در دقیقه تا دمای ۳۵- درجه سانتی گراد، کاهش داده شد و در ادامه نیز با وارد کردن نمونه‌ها به عمق بیشتری از مخزن نیتروژن، دمای نمونه‌ها به میزان ۶۰ درجه سانتی گراد در دقیقه تا دمای ۱۴۰- درجه سانتی گراد کاهش داده شد. آنگاه نمونه‌ها به نیتروژن مایع وارد شدند. پس از ۲ هفته، نمونه‌ها برای ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخ‌گشایی شدند (Chalah et al., 1999)

ویژگی‌های منی مانند pH، جنبایی اسپرم، غلظت اسپرم در منی، درصد اسپرم زنده، درصد یکپارچگی غشای اسپرم و غلظت MDA پیش از یخ زدن و بی درنگ پس از یخ گشایی، اندازه گیری شدند. pH منی با pH متر (8686, A. Z. Co., Taiwan)، جنبایی اسپرم با میکروسکوپ نوری (Leica-Calen, U.S.A.) مجهز به صفحه گرم و با بزرگنمایی ۴۰۰، غلظت اسپرم با هیموسیتومتر(۵)، درصد اسپرم زنده پس از رنگ‌آمیزی با محلول ائوزین- نیگروزین (Bajpai, 1963) و درصد یکپارچگی غشای اسپرم نیز با روش هایپواسمتیک[3] (HOS) (Blanco et al., 2000) اندازه گیری شد.

به طور خلاصه، برای اندازه گیری درصد یکپارچگی غشای اسپرم، ابتدا یک محلول هایپوتونیک سدیم کلراید ۵۰ میلی‌اسمول تهیه شد(۰/۱۵ گرم سدیم کلراید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر). سپس، ۵ میکرولیتر از نمونه منی به ۵۰ میکرولیتر محلول هایپوتونیک افزوده و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنگاه ۵ میکرولیتر از این مخلوط روی لام قرار داده شد و به کمک میکروسکوپ، از بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ اسپرم، تعدادی که دم آنها پیچ خورده بود، شمارش و به صورت درصد گزارش شد.

برای اندازه گیری غلظت MDA ، بخشی از نمونه منی که دارای $۰/۲۵ \times ۱۰^{۹}$ اسپرم بود، پیش ازیخ زدن و پس از یخ گشایی در g × ۹۶۳ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده (CE 148، شرکت شیمی فن، ایران) و پس از جداکردن اسپرم و پلاسمای منی از یکدیگر، اسپرم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Cerolini et al., 2006). غلظت MDA با روش تیوباربیتوریک اسید[4] (TBA) (Esterbauer & Cheesemen, 1990) و با اسپکتروفتومتر (Bausch & Lomb Supertonic 70, Germany) اندازه‌گیری، و به میکروگرم MDA به ازای $۱۰^{۹}$ اسپرم گزارش شد (برای تعیین غلظت MDA از الکل اتانول با درجه خلوص

1. Trolox
2. Sigma
3. Hypo-osmotic swelling test
4. Thiobarbituric acid

۱۰۰ درصد، پودر کریستاله تیوباربیتوریک اسید، سولفوریک اسید ۹۹ درصد، هیدروکسی تولوئن[1] بوتیله شده با ۹۹ درصد درجه خلوص و محلول استاندارد مالون دای آلدهاید ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد). این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۷ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار شامل مخلوط منی ۸ خروس) انجام شد. داده‌ها با Proc Mixed و به کمک نرم‌افزار SAS آنالیز شدند (SAS, 2003). وزن بدن نیز به عنوان متغیر همراه در نظر گرفته شد و میانگین‌ها با رویه حداقل مربعات و تصحیح برای آزمون توکی (P<۰/۰۵) مقایسه شدند.

نتایج

میانگین اثر کلی تیمار، بر ویژگی‌های منی پیش از یخ زدن، در جدول ۱ نشان داده شده است. برای هیچکدام از ویژگی های منی تفاوت معنی داری بین تیمار شاهد و دیگر تیمارها پیش از یخ زدن مشاهده نشد. تنها جنبایی اسپرم در تیماری که خروس ها ملاتونین مصرف کردند، به طور معنی داری کمتر از جنبایی اسپرم در تیماری بود که، خروس ها در روشنایی ۲۴ ساعت نگهداری شدند. اثر کلی تیمار بر ویژگی‌های منی پس از یخگشایی، در جدول ۲ نشان داده شده است. pH منی، درصد اسپرم جنبا و یکپارچگی غشای اسپرم در هیچکدام از تیمارها، تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نشان نداد. درصد اسپرم زنده در تیمارهای دارای ۳ و ۶ میلی مولار ملاتونین در نمونه منی، به طور معنی داری کمتر از تیمار شاهد بود و در تیماری که غلظت ویتامین E در نمونه، ۴ میلی گرم در میلی لیتر بود، به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود. درصد اسپرم زنده در دیگر تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت.

1. Butylated hydroxy-toluene

جدول ۱ – اثر تیمار (افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) بر ویژگی های منی خروس های بومی استان فارس، پیش از یخ زدن. (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار).

ویژگی	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4µg/ml[3]	ویتامین E 8µg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
pH منی	۷/۰۱ a	۷/۰۱ a	۷/۰۱ a	۷/۰۱ A	۷/۰۱ a	۶/۹۶ a	۶/۸۷ a	±۰/۰۳
جنبایی اسپرم٪	۷۷/۲ ab	۷۷/۲ ab	۷۷/۲ ab	۷۷/۲ Ab	۷۷/۲ ab	۶۸/۳ b	۷۹/۲ a	±۲/۲
اسپرم زنده٪	۹۳/۴ a	۹۳/۴ a	۹۳/۴ a	۹۳/۴ A	۹۳/۴ a	۹۴/۷ a	۹۴/۴ a	±۰/۶
یکپارچگی غشای اسپرم٪	۱۸/۰ a	۱۸/۰ a	۱۸/۰ a	۱۸/۰ A	۱۸/۰ a	۱۹/۳ a	۱۹/۹ a	±۱/۱
MDA اسپرم ($\mu g/10^9$ sperm)	۶/۸ a	۶/۸ a	۶/۷ a	۶/۷ A	۶/۷ a	۶/۵ a	۶/۶ a	±۰/۵

a، b و ... : در هر ردیف، میانگین‌هایی که بندواژه (های) همانند دارند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>۰/۰۵).

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکرو گرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

بیشترین و کمترین درصد اسپرم زنده نیز به ترتیب مربوط به تیمارهایی با غلظت ۴ میکروگرم در میلی لیتر ویتامین E و ۶ میلی مولار ملاتونین بود (جدول ۲) . بیشترین و کمترین غلظت MDA مربوط به تیمارهایی بود که به نمونه‌های منی آن‌ها به ترتیب ۶ میلی مولار ملاتونین و ۴ میکرو گرم در میلی لیتر ویتامین E افزوده شده بود و بین همه تیمارهای آزمایشی، تنها این دو تیمار از نظر غلظت MDA تولید شده در

خلال یخ زدن، با تیمار شاهد تفاوت معنی داری داشتند (جدول ۲).

جدول ۲ - اثر تیمار (افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) بر ویژگی های منی خروس های بومی استان فارس، پس از یخگشایی. (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار).

ویژگی	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4μg/ml[3]	ویتامین E 8μg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
pH منی	۶/۹۲ a	۶/۹۴ a	۶/۹۵ a	۷/۰۲ A	۶/۹۵ a	۶/۹۱ a	۶/۸۷ a	±۰/۰۲
جنبایی اسپرم٪	۹/۵۰ a	۶/۳۹ a	۵/۱۵ a	۱۴/۳۳ A	۱۱/۶۶ a	۶/۵۰ a	۵/۸۷ a	±۲/۲
اسپرم زنده٪	۱۱/۹ b	۸/۰ c	۷/۶ c	۱۵/۱ A	۱۳/۷ ab	۱۱/۲ b	۹/۱ b	±۰/۶
یکپارچگی غشای اسپرم٪	۳/۵ a	۲/۴ a	۲/۱ a	۴/۲ A	۴/۱ a	۲/۱ a	۲/۵ a	±۱/۱
MDA اسپرم ($\mu g/10^9$ sperm)	۲۴/۴ b	۲۵/۴ b	۲۸/۴ a	۱۹/۴ C	۲۳/۴ b	۲۵/۸ b	۲۵/۴ b	±۰/۵

a، b و ... : در هر ردیف، میانگین‌هایی که بندواژه (های) همانند دارند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>۰/۰۵)

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکرو گرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

بر همکنش تیمار و نوبت نمونه برداری تنها برای غلظت MDA معنی دار بود(P=۰/۰۰۵۴). پیش از یخ زدن، تیمار ها از لحاظ غلظت MDA در هیچکدام از نوبت های نمونه برداری تفاوت معنی داری با یکدیگر و همچنین با تیمار شاهد نداشتند (جدول ۳).

ولی پس از یخگشایی، در همه نوبت‌های نمونه برداری، تیمارهای دارای ۴ میکروگرم در میلی لیتر ویتامین E و ۶ میلی مولار ملاتونین با یکدیگر تفاوت معنی داری نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۳ ـ برهمکنش تیمار (افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) و نوبت نمونه برداری (روز) ، بر غلظت MDA ($\mu g/10^9$ sperm) اسپرم خروس های بومی استان فارس، پیش از یخ زدن. (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار).

نوبت نمونه برداری (روز)	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4μg/ml[3]	ویتامین E 8μg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
اول (۰)	^{a}۶/۰ $_A$	^{a}۶/۲۷ $_A$	^{a}۵/۷۸ $_A$	^{a}۵/۷۸ $_A$	^{a}۵/۷۸$_A$	^{a}۷/۳۹ $_A$	^{a}۵/۹۶ $_A$	±۰/۹
دوم (۲۰)	^{a}۹/۴۹$_A$	^{a}۹/۴۹$_A$	^{a}۹/۴۹$_A$	^{a}۹/۴۹$_A$	^{a}۹/۴۹$_A$	^{a}۶/۶۰$_A$	^{a}۹/۵۳$_A$	±۰/۹
سوم (۴۰)	^{a}۵/۸۸$_A$	^{a}۵/۸۸$_A$	^{a}۵/۸۸$_A$	^{a}۵/۸۸$_A$	^{a}۵/۸۸$_A$	^{a}۶/۱۱$_A$	^{a}۵/۳۵$_A$	±۰/۹
چهارم (۶۰)	^{a}۵/۷۷$_A$	^{a}۵/۷۶$_A$	^{a}۵/۷۸$_A$	^{a}۵/۷۷$_A$	^{a}۵/۷۷$_A$	^{a}۵/۹۴$_A$	^{a}۵/۸۸$_A$	±۰/۹

A، a و ... : در هر ردیف (بند واژه های بزرگ) یا در هر ستون (بند واژه های کوچک) میانگین‌هایی که بند واژه‌های همانند دارند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>۰/۰۵).

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکرو گرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

جدول۴ ـ برهمکنش تیمار (افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) و نوبت نمونه برداری (روز) بر غلظت MDA ($\mu g/10^9$ sperm) اسپرم خروس های بومی استان فارس، پس از یخگشایی منی (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار).

نوبت نمونه برداری (روز)	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4µg/ml[3]	ویتامین E 8µg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
اول (۰)	$_{AB}$۲۵/۰^{a}	$_{AB}$۲۶/۸۸^{a}	^{a}۳۰/۹۵$_{A}$	$_{B}$۲۳/۳۵^{a}	$_{AB}$۲۷/۵۰^{a}	^{a}۲۷/۹۶$_{AB}$	$_{B}$۲۴/۲۷^{a}	±۰/۹
دوم (۲۰)	$_{A}$۲۷/۳۸^{a}	$_{A}$۲۵/۷۴^{a}	$_{A}$۳۰/۲۲^{a}	$_{B}$۲۱/۲۳^{ab}	$_{AB}$۲۵/۸۳^{a}	$_{A}$۲۸/۵۳^{a}	$_{AB}$۲۲/۹۵^{a}	±۰/۹
سوم (۴۰)	$_{A}$۲۱/۹۵^{a}	$_{A}$۲۳/۸۴^{a}	$_{A}$۲۶/۲۵^{a}	$_{B}$۱۶/۰۶^{b}	$_{AB}$۲۰/۳۷^{b}	$_{A}$۲۴/۴۲^{ab}	$_{A}$۲۷/۷۸^{a}	±۰/۹
چهارم (۶۰)	$_{A}$۲۳/۲۶^{a}	$_{A}$۲۵/۲۸^{a}	$_{A}$۲۶/۱۸^{a}	$_{B}$۱۶/۸۳^{b}	$_{AB}$۱۹/۷۹^{b}	$_{A}$۲۲/۰۸^{b}	$_{A}$۲۶/۷۴^{a}	±۰/۹

A، a و ... : در هر ردیف (بند واژه های بزرگ) یا در هر ستون (بند واژه های کوچک) میانگین‌هایی که بند واژه‌های همانند دارند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>۰/۰۵).

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکروگرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

برهمکنش تیمار و فرآیند یخ زدن نیز تنها برای درصد اسپرم زنده (P<۰/۰۰۰۱) و غلظت MDA (P<۰/۰۰۰۱) معنی دار بود. پس از یخگشایی، درصد اسپرم زنده در خروس‌هایی که در ۲۴ ساعت روشنایی نگهداری شده بودند و یا روزانه ۳ میلی گرم ملاتونین خوردند، تفاوتی با خروس‌های شاهد نداشت اما افزودن ۳ و ۶ میلی مولار ملاتونین به نمونه‌های منی باعث کاهش معنی دار درصد اسپرم زنده نسبت به شاهد شد. افزودن ۴ میکرو گرم ویتامین E در میلی لیتر به نمونه منی نیز باعث افزایش معنی دار اسپرم‌های زنده نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۵). در همه تیمارها، غلظت MDA پس از یخگشایی افزایش معنی داری یافت. کمترین و بیشترین غلظت MDA نمونه‌های یخگشایی شده به ترتیب در نمونه‌های منی دارای ۴ میکرو گرم ویتامین E در میلی لیتر و ۶ میلی مولار ملاتونین دیده شد. تنها این دو تیمار با تیمار شاهد تفاوت معنی داری داشتند (جدول ۶).

جدول ۵ – برهمکنش تیمار (افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) و فرآیند یخ زدن بر درصد اسپرم زنده خروس های بومی استان فارس (میانگین حداقل مربعات ± انحراف معیار).

فرآیند یخ زدن	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4µg/ml[3]	ویتامین E 8µg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
پیش از یخ زدن	$_{A}$۹۳/۴^{a}	$_{A}$۹۳/۴^{a}	$_{A}$۹۳/۴^{a}	$_{A}$۹۳/۴^{a}	$_{A}$۹۳/۴^{a}	$_{A}$۹۴/۷^{a}	$_{A}$۹۴/۴^{a}	±۰/۶
پس از یخگشایی	$_{B}$۱۱/۹^{b}	$_{C}$۸/۰^{b}	$_{C}$۷/۶^{b}	$_{A}$۱۵/۱^{b}	$_{AB}$۱۳/۷^{b}	$_{B}$۱۱/۲^{b}	$_{B}$۹/۱^{b}	±۰/۶

A، a و ... : در هر ردیف (بند واژه های بزرگ) یا در هر ستون (بند واژه های کوچک) میانگین‌هایی که بند واژه‌های همانند دارند، تفاوت آماری معنی‌داری ندارند (P>۰/۰۵).

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکرو گرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

جدول ۶ – برهمکنش تیمار(افزودن ملاتونین یا ویتامین E به منی و یا خوراندن ملاتونین یا روشنایی ۲۴ ساعته) و فرآیند یخ زدن بر غلظت MDA اسپرم ($\mu g/10^9$ sperm) خروس های بومی استان فارس (میانگین حداقل مربعات ± خطای معیار).

فرآیند یخ زدن	تیمار							خطای معیار
	شاهد	ملاتونین 3mM[1]	ملاتونین 6mM[2]	ویتامین E 4μg/ml[3]	ویتامین E 8μg/ml[4]	ملاتونین 3mg/kgBW[5]	روشنایی ۲۴ ساعته	
پیش از یخ زدن	$_A$۶/۸^b	$_A$۶/۸^b	$_A$۶/۷^b	$_A$۶/۷^b	$_A$۶/۷^b	$_A$۶/۵^b	$_A$۶/۷^b	±۰/۵
پس از یخگشایی	$_B$۲۴/۴^a	$_B$۲۵/۴^a	$_A$۲۸/۴^a	$_C$۱۹/۴^a	$_B$۲۳/۴^a	$_B$۲۵/۸^a	$_B$۲۵/۴^a	±۰/۵

A، a و ... : در هر ردیف (بند واژه های بزرگ) یا در هر ستون (بند واژه های کوچک) میانگین‌هایی که بند واژه‌های همانند دارند، تفاوت آماری معنی-داری ندارند (P>۰/۰۵).

1 و 2 غلظت ملاتونین (میلی مولار) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

3 و 4 غلظت ویتامین E (میکرو گرم در میلی لیتر) افزودنی به مخلوط منی خروس ها.

5، ملاتونین خوراکی که روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به هر خروس خورانده شد.

بحث

برهم کنش تیمار و فرآیند یخ زدن بر جنبایی اسپرم معنی دار نبود (P>۰/۰۵). همانند یافته‌های پیشین در خروس‌های بومی فارس (Boostani & Zamiri, 2006) و خروس‌های کورنیش (Blesbois et al., 1993)، ویتامین E اثر معنی داری بر جنبایی اسپرم نداشت. بی تاثیر بودن ملاتونین خوراکی برجنبایی اسپرم نیز یافته‌های (Luboshitzky et al., 2002) مربوط به خوراندن قرص های ۳ میلی گرمی ملاتونین دار به انسان را تایید می کند. افزودن ملاتونین به منی خوک و نگهداری آن برای ۷ روز به صورت مایع نیز، تغییری در جنبایی اسپرم ایجاد نکرد (Martin et al., 2011).

اظهار نظر قطعی درباره اثر ملاتونین بر جنبایی اسپرم آسان نیست زیرا تاکنون نتایج متفاوتی در این زمینه گزارش شده است. ملاتونین، در برخی (Tanyildizi et al., 2006) پژوهش‌ها باعث کاهش و در برخی دیگر (Ashrafi et al., 2011; Succu et al., 2011) باعث افزایش جنبایی اسپرم شد و در شماری (Balo da Silva et al., 2011; Faigl et al., 2009; Luboshitzky et al., 2002; Martin et al., 2011; Sliwa & Stochmal, 2001) نیز بی تاثیر بود. افزایش جنبایی اسپرم (Ashrafi et al., 2011; Succu et al., 2011) به اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم، و کاهش جنبایی آن (Tanyildizi et al., 2006) به کاهش ورود کلسیم به اسپرم به دلیل مهارتشکیل cAMP به وسیله ملاتونین نسبت داده شد. اما آنچه که از یافته‌های این پژوهش‌ها مشهود است، تفاوت اثر ملاتونین بر جنبایی اسپرم وابسته به روش استفاده (درون تنی و برون تنی)، مقدار و مدت مجاورت اسپرم با ملاتونین، تاثیرات ناشناخته ترکیبات پلاسمای منی بر عملکرد ملاتونین، تفاوت در کمیت و کیفیت اولیه نمونه‌های منی، و حتی تفاوت‌های بین گونه‌ای است به طوری که در پژوهشی جدیدتر (Balo da Silva et al., 2011) علت بی تاثیر بودن ملاتونین بر جنبایی اسپرم اسب به نبود گیرندهای نوع M1 و M2 ملاتونین روی اسپرم نسبت داده شد. برهم کنش تیمار و فرآیند یخ زدن بر درصد اسپرم‌های زنده معنی دار بود (P<۰/۰۵) تیمارهای آزمایشی پیش از یخ زدن از لحاظ درصد اسپرم های زنده با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (P>۰/۰۵) ولی فرآیند یخ زدن باعث کاهش معنی دار این فراسنجه در همه‌ی تیمارها شد (جدول ۵). از بین تیمارهای آزمایشی، تنها افزودن ۴ میکرو گرم ویتامین E در میلی لیتر باعث افزایش معنی دار (P=۰/۰۲۶) درصد اسپرم‌های زنده پس از یخگشایی نسبت به شاهد شد که با توجه به یکسان بودن اثر فرآیند یخ زدن بر کاهش درصد اسپرم های

زنده‌ی همه‌ی تیمارها، می توان افـزایش درصـــد اسپرم‌های زنده پس از یخگشایی را در این تیمار، به اثر محافظتی این غلظت از ویتامین E (۴ میکرو گرم در میلی لیتر) در کاهش آسیب به اسپرم، طی فرآیند یخ زدن نسبت داد.

افزودن همین مقدار ویتامین E به منی خروس‌های بومی فارس و نگهداری آن به مدت ۲۴ ساعت به صورت مایع در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی گراد نیز باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده شد (Ahmadi & Zamiri, 2007). در پژوهش‌های پیشین (Michael et al., 2007; Nasiri et al., 2012; Taylor et al., 2009) غلظت‌های دیگری از ویتامین E به تنهایی یا همراه با آنتی اکسیدان‌های دیگر برای نگهداری اسپرم یخ زده به منی افزوده شد. یافته‌های این پژوهش‌ها، نشان دهنده تاثیر وابسته به مقدار این ویتامین بر درصد اسپرم‌های زنده بود. ویتامین E با جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع غشای اسپرم، موجب افزایش تراوایی غشا و افزایش زنده‌مانی اسپرم می شود (Ahmadi & Zamiri, 2007). از سوی دیگر، این ویتامین با کند کردن نرخ اکسیداسیون لیپیدها و کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد، از افزایش آسیب به DNA اسپرم و بیان ژن‌های مسئول مرگ آن در دوره نگهداری به شکل یخ زده جلوگیری می کند (Jeong et al., 2009).

افزودن ملاتونین به منی پیش از یخ زدن باعث کاهش معنی دار (P<۰/۰۵) درصد اسپرم زنده پس از یخگشایی نسبت به تیمارشاهد شد. یافته‌های همانندی پس از افزودن ۱ میکرو مولار ملاتونین به منی خوک و نگهداری ۷ روزه آن به شکل مایع، گزارش شده است (Martin et al., 2011). با این وجود، در پژوهشی دیگر (Du Plessis et al., 2010)، افزودن ۲ میلی مولار ملاتونین به منی انسان ونگهداری آن به مدت ۲ ساعت به شکل مایع، باعث افزایش درصد اسپرم‌های زنده شد. به نظر می رسد غلظت پایانی ملاتونین در منی، تنها علت تفاوت یافته‌های این پژوهش‌ها نباشد بلکه تفاوت های بین گونه‌ای از نظر تاثیر گذاری ملاتونیـن بر کنش‌های غشا و اندامک های درون سلولی اسپرم (Reiter et al., 2009)، در مدت نگهداری برون تنی نیز، می تواند علت دیگر این تفاوت باشد.

برهم کنش تیمار و فرآیند یخ زدن بر غلظت MDA معنی دار بود (P<۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی پیش از یخ زدن از لحاظ غلظت MDA با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۶) پس از یخگشایی از بین تیمارهای آزمایشی، تنها افزودن ۴ میکروگرم ویتامین E در میلی لیتر باعث کاهش غلظت MDA در طول زمان نگهداری منی یخ زده نسبت به تیمار شاهد شد در حالی که غلظت بالاتر ویتامین E تاثیری بر غلظت MDA نداشت، یافته‌های همانندی نیز (Douard et al., 2004; Long & Kramer 2003) پس از افزودن ویتامین E به منی بوقلمون و نگهداری آن برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است.

ویتامین E با پیوند به رادیکال‌های آزاد پروکسیل وتشکیل هیدروپراکسید از پیشرفت واکنش‌های پراکسیداسیون جلوگیری می کند. هیدروپرکسیدها ترکیباتی ناپایدار هستند که به رادیکال‌های آزاد دیگر و آلدهیدهای سمی تبدیل می شوند. از سویی، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز وابسته به سلنیوم با تبدیل هیدروپراکسیدها به ترکیبات غیرسمی عملکرد آنتی اکسیدانی ویتامین E را افزایش می دهد (Combs, 1998). بنابراین، با توجه به منبع محدود این آنزیم در سلول، لازم است که برای عملکرد بهینه آنتی اکسیدانی ویتامین E در نگهداری برون تنی اسپرم، به ویژه هنگام استفاده از مقدار زیاد آن، به طور هم زمان از عناصر تقویت کننده سیستم آنزیمی– آنتی اکسیدانی مانند سلنیوم (Torkaman, 2007) یا ترکیب‌هایی مانند ملاتونین استفاده کرد که باعث افزایش بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیدان در اسپرم می شوند (Rodriguez et al., 2004). ملاتونین یکی از ترکیبات شناخته شده در مهار پراکسیداسیون لیپیدهاست که عملکرد آن در سلول به عنوان یک آنتی اکسیدان، به غلظت آن وابسته است (Reiter et al., 2009)؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که بی تاثیر بودن ملاتونین درکاهش MDA در این پژوهش نیز به همین علت باشد. از سوی دیگر، عملکرد بهینه آنتی اکسیدان‌ها در غلظت‌های معینی انجام می شود و افزایش غلظت آن‌ها باعث معکوس شدن عملکرد آن از یک آنتی اکسیدان به یک محرک اکسیداسیون می شود (Cao & Cutler, 1993). به نظر می رسد که افزایش

معنی دار غلظت MDA در تیمار ۶ میلی مولاری ملاتونین و نیز کاهش هم زمان درصد اسپرم زنده نسبت به تیمار شاهد در این پژوهش به همین علت باشد.خوراندن ملاتونین به خروس‌ها و تابش روشنایی ۲۴ ساعته نیز تاثیری بر غلظت MDA تولیدی در نمونه‌های یخ زده نداشت. به نظر می‌رسد علت این یافته، افزایش نیافتن غلظت ملاتونین منی در مقایسه با تیمار شاهد باشد؛ زیرا غلظت ملاتونین در منی ۳ گروه آزمایشی تفاوت معنی داری نشان نداد این در حالی است که غلظت ملاتونین خون در خروس‌هایی که ملاتونین مصرف کردند، نسبت به خروس‌های شاهد افزایش معنی داری (P<۰/۰۰۰۱) داشت و در خروس هایی که در روشنایی ۲۴ ساعت نگهداری شدند تغییر معنی داری مشاهده نشد (یافته های منتشر نشده). به نظر می‌رسد علت عدم افزایش غلظت ملاتونین در منی خروس‌هایی که ملاتونین مصرف کردند؛ عملکرد اختصاصی سلول‌های سرتولی[1] و مایویید[2] در ایجاد سد خونی-بیضه‌ای برای جلوگیری از انتقال ملاتونین خون به منی باشد (Zamiri, 2006). یافته‌های پژوهش کنونی نشان داد که تنها افزودن ویتامین E به منی خروس‌های بومی در مقایسه با افزودن ملاتونین به منی یا خوراندن آن به خروس‌ها توانست نرخ پراکسیداسیون لیپیدهای غشای اسپرم‌های یخ زده کاهش دهد و باعث بهبود کیفیت منی پس از یخگشایی شود.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که در تامین بخشی از هزینه های این پژوهش ما را حمایت کردند (طرح شماره ۸۴۳۱۷۱) تشکر و قدردانی می شود. همچنین از معاونت بهبود تولیدات دامی و مسئولان مرکز مطالعات مرغ بومی سازمان جهاد کشاورزی استان فارس برای در اختیار گذاشتن امکانات انجام این پژوهش سپاسگزاری می شود .از آقای مهندس سید محمد رضا هاشمی عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس و کارکنان مزرعه پرورش مرغ بومی فارس در خرامه نیز برای همکاری بی دریغ در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می شود.

1. Sertoli
2. Myoid

REFERENCES

1. Ahmadi H. & Zamiri M. J. (2007). Effect of vitamin A and C on viability and fertility of Fars native chicken sperm stored at 4-5º C. In: Proceedings of the *2nd Congress on Animal and Aquatic Sciences*, Karaj, Iran, pp. 1477-1479. (In Farsi).
2. Ashrafi I., Kohram H., Haijian H., Bahreini M. & Poorhamdolallah M. (2011). Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5ºC. *African Journal of Biotechnology*, 10, 6670-6674.
3. Baipai P. K. (1963). The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. *Poultry science*, 42, 462-465.
4. Balo da Silva C. M., Macias-Garcia B., Miro-Moran A., Gonzalez-Fernandez L., Morillo-Rodriguez A., Ortega-Ferrusola C., Gallardo-Bolanos J. M., Stilwell G., Tapia J. A. & Pena F. J. (2011). Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 51, 172-179.
5. Blanco J. M., George G., Wildt D. E. & Donghue A. M. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 63, 1164-1171.
6. Blesbois E., Grasseau I. & Seigneurin F. (2005). Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction*, 129, 371-378.
7. Blesbois E., Grasseau I. & Blum J. C. (1993). Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4ºC. *Theriogenology*, 39, 771-779.
8. Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Jalme M. S. & Milano-Richard M. M. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chicken. *Theriogenology*, 69, 252-261.
9. Boostani A. & Zamiri M. J. (2006). Effect of vitamin E addition to diluent on characteristics and fertility of semen in Fars native chicken, stored for 6 or 24 h at 4-5 or 24-29 degrees C. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 37(2), 333-340. (In Farsi).

10. Breque C., Surai P. & Brillard J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development, 66, 314-323.*
11. Bucak M. N., Sariozkan S., Tuncer P. B., Ulutas P. K. & Akcadage H. I.. (2009). Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 81, 90-95.
12. Cao G. & Cutler R. G. (1993). High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Archives of Gerontology and Geriaterics*, 17,189-201.
13. Cerolini S., Zaniboni L., Maladgian 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, 877-886.
14. Chalah T., Seigneurin F., Blesbois E. & Brillard J. P. (1999). In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*, 39, 185-191.
15. Cheung K., Poon A., Wang T. & Leong J. C. (2003). Effect of melatonin suppression on scoliosis development in chickens by either constant light or surgical pinealectomy. *Spine*, 28, 1941-1944.
16. Combs J. F. (1998). *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health* (2nd ed.), pp. 200-206. USA, San Diego, California: Academic Press, Harcourt Brace Company.
17. Donoghue A. M. & Wishart G. J. (2000). Storage of poultry semen. A review. *Animal Reproduction Science*, 62, 213-232.
18. Douard V., Hermier D., Magistrini M., Labbe C. & Blesbois E. (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. *Theriogenology*, 61, 1-13.
19. Du Plessis S. S., Hagenaar K. & Lampiao F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia*, 42, 112-116.
20. Esterbauer M. & Cheeseman K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
21. Faigl V., Keresztes M., Kulcsar M., Nagy S., Keresztes Z., Amiridis G. S., Solti L., Huszenicza G. & Cseh S. (2009). Testicular function and semen characteristics of Awassi rams treated with melatonin out of the breeding season. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 531-540.
22. Guyomarch C., Lumineau S., Vivien-Roels B., Richard J. P. & Deregnaucourt S. (2001). Effect of melatonin supplementation on the sexual development in European quail (*Coturnix coturnix*). *Behavioural Processes*, 53, 121-130.
23. Han X. F., Niu Z. Y., Liu F. Z. & C. S. Yang. (2005). Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science*, 4, 197-201.
24. Jang H., Kim Y., Park I., Cheng H., Kim J., Park C., Kong H., Lee H. & Yang B. (2010). Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 943-950.
25. Jeong Y. J., Kim M. K., Song H. J., Kang E. J., Ock S. A., Kumar B. M., Balasubramanian S. & Rho G. J. (2009). Effect of α-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58, 181-189.
26. Khalili B., Farshad A., Zamiri M. J., Rashidi A. & Fazeli P. (2009). Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 22, 1614-1619.
27. Lake P. E. (1968). Observations of freezing fowl spermatozoa in liquid nitrogen. In: Proceedings of the. *14th World Poultry Congress*, Madrid, Spain, Vol. 2, pp. 279-282.
28. Lake P. E. & Stewart J. M. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen – an improved method. *British Poultry Science*, 19, 187-194.
29. Long J. A. 2006. Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*, 85, 232-236.
30. Long J. A. & Kramer M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid- stored turkey semen. *Poultry Science*, 82, 1802-1807.
31. Luboshitzky R., Shen-Orr Z., Nave R., Lavie S. & Lavie P. (2002). Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *Journal of Andrology*, 23, 572-577.
32. Makhafola M. B., Lehloenya K. C., Mphaphathi M. L., Dinnyes A. & Nedamble T. L. (2009). The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African Journal of Animal Science*, 39 (1), 242-245.
33. Martin D., Hidalgo F. J., Baron M. J., Bragado P., Carmona A., Robina A, Garcia-Marin L. J. & Gill M.

C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17ºC. *Theriogenology* 75, 1550-1560.
34. Meamar M. & Zamiri M. J. (2005). Seasonal variation of semen characteristics and fertility in native Fars roosters. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 36(3), 581-590. (In Farsi).
35. Michael A., Alexopoulos C., Ponitiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P. & Boscos C. (2007). Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68, 204-212.
36. Nasiri A. H., Towhidi A., & Zeinoaldini S. (2012). Combined effect of DHA and α-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, 44, 550-555.
37. Pena J. F., Johannisson A., Wallgren M., Martinez H. R. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78, 85-98.
38. Ramadan T. A., Taha T. A., Samak M. A. & Hassan A. (2009). Effectiveness of exposure to long day followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*, 71, 458-468.
39. Reiter R. J., Tan D. X., Manchester L. C., Paredes S. D., Mayo J. C. & Saniz R. M. (2009). Melatonin and reproduction revisited. A mini review. *Biologly of Reproduction*, 81, 445-446.
40. Rodriguez C., Mayo J. C., Sainz R. M., Antolin I., Herrera F., Martin V. & Reiter R. J. (2004). Regulation of antioxidative enzymes: a significant role for melatonin. A mini review. *Journal of Pineal Research*, 36, 1–9.
41. SAS. (2003). *SAS User's Guide. Statistics. Version 9.1 ed.* SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
42. Shoae A. & Zamiri M. J. (2008). Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science*, 104, 414-418.
43. Singh S. S. & Haldar C. (2007). Peripheral melatonin modulates seasonal immunity and reproduction of Indian tropical male bird (*Perdicula asiatica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 146, 446-450.
44. Sliwa L. & Stochmal E. (2001). The effect of melatonin on directional motility of human sperm under in vitro conditions. *Folia Medica Cracoviensia*, 42, 123-128.
45. Soukhtehzari A., Vojgani M., Niasari Naslaji A., Bahonar A. R. & Gholami G. R. (2009). Influence of melatonin treatment on scrotal circumference and semen parameters in Shal rams on out of season. *Journal of Veterinary Research*, 63, 297-300.
46. Succu S., Berlinguer F., Pasciu V., Satta V., Leoni G. & Naitana S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50, 310-318.
47. Surai P. (1999). Vitamin E in avian reproduction. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 10, 1-6.
48. Surai P. F., Kutz E., Wishart G. J., Noble R. & Speake B. K. (1997). The relationship between dietary provision of alpha-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effect on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Journal of. Reproduction and Fertility*, 110(1), 47-51.
49. Surai P. F., Kustejuk I. A., Wishart G., Macpherson A., Speake B., Noble R. C., Ionov I. A. & Kutz E. (1998). Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on gluthatione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. *Biology of Trace Element Research*, 64, 119-132.
50. Surai P. F., Brillard J. P., Speake B. K., Blesbois E., Seigneurin F. & Sparks N. H. (2000). Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*, 53, 1025-1039.
51. Tanyildizi S., Bozkurt T., Ciftici O. & Sakin F. (2006). In vitro effects of melatonin on hyaluronidase activity and sperm motility in bull semen. *Turkish. Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 89-93.
52. Taylor K., Roberts P., Sanders K. & Burton P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 18, 184-189.
53. Torkaman F. (2007). *Effect of dietary L-selenomethionine and addition of α-tocopherol to the semen diluent on chicken sperm strored at 4-5 °C.* M.Sc. thesis, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. (In Farsi).
54. Tselutin K., Seigneurine F. & Blesbois E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*, 78, 586-590.
55. Zamiri M. J. 2006. *Physiology of Reproduction* (1st ed.), pp. 14-15. Iran, Rasht: Haghshenas publication.

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