15(2) 149-156, Summer 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effects of different selenium sources on sperm quality parameters in aged broiler breeder roosters

Morteza Asghari Moghadam [1], Seyed Raza Hashemi [1*], Mehran Mehri [2], Amir Karamzadeh Dehaghani [3], Homa Davoodi [4]

[1]*Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
[2]*Department of Animal Science, Faculty of Agricalture, Zabol University, Zabol, Iran*
[3]*Department of Animal Science, Faculty of Agricalture, University of Tehran, Karaj, Iran*
[4]*Department of Immunology, Faculty of Medical Science, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran*

Key Words
Rooster
Nano-bio
Selenium
Sperm

Abstract

Introduction: In order to improve fertility, selenium supplementation serves as an important consideration in animals' diets. The impacts of selenium supplementation depend on the source and quantity of selenium in the diet, so this study was performed to evaluate the effects of different selenium sources on sperm quality parameters in aged broiler breeder roosters (BBR).
Materials & methods: The study took place over a 40-day period; for the first two weeks, all birds received the same basal diet, and then for the next 40 days, the roosters were fed the experimental diets containing different sources (i.e., sodium selenite, organic selenium, and selenium nano-biochelate) and levels of selenium (i.e., 0, 0.15, 0.30, and 0.45 mg/kg). Every ten days, sperm was collected from the BBR by the belly rub method. The collected sperm was evaluated for several qualitative parameters such as volume, concentration, viability, and plasma membrane function. Each parameter was assessed using the General Linear Model (GLM) procedure of SAS 9.4 software.
Results: The results of the present study showed that supplementing the diet with selenium at a level of 0.30 mg/kg, regardless of its source, led to an increase in the concentration and motility percentage of sperm, as well as a decrease in the percentage of abnormal sperm. Furthermore, the plasma membrane function of sperm was also enhanced following the addition of selenium to the diet. These findings suggest that selenium supplementation, particularly at a level of 0.30 mg/kg, may improve sperm quality parameters and promote fertility in aged BBR.
Conclusion: The present study indicated that the dietary supplementation of selenium, particularly at a level of 0.30 mg/kg, has a positive impact on the reproductive performance of old roosters. The results revealed that the organic form of selenium, such as Selmax and selenium nano-biochelate were more effective than sodium selenite, a popular inorganic form of selenium, in enhancing the fertility of the roosters.
Conclusion: Deterministic simulation was quite effective for determining the most suitable nucleus size leading to genetic improvement of six-month weight quite close to optimal state, reducing costs of scheme and including as many sheep as possible in base.

* Corresponding Author's email: hashemi711@yahoo.co.uk
Received: 31 January 2023; Reviewed: 4 March 2023; Revised: 7 May 2023; Accepted: 10 June 2023
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.397488.2975

مقاله پژوهشی

تاثیر منابع مختلف سلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی مسن

مرتضی اصغری‌مقدم[۱]، سیدرضا هاشمی[*۱]، مهران مهری[۲]، امیر کرم‌زاده‌دهاقانی[۳]، هما داوودی[۴]*

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[۳] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۴] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

کلمات کلیدی

خروس
نانو بایو
سلنیوم
اسپرم

چکیده

مقدمه: یکی از روش‌های بهبود در باروری، مکمل‌سازی عناصری نظیر سلنیوم به جیره است. اثرات مکمل‌سازی سلنیوم متفاوت است و شدیداً تحت تأثیر منبع و مقدار سلنیوم جیره قرار می‌گیرد، لذا این پژوهش به‌منظور تاثیر منابع مختلف سلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی مسن انجام شد.

مواد و روش: این پژوهش با استفاده از ۱۲۰ قطعه خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ با سن ٤٥ هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با چند نمونه در هر واحد آزمایشی ۱۰ تیمار با ٤ تکرار و ۳ پرنده در داخل هر تکرار اجرا شد. سه منبع مختلف سلنیوم شامل سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم، هر کدام در سه سطح صفر، ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/٤٥ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره افزوده شدند. بعد از دو هفته تغذیه با جیره پایه، خروس‌ها به‌مدت ٤٠ روز و از ابتدای سن ٤٧ هفتگی تیمارهای آزمایشی را دریافت کردند. هر ۱۰ روز یک‌بار اسپرم‌گیری به‌روش مالش شکمی از خروس‌ها صورت گرفت سپس فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌ها شامل حجم منی، غلظت، درصد جنبایی، درصد زنده‌مانی، درصد ناهنجاری و درصد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از رویه GLM و نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد.

نتایج: در مطالعه حاضر، افزودن سلنیوم به‌جیره در سطح ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، صرف نظر از منبع آن، موجب افزایش غلظت، درصد جنبایی، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم و کاهش درصد ناهنجاری اسپرم شد. در این مطالعه تغییری در حجم منی با افزودن سلنیوم به جیره خروس‌های مسن مشاهده نشد، هم‌چنین غلظت، جنبانی، زندمانی و عملکردغشای پلاسمایی اسپرم، در روز ٤٠ آزمایش در خروس‌های دریافت‌کننده ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم از منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر زمان‌ها بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که شکل آلی سلنیوم (منابع سلمکس و نانوبایوکیلات‌سلنیوم) نسبت به شکل معدنی (سلنیت‌سدیم)، در سطح ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره باعث بهبود عملکرد تولیدمثلی خروس‌های مسن می‌شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hashemi711@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۱۱ بهمن ۱٤۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۳ اسفند ۱٤۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۱۷ اردیبهشت ۱٤۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۲۰ خرداد ۱٤۰۲
(DOI): 10.22034/AEJ.2023.397488.2975

مقدمه

باروری یکی از مهم‌ترین خصیصه‌های تضمین‌کننده سودآوری در صنعت طیور است و خروس‌ها نقش برجسته‌ای در این امر دارند (۱). خروس‌ها در سن ۴۰-۳۲ هفتگی به بیش‌ترین میزان باروری خود می‌رسند، اما در حدود سن ۴۵ هفتگی قدرت باروری آن‌ها کاهش می‌یابد که می‌تواند بر سودآوری گله تأثیر منفی داشته باشد (۲۷). برای به حداکثر رساندن منافع اقتصادی، صنعت طیور همیشه انتظار می‌رود خروس‌ها کیفیت اسپرم خود را برای مدت طولانی‌تری حفظ کنند. از این‌رو، چگونگی بهبود کیفیت اسپرم در خروس‌های مسن به یک مسئله مهم تبدیل شده است. تغذیه تأثیر زیادی بر کیفیت و کمیت اسپرم دارد و از این رو غنی‌سازی جیره با ترکیباتی چندعملکردی، یکی از راهکارهای مقابله با کاهش باروری در خروس‌های مسن است (۳). سلنیوم به‌عنوان جزیی از آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون پراکسیدازها و سلنوپروتئین‌ها، نقش کلیدی در بسیاری از فرآیندهای بیولوژی نظیر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، باروری، متابولیسم تیروئید و عملکرد سیستم ایمنی دارد (۱). برخی مطالعات نشان می‌دهند که سلنیوم می‌تواند شانس باروری و تعداد سلول‌های سرتولی را افزایش دهد (۳۳). لذا به‌نظر می‌رسد مکمل‌سازی سلنیوم در جیره خروس‌ها، روند کاهش باروری در اثر افزایش سن را کاهش می‌دهد. در طبیعت سلنیوم به دو شکل آلی و معدنی وجود دارد. سلنیوم معدنی در سه حالت اکسید شده شامل سلنیت (Se4+)، سلنات (Se6+)، و سلنید (Se2-) وجود دارد (۱). استفاده از شکل معدنی سلنیوم محدودیت‌های مختلفی ازجمله پتانسیل سمیت، جذب ضعیف، برهمکنش با سایر مواد معدنی و اجزای جیره، و ناتوانی در تأمین و حفظ ذخایر سلنیوم در بدن را به همراه دارد. از این‌رو، استفاده از سلنیت سدیم مورد بحث است (۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که سلنیوم آلی مانند سلنوآمینواسیدها، زیست فراهمی بیش‌تری نسبت به سدیم سلنات (۱۴). با این‌حال، در حال حاضر، شکل نانو سلنیوم به‌علت زیست فراهمی بسیار بالاتر و سمیت کم‌تر نسبت به فرم‌های آلی و معدنی، جذابیت بیش‌تری پیدا کرده است. زیرا این ذرات نانومتری دارای ویژگی‌های منحصر به فردی ازجمله فعالیت سطحی بالا، مراکز فعال سطحی بی‌شمار، کارایی کاتالیکی بالا و توانایی جذب قوی و سمیت پایین هستند. هم‌چنین، از آن‌جا که با کاهش اندازه ذرات، نسبت سطح به حجم افزایش می‌یابد، نانوذرات سلنیوم فعالیت بیولوژیکی بالاتری نظیر ویژگی ضدرادیکال هیدروکسیل و اعمال محافظتی علیه اکسیداسیون DNA دارند (۳). لذا به‌نظر می‌رسد نانوسلنیوم کارایی بیش‌تری نسبت به دو شکل دیگر سلنیوم در جلوگیری از کاهش باروری خروس‌های مسن داشته باشد و نیازمند بررسی است. غلظت اسپرم، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز، غلظت هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون، درصد سلول‌های زنده و باروری با افزودن نانوسلنیوم و سلنیوم آلی به جیره خروس‌های مسن افزایش می‌یابد و هم‌چنین شکل نانو این عنصر نسبت به شکل دیگر (معدنی و آلی) توانایی بیش‌تری در بهبود عملکرد تولیدمثلی دارد (۴). اثرات مکمل‌سازی سلنیوم متفاوت است و شدیداً تحت تأثیر منبع و مقدار سلنیوم جیره قرار می‌گیرد یکی از راهکارها برای بهبود باروری، مکمل‌سازی عناصری نظیر سلنیوم به جیره است (۱۳، ۱۴). لذا این پژوهش به‌منظور تاثیر منابع مختلف سلنیوم بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس‌های مادر گوشتی مسن انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر با استفاده از ۱۲۰ قطعه خروس مادر گوشتی راس ۳۰۸ با وزن ۹۲/۹۹±۵۱۸۷/۱۷ گرم و سن ۴۵ هفته در مزرعه آموزشی و تحقیقاتی دانشگاه زابل انجام شد. خروس‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۴ تکرار و ۳ نمونه به ۴۰ پن آزمایشی منتقل شدند. طول مدت آزمایش‌ها ۶۰ روز و برنامه نوری نیز به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت خاموشی اعمال و دمای سالن در محدوده ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سه منبع مختلف سلنیوم شامل سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم)، سلنیوم آلی (سلمکس) و نانو بایوکیلات سلنیومُ (بن‌داسل، توسعه بن دافرآور، ایران) هر کدام در سه سطح ۰، ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره افزوده شدند. تیمارهای آزمایشی بعد از دو هفته تغذیه با جیره پایه و عادت‌دهی خروس‌ها به شرایط جدید در سن ۴۷ هفتگی اعمال شد. برای تهیه تیمارهای آزمایشی، مقدار سلنیوم مورد نیاز از منابع مختلف براساس مقدار جیره پایه تهیه شده محاسبه و در مقدار کمی خوراک مخلوط شد. عمل مخلوط شدن با جیره پایه، تا رسیدن به دوز مورد نظر و اطمینان از یکنواختی منبع سلنیوم در جیره با میکسر ادامه داشت. خروس‌ها به‌مدت ۴۰ روز و از ابتدای سن ۴۷ هفتگی تیمارهای آزمایشی را دریافت کردند لازم به‌ذکر است که جیره پایه، فاقد مکمل سلنیوم بوده و سایر نیازهای غذایی مطابق جدول استاندارد احتیاجات غذایی خروس مادر گوشتی فرموله گردید (جدول ۱). به‌منظور بررسی تأثیر سطوح و منابع مختلف سلنیوم بر کیفیت اسپرم هر ۱۰ روز یک‌بار اسپرم‌گیری به‌روش مالش شکمی از خروس‌ها صورت گرفت. هم‌چنین برای حذف اثرات فردی، منی جمع‌آوری شده از هر سه خروس مربوط به یک جایگاه با هم مخلوط و به‌عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد (۲).

جدول ۱: ترکیب جیره پایه و مواد مغذی خروس‌های مادر گوشتی

مواد خوراکی	مقدار (٪)
ذرت	۶۵/۴۲
کنجاله سویا (۴۲/۱۶٪)	۶/۵۰
سبوس گندم	۲۳/۸۰
روغن ذرت	۱/۰۰
دی کلسیم فسفات	۱/۳۰
صدف	۰/۹۴
جوش شیرین	۰/۱۰
نمک طعام	۰/۳۲
مکمل معدنی[۱]	۰/۲۵
مکمل ویتامینی[۲]	۰/۲۵
دی-ال-متیونین (۹۹٪)	۰/۱۲
مجموع	۱۰۰
ترکیب مواد مغذی	
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری/کیلوگرم)	۲۷۰۰
پروتئین خام٪	۱۱/۵۴
کلسیم٪	۰/۷۳
فسفر قابل دسترس٪	۰/۳۴
سدیم ٪	۰/۱۷
متیونین٪	۰/۳۱

۱- مکمل معدنی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین کرد: منگنز (منگنز اکسید) ۱۲۰ میلی‌گرم، آهن (سولفات آهن) ۵۰ میلی‌گرم، مس (سولفات مس) ۱۰ میلی‌گرم، ید (پتاسیم یدات) ۲ میلی‌گرم، روی (اکسید روی) ۱۱۰ میلی‌گرم. ۲- مکمل ویتامینی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین کرد: ویتامین A (ویتامین A استات) ۱۲۰۰۰ IU، ویتامین D3 ۳۵۰۰ IU، ویتامین E (دی‌ال-آلفا-توکوفرول استات) ۱۰۰ IU، ریبوفلاوین ۱۲ میلی‌گرم، نیاسین ۵۰ میلی‌گرم، پنتوتنیک اسید ۱۳ میلی‌گرم، پیریدوکسین (پیریدوکسین هیدروکلراید) ۶ میلی-گرم، فولیک اسید ۲ میلی‌گرم، کوبالامین ۰/۰۳ میلی‌گرم، بیوتین ۰/۶۶ میلی‌گرم.

جدول ۲: ترکیبات رقیق‌کننده بلستویل تعدیل یافته

ترکیب شیمیایی	مقدار
دی پتاسیم فسفات	۷/۵۹گرم در لیتر
سدیم گلوتامات	۸/۶۷ گرم در لیتر
فروکتوز	۵ گرم در لیتر
سدیم استات	۳/۲ گرم در لیتر
تریس	۳/۲ گرم در لیتر
پتاسیم سیترات	۰/۶۴ گرم در لیتر
مونو پتاسیم فسفات	۰/۷۰ گرم در لیتر
کلراید منیزیم	۰/۳۴ گرم در لیتر
گلیسرول	۳ درصد
لسیتین	۰/۵۰ درصد

تمامی مواد از شرکت مرک آلمان تهیه شده بود.

جهت رقیق کردن منی برای بررسی شاخصه‌های کیفی اسپرم، از رقیق‌کننده بلستویل تعدیل یافته (جدول ۲) با pH ۷/۴ واسمولاریته ۳۱۰ میلی اسمول در کیلوگرم استفاده شد (۲). شاخصه‌هایی که در طول آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفتند، به‌شرح زیر می‌باشد: برای بررسی حجم منی، اسپرم‌گیری از خروس‌ها به‌روش Quinn و Burrows انجام شد (۱۰). منی از سطح آلت تناسلی به‌داخل میکروتیوب جمع‌آوری و حجم آن تعیین شد. برای شمارش تعداد اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر از لام هموسایتومتر استفاده شد (۲). برای این کار، منی که به‌خوبی مخلوط شده بود با آب مقطر به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از منی رقیق‌شده به‌آرامی زیر لام هموسایتومتر منتقل شد، و بعد از حدود ۵ دقیقه با استفاده از میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی کل ۴۰۰×، اسپرم‌ها شمارش شدند. برای شمارش اسپرم‌ها، مربع بزرگ مرکزی را انتخاب کرده و سپس اسپرم‌های موجود در پنج مربع از ۲۵ مربع بزرگ، شمارش شدند. به هنگام شمارش فقط اسپرم‌هایی که در درون این مربع‌ها بودند شمارش شدند. غلظت اسپرم‌ها در یک میلی‌لیتر از طریق رابطه ذیل محاسبه شد:

۱۰۰۰۰×۵×تعداد اسپرم‌ها در ۵مربع = غلظت اسپرم در یک میلی‌لیتر

جهت به‌دست آوردن تعداد اسپرم‌ها در ۲۵ مربع، تعداد اسپرم‌ها در ۵ مربع در عدد ثابت ۵ ضرب شدند. هم‌چنین، ۱۰۰۰۰ از حاصل تقسیم یک میلی‌لیتر (۱۰۰۰ میکرولیتر) بر ۰/۱ میکرولیتر حجم ۲۵ مربع مرکزی به‌دست آمده است. تحرک اسپرم به‌روش Santiago Moreno و همکاران با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳، ۳۰). برای تعیین جنبایی اسپرم، منی خروس‌ها با رقیق‌کننده بلستویل تعدیل یافته به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شد. برای جلوگیری از شوک سرمایی به اسپرم، دمای رقیق‌کننده، منی، لام و لامل یکسان بود. پس از رقیق‌کردن منی، جنبایی اسپرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× به شیوه چشمی در ۵ میدان دید مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده متوسط تا سریع به‌عنوان اسپرم‌های جنبا درنظر گرفته شد. یکپارچگی غشاء پلاسمایی اسپرم و و ناهنجاری آن به‌روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴). رنگ ائوزین-نیگروزین از ترکیب یک‌قسمت محلول ائوزین ۴ درصد (۴ گرم در ۹۶ میلی‌لیتر ۲/۹ درصد سدیم سیترات) با سه قسمت محلول ۸ درصد نگروزین (۸گرم نگروزین در ۹۲ میلی‌لیتر ۲/۹ درصد سدیم سیترات) تولید شد. برای بررسی یکپارچگی غشاء اسپرم ۱۰ میکرولیتر رنگ ائوزین-نگروزین روی لام قرار داده، سپس با ۱۰ میکرولیتر منی رقیق شده (۱:۲۰) به‌خوبی با پیپیتینگ به‌مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شد. بعد از مخلوط شدن، بلافاصله با لام دیگر منی رنگ شده گسترش داده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته شد. پس از خشک‌شدن، اسلایدها با عدسی روغنی

و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش رنگ آمیزی اسپرم‌های مرده به‌دلیل نقص در غشاء، رنگ را جذب کرده و قرمز می‌شوند درحالی‌که اسپرم‌های زنده با غشاء یکپارچه، رنگ را به‌خود نمی‌گیرند. دویست عدد اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های زنده و با غشاء یکپارچه و مرده با غشاء گسیخته مشخص شد. اسلایدهای تهیه‌شده برای ارزیابی زنده‌مانی نیز، برای بررسی مورفولوژی اسپرم مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که با شمردن ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید اسپرم‌هایی با دم پیچیده، دم دوتایی، دم‌های غیرطبیعی، سرهای بدون دم و سر دوتایی به‌عنوان اسپرماتوزوای ناهنجار در نظر گرفته شد. عملکرد غشاء پلاسمایی اسپرم با استفاده از تست تورم‌هایپواسمتیک (Hypo Osmotic Swilling Test:HOST) ارزیابی شد (۳۰). بدین‌منظور، ۱۰ میکرولیتر نمونه منی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول هاست (یک گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اسمولاریته ۱۰۰ملی اسمول در کیلو گرم) آمیخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، قطره‌ای از نمونه روی لام گرم ریخته شده و با رنگ ائوزین- نگروزین بر لام گسترده شد (۲۵، ۳۶). پس از رنگ‌آمیزی، لام در زیر میکروسکوپ با عدسی روغنی و بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× مشاهده شد. تعداد ۲۰۰ اسپرم به‌ازای هر اسلاید شمارش شد. با توجه به این‌که اسمولاریته مورنیاز برای اسپرم ۳۷۵-۳۲۰ میلی‌مول است، اسپرم با قرارگیری در این محیط به‌سرعت واکنش داده و انتهای دم آن گره می‌خورد. بر پایه این آزمایش، اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده به‌عنوان اسپرم سالم با عملکرد غشاء پلاسمایی مناسب و اسپرم‌هایی که واکنشی نسبت به محلول هاست نشان نداده‌اند به عنوان اسپرم مرده و با غشاء فاقد عملکرد درنظر گرفته شدند. آزمایش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با چندنمونه در هر واحد آزمایشی ۱۰ تیمار با ۴ تکرار و ۳ پرنده در داخل هر تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌های پیوسته با استفاده از رویه GLM و نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. میانگین‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات (LS means) گزارش شده و توسط آزمون چند دامنه‌ای توکی در سطح معنی‌داری ۵ درصد موردمقایسه قرار گرفتند. P مساوی یا کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار درنظر گرفته شد. مدل آماری جهت آنالیز داده‌های پژوهش به‌صورت زیر می‌باشد:

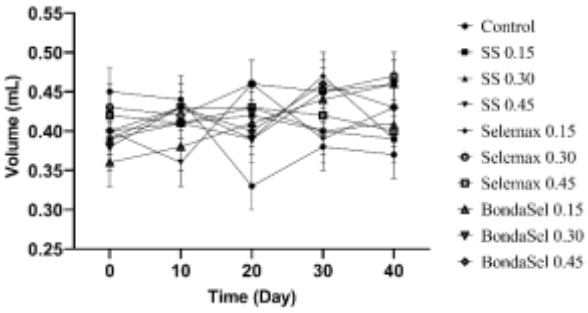
$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در آن yij، هر مشاهده از فراسنجه مورد اندازه‌گیری؛ μ، میانگین جامعه؛ Ti، اثر تیمار و eij، اثر باقی‌مانده یا اشتباه آزمایشی است.

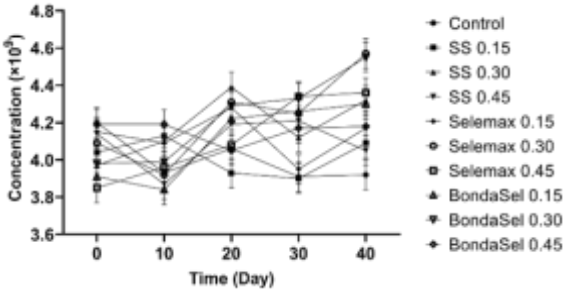
نتایج

در مطالعه حاضر، افزودن سلنیوم به جیره در سطح ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، صرف نظر از منبع آن، موجب افزایش غلظت اسپرم، افزایش درصد جنبایی، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم، کاهش درصد ناهنجاری اسپرم شد. با این‌حال، شکل آلی سلنیوم (منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم) نسبت به شکل معدنی (سلنیت سدیم)، عملکرد بهتری در بهبود فراسنجه‌های مورد بررسی نشان دادند. لذا به‌نظر می‌رسد افزودن سلنیوم، به‌خصوص سلنیوم آلی، به جیره خروس‌های مسن با بهبود عملکرد تولیدمثلی همراه باشد. با توجه به جدول ۴ در مطالعه حاضر، تغییری در حجم منی با افزودن سلنیوم به جیره خروس‌های مسن مشاهده نشد. در پژوهش حاضر، مکمل‌سازی سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌ترتیب موجب افزایش غلظت اسپرم به‌مقدار ۴/۵، ۵/۸ و ۵/۸ درصد شد و این تغییرات در روز ۴۰ آزمایش صورت گرفت. هم‌چنین، نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف سلنیوم درخصوص غلظت اسپرم وجودندارد؛ با این‌حال از نظر عددی، این فراسنجه‌ها در خروس‌های دریافت‌کننده سلنیوم آلی و نانوسلنیوم آلی بیش‌تر بود که ممکن است به‌خاطر زیست فراهمی بالاتر این ترکیبات نسبت به شکل معدنی سلنیوم باشد. در این مطالعه، افزودن سلنیوم به دو شکل معدنی و آلی، درصد جنبایی (تقریباً ۳/۴، ۶/۷ و ۷/۵ درصد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم)، زنده‌مانی (تقریبا ۴/۵، ۷/۷ و ۸ درصد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم) و عملکرد غشای پلاسمایی (تقریباً ۴/۹، ۱۰ و ۱۰/۷ درصد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم) اسپرم خروس‌های مسن را افزایش داد. براساس یافته‌های پژوهش حاضر، درصد اسپرم‌ها نابهنجار با مکمل‌سازی سلنیوم آلی کاهش یافت.

اثر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر کیفیت اسپرم در زمان‌های مختلف: همان‌طورکه در شکل ۱ نشان داده شده است، حجم منی در زمان‌های مختلف تحت تاثیر مکمل‌سازی سلنیوم قرار نگرفت (P>۰/۰۵). با توجه به شکل ۲ غلظت اسپرم در روز ۴۰ آزمایش در خروس‌های دریافت‌کننده ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم از منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شاهد و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم بود ولی تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها نداشت (P>۰/۰۵؛ شکل ۲).

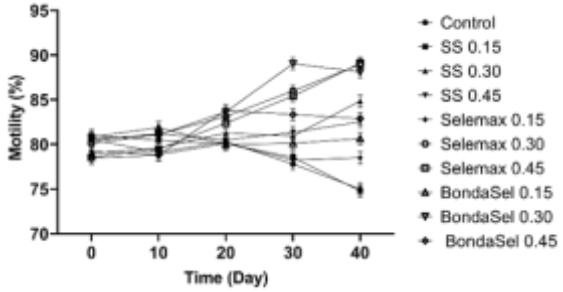


شکل۱: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر حجم منی در زمان‌های مختلف

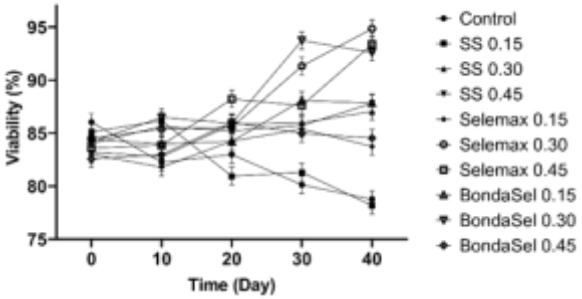


شکل ۲: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر غلظت اسپرم در زمان‌های مختلف

شکل ۳، نشان داد شد جنبایی اسپرم در روز ۳۰ آزمایش در خروس‌های دریافت‌کننده ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم‌در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شاهد، سطوح مختلف سلنیت سدیم و سطح ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بود($P\leq$۰/۰۵؛شکل ۳). هم‌چنین در روز ۴۰ آزمایش،بیش‌ترین درصد جنبایی اسپرم مربوط به گروه‌های ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم‌آلی بود که نسبت به سایر گروه‌ها، به‌جز گروه ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم اختلاف معنی‌داری داشت ($P\leq$۰/۰۵؛ شکل ۳). مکمل‌سازی سلنیت‌سدیم‌در سطوح ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و نانو بایوکیلات سلنیوم در سطوح ۰/۱۵ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم، باعث افزایش درصد جنبایی نسبت به گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم، در روز ۴۰ آزمایش شده بود ($P\leq$۰/۰۵؛ شکل ۳). با توجه به شکل ۴ درخصوص زنده‌مانی اسپرم تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری از روز ۲۰ آزمایش مشاهده شد (شکل ۴). درصد زنده‌مانی اسپرم، در روز ۲۰ آزمایش، در گروه ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم بود ($P\leq$۰/۰۵)، ولی بین سایر تیمارها تفاوتی مشاهده نشد (شکل ۴). در روز ۳۰ آزمایش، درصد زنده‌مانی در گروه شاهد کم‌ترین و در گروه ۰/۳۰ میلی‌گرم‌در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم بیش‌ترین بود؛ با این‌حال، تفاوت معنی‌داری بین ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم‌نانوبایوکیلات‌سلنیوم مشاهده‌نشد (شکل ۴). درصد زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم در روز ۴۰ آزمایش، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گروه‌ها بود؛هم‌چنین سطوح ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم، ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۱۵ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شاهدو ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم بود ($P\leq$۰/۰۵؛ شکل ۴).



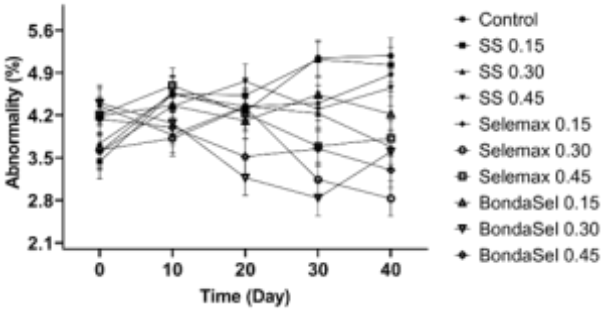
شکل ۳: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر درصد جنبایی اسپرم در زمان‌های مختلف



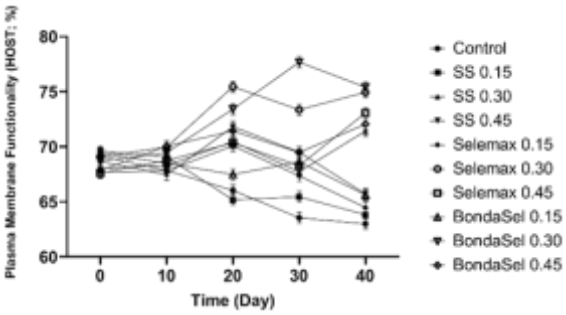
شکل ۴: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های مختلف

درشکل ۵ درصد ناهنجاری اسپرم در گروه‌های ۰/۳۰ میلی‌گرم سلنیوم از منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌طور معنی‌داری از گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم در روز ۳۰ آزمایش کم‌تر بود، درحالی‌که بین سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>$۰/۰۵؛ شکل ۵). در روز ۴۰ آزمایش و نسبت به گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم، کم‌ترین درصد ناهنجاری اسپرم در گروه‌های ۰/۳۰

میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم مشاهده شد (P≤۰/۰۵؛ شکل ۵).



شکل ۵: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر درصد ناهنجاری اسپرم در زمان‌های مختلف



شکل ۶: تاثیر سطوح مختلف سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم بر درصد علمکرد غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های مختلف

در شکل ۶ درخصوص عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم در روز ۲۰ آزمایش کم‌ترین درصد مربوط به گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم و بیش‌ترین درصد این فراسنجه مربوط به ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی بود (P≤۰/۰۵)؛ هم‌چنین، تفاوت معنی‌داری درخصوص درصد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم بین گروه‌های دریافت‌کننده ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم وجود نداشت (P>۰/۰۵؛ شکل ۶). با این‌حال، در روز ۳۰ آزمایش، بیش‌ترین درصد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم، نسبت به سایر گروه‌ها، مربوط به گروه ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم بود و هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها با گروه‌های شاهد و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم مشاهده شد (P≤۰/۰۵؛ شکل ۶). درصد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم در روز ۴۰، در گروه‌های شاهد، ۰/۱۵ و ۰/۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیت سدیم، ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم آلی و ۰/۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو بایوکیلات سلنیوم ، نسبت به سایر گروه‌ها، کم‌ترین بود و بیش‌ترین درصد این فراسنجه در گروه‌های دریافت‌کننده ۰/۳۰ میلی‌گرم سلنیوم از منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم یافت شد (P≤۰/۰۵؛ شکل ۶).

بحث

با توجه به جدول ۴ در مطالعه حاضر، تغییری در حجم منی با افزودن سلنیوم به جیره خروس‌های مسن مشاهده نشد که مشابه با نتایج مطالعات قبلی است (۴، ۱۵، ۲۰). با این‌حال، در مطالعه Khalili و همکاران (۲۰۲۱)، بهبودی در حجم منی در خروس‌های مسن (۶۴ هفته) تحت چالش دگزامتازون با مکمل‌سازی سلنیوم به‌مدت ۱۰ هفته مشاهده شد (۲۳). هم‌چنین، با افزودن مخمر غنی از سلنیوم به جیره خروس‌های مسن نیز حجم منی بهبود یافته بود (۲۹). در پژوهش حاضر، مکمل‌سازی سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌ترتیب موجب افزایش غلظت اسپرم به‌مقدار ۴/۵، ۵/۸ و ۵/۸ درصد شد و این تغییرات در روز ۴۰ آزمایش صورت گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که مدت زمان طولانی‌تری برای مشاهده اثرات مثبت سلنیوم بر غلظت اسپرم مورد نیاز است و با یافته‌های مطالعه قبلی مطابقت دارد (۲۳). هم‌چنین، گزارش شده است که مکمل‌سازی سلنیوم اثرات مثبتی بر تکوین سلول‌های سمینی‌فروس دارد و موجب افزایش زنده‌مانی سلول‌های سرتولی و کاهش آپوپتوز سلول‌های زایا می‌گردد که برآیند این اثرات بهبود تولید اسپرم است (۱۹، ۳۱، ۳۲). مطالعات گذشته نیز افزایشی در غلظت اسپرم با افزودن سلنیوم مشاهده کردند که هم‌سو با نتایج این مطالعه است (۱۵، ۳۱، ۱۸، ۱۲، ۸، ۴). نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین منابع مختلف سلنیوم درخصوص غلظت اسپرم وجود ندارد؛ با این‌حال از نظر عددی، این فراسنجه‌ها در خروس‌های دریافت کننده سلنیوم آلی و نانوسلنیوم آلی بیش‌تر بود که ممکن است به‌خاطر زیست‌فراهمی بالاتر این ترکیبات نسبت به شکل معدنی سلنیوم باشد. با قرار گرفتن اسپرم در معرض بیش از حد رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا رخ می‌دهد که یک واکنش خودتکثیر اتوکاتالیستی است و با اختلال در جنبایی، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم همراه است. در این راستا، نشان داده شده است که رادیکال‌های آزاد تأثیر به‌شدت منفی بر جنبایی و درصد اسپرم‌های با غشای پلاسمایی سالم دارند و می‌توانند کیفیت اسپرم خروس را کاهش و توانایی باروری آن را کاهش دهند (۲۸). از سوی دیگر، در مراحل اولیه اسپرماتوژنز، اعتقاد بر این است که GPX4 از اسپرم در حال تکوین در برابر آسیب DNA ناشی از تنش اکسایشی محافظت می‌کند و در مراحل بعدی،

این سلنوپروتئین از طریق پیوند متقابل با پروتئین‌ها و ایجاد یکپارچگی در بخش میانی اسپرم، به‌جزء ساختاری از غلاف میتوکندری اطراف تاژک تبدیل می‌شود که برای ثبات و تحرک اسپرم ضروری است(۲۶). لذا افزودن سلنیوم می‌تواند موجب بهبود غلظت، جنبایی و زنده‌مانی اسپرم شود. در این مطالعه، افزودن سلنیوم به دو شکل معدنی و آلی، درصد جنبایی (تقریباً ۳/۴، ۶/۷ و ۷/۵ درصد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم)، زنده‌مانی (تقریباً ۴/۵، ۷/۷ و ۸ درصد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم) و عملکرد غشای پلاسمایی (تقریباً ۴/۹، ۱۰ و ۱۰/۷ درد به‌ترتیب برای سلنیت سدیم، سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم) اسپرم‌خروس‌های مسن را افزایش داد. هم‌سو با نتایج این مطالعه، اخیراً نشان داده شده است که مکمل‌سازی سلنیوم آلی به جیره خروس‌ها موجب بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم می‌شود (۹). بررسی تأثیر افزودن سلنیوم مخمری به جیره خروس‌های مادر گوشتی مسن (۵۲ هفته) نشان داد که این ترکیب موجب بهبود جنبای، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم می‌شود (۲۹). افزایش درصد جنبایی، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم با مکمل‌سازی سلنیوم در این مطالعه با مطالعات دیگری نیز مطابقت‌داشت(۳۱، ۱۲، ۵، ۳). همان‌طورکه در این بررسی یافت شد. هم‌سو با نتایج مطالعات قبلی (۳، ۱۱، ۱۲، ۱۷، ۳۴)، در مطالعه حاضر نشان داده شد که منابع آلی سلنیوم نسبت به منبع معدنی در بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسپرم موثرتر هستند، که احتمالاً به‌خاطر زیست‌فراهمی بیش‌تر شکل آلی سلنیوم می‌باشد. تفاوتی بین شکل نانوسلنیوم‌آلی نسبت به سلنیوم آلی درخصوص درصد جنبایی و زنده‌مانی در مطالعه حاضر یافت نشد که برخلاف یافته‌های مطالعه قبلی است (۴). در این مطالعه، شکل نانوسلنیوم معدنی عملکرد بهتری را نسبت به سلنیوم آلی نشان داد؛ لذا می‌بایست مطالعات بیش‌تری درخصوص مکمل‌سازی نانوسلنیوم‌ها صورت گیرد. براساس یافته‌های یک مطالعه‌اولیه، نسبت‌اسپرم‌های غیرطبیعی در موش‌های تغذیه شده با جیره بدون سلنیوم نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود (۳۵). که بیانگر اهمیت این ریزمغذی در گامه‌های اسپرم‌سازی است. هم‌چنین، بیان شده است که غلظت سلنیوم پلاسمای منی با ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم همبستگی منفی دارد (۲۶). براساس یافته‌های پژوهش حاضر، درصد اسپرم‌ها نابهنجار با مکمل‌سازی سلنیوم آلی کاهش یافت که هم‌سو با نتایج این مطالعه کاهشی در درصد اسپرم‌های نابهنجار با افزودن سلنیوم به جیره خروس‌ها در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (۸، ۱۲). در مطالعه حاضر، افزودن سلنیوم به جیره در سطح ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، صرف نظر از منبع آن، موجب افزایش غلظت، درصد جنبایی، زنده‌مانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم و کاهش درصد ناهنجاری اسپرم شد. ولی تغییری در حجم منی با افزودن سلنیوم به جیره خروس‌های مسن مشاهده نشد. هم‌چنین غلظت، جنبانی، زندمانی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم، در روز ۴۰ آزمایش در خروس‌های دریافت کننده ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سلنیوم از منابع سلنیوم آلی و نانو بایوکیلات سلنیوم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر زمان ها بود. نتایج نشان داد که شکل آلی سلنیوم (منابع سلمکس و نانو بایوکیلات سلنیوم) نسبت به شکل معدنی (سلنیت سدیم)، در سطح ۰/۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره باعث بهبود عملکرد تولیدمثلی خروس‌های مسن می‌شود.

منابع

1. **Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M.H. and Iqbal, Z., 2014.** Role of selenium in male reproduction. A review. Animal Reproduction Science. 146: 55-62.
2. **Akhlaghi, A., Ahangari, Y.J., Navidshad, B., Pirsaraei, Z.A., Zhandi, M., Deldar, H., Rezvani, M.R., Dadpasand, M., Hashemi, S.R. and 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.
3. **Alavi, M.H., Allymehr, M., Talebi, A. and Najafi, G., 2020.** Comparative effects of nano-selenium and sodium selenite supplementations on fertility in aged broiler breeder males. Veterinary Research Forum. 11: 135-141.
4. **AlKaabi, A.A.H. and Ali, E.A., 2021.** Effect of Dosing of Broiler Breeder Roosters (Ross) with different Levels of Nano-selenium Particles and Organic Selenium on Reproductive traits A Thesis Submitted. Annals of the Romanian Society for Cell Biology. 25: 3718-3726.
5. **AlKaabi, A.A.H. and Ali, E.A., 2021.** Effect of Dosing ofBroiler Breeder Roosters (Ross) with different Levels of Nano-selenium Particles and Organic Selenium on Physiological and Histological Traits A Thesis Submitted. Annals of the Romanian Society for Cell Biology. 25: 3859-3870.
6. **Amini, M.R ,.Kohram, H., Zare Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharideh, H. and 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.
7. **Ansari, M., Zhandi, M., Kohram, H., Zaghari, M ,. Sadeghi, M., Gholami, M., Deldar, H., Di Fiore, M.M. and Benson, A.P., 2018.** d-Aspartate amends reproductive performance of aged roosters by changing gene expression and testicular histology. Reproduction, Fertility and Development. 30: 1038-1048.
8. **Ashraf, S ,.Bhatti, S.A., Nawaz, H. and Khan, M.S., 2020.** Assessment of Dietary Selenium Sources in Commercial Male Broiler Breeders: Effects on Semen Quality, Antioxidant Status and Immune Responses. Pakistan Veterinary Journal. 40.
9. **Bălăceanu, R.A., Nimigean, V.G., Nimigean, V.R.E.S., Raită, Ş., Ognean, L. and Dojană, N., 2022.** Vitamin E and Selenium Given as Dietary Supplements Accumulate in

Tissues and Semen and Improve Reproductive Parameters in Older Red Cornish. The Journal of Poultry Science. 59: 96-103.

10. **Blanco, J.M., Wildt, D.E., Höfle, U., Voelker, W. and Donoghue, A.M., 2009.** Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. Theriogenology. 71: 200-213.

11. **Bréque, C., Surai, P. and Brillard, J.P., 2003.** Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research. 66: 314-323.

12. **Chauychu-Noo, N., Thananurak, P., Boonkum, W., Vongpralub, T. and Chankitisakul, V., 2021.** Effect of organic selenium dietary supplementation on quality and fertility of cryopreserved chicken sperm. Cryobiology. 98: 57-62.

13. **Dalgaard, T.S., Briens, M., Engberg, R.M. and Lauridsen, C., 2018.** The influence of selenium and selenoproteins on immune responses of poultry and pigs. Animal Feed Science and Technology. 238: 73-83.

14. **Dalia, A.M., Loh, T.C., Sazili, A.Q., Jahromi, M.F. and Samsudin, A.A., 2018.** Effects of vitamin E, inorganic selenium, bacterial organic selenium, and their combinations on immunity response in broiler chickens. BMC Veterinary Research. 14: 1-10.

15. **Ebeid, T.A., 2009.** Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. British Poultry Science. 50: 641-647.

16. **Edens, F.W. and Sefton, A.E., 2009.** Sel-Plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. International Journal of Poultry Science. 8: 853-861.

17. **Hama, K.O., 2015.** Effect of organic and inorganic sources of selenium on semen quality in roosters. Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences. 5: 392-394.

18. **Hezarjaribi, A., Rezaeipour, V. and Abdollahpour, R., 2016.** Effects of intramuscular injections of vitamin E-selenium and a gonadotropin releasing hormone analogue (GnRHa) on reproductive performance and blood metabolites of post-molt male broiler breeders. Asian Pacific Journal of Reproduction. 5: 156-160.

19. **Huang, Y., Li, W., Xu, D., Li, B., Tian, Y. and Zan, L., 2016.** Effect of dietary selenium deficiency on the cell apoptosis and the level of thyroid hormones in chicken. Biological Trace Element Research. 171: 445-452.

20. **Jafari Ahangari, Y., Parizadian, B. and Zamani, M., 2013.** The impact of organic selenium supplementation on rooster semen quality in liquid condition. Poultry Science Journal. 1: 23-31.

21. **Jones, C.A., Edens, F.W. and Denbow, D.M., 1983.** Influence of age on the temperature response of chickens to Escherichia coli and Salmonella typhimurium endotoxins. Poultry Science. 62: 1553-1558.

22. **Khalid, A., Khudhair, N., He, H., Peng, Z., Yaguang, T. and Guixue, Z., 2016.** Effects of dietary selenium supplementation on seminiferous tubules and SelW, GPx4, LHCGR, and ACE expression in chicken testis. Biological Trace Element Research. 173: 202-209.

23. **Karimi, A., Besharati, M. and Nemati, Z., 2018.** Protective effects of fennel (*Foeniculum vulgare*) extract on frozen-thowed sperm of Ghezel ram. Journal of Animal Environment. 10(4): 83-90. (In Persian)

24. **Khalil-Khalili, A.A., Zhandi, M., Zaghari, M., Mehrabani-Yeganeh, H., Yousefi, A.R. and Tavakoli-Alamooti, M., 2021.** The effect of dietary organic selenium on reproductive performance of broiler breeder roosters under dexamethasone induced stress. Theriogenology 161: 16-25.

25. **Łukaszewicz, E., Jerysz, A., Partyka, A. and Siudzińska, A., 2008.** Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Research in Veterinary Science. 85: 583-588.

26. **Přinosilová, P., Kopecká, V., Hlavicová, J. and Kunetková, M., 2014.** Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. Acta Veterinaria Brno. 83: 313-319.

27. **Qazi, I.H., Angel, C., Yang, H., Zoidis, E., Pan, B., Wu, Z., Ming, Z., Zeng, C.-J., Meng, Q. and Han, H., 2019.** Role of selenium and selenoproteins in male reproductive function: a review of past and present evidences. Antioxidants. 8: 268.

28. **Raei, H., Torshizi, M.A.K., Sharafi, M. and Ahmadi, H., 2021.** Improving seminal quality and reproductive performance in male broiler breeder by supplementation of camphor. Theriogenology. 166: 1-8.

29. **Rui, B.R., Shibuya, F.Y., Kawaoku, A.J.T., Losano, J.D.A., Angrimani, D.S.R., Dalmazzo, A., Nichi, M. and Pereira, R.J.G., 2017.** Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. Theriogenology. 90: 11-19.

30. **Sabzian-Melei, R., Zare-Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefi, A.R. and Rafieian-Naeini, H.R., 2022.** Effects of dietary supplementation of different sources and levels of selenium on the semen quality and reproductive performance in aged broiler breeder roosters. Poultry Science. 101908.

31. **Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Coloma, M.A., Gómez-Brunet, A., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A. and Campo, J.L., 2009.** Use of the hypo-osmotic swelling test and aniline blue staining to improve the evaluation of seasonal sperm variation in native Spanish free-range poultry. Poultry Science. 88: 2661-2669.

32. **Shamiah, S.M., El-Karim, A., Ragaa, E., Eshera, A.A.M., Fouda, S.F. and Zaghloul, H.K., 2017.** Effects of Dietary Selenomethionine Supplementation on Semen Quality, Fertility and Antioxidat Status of Cockerels. Egyptian Journal of Nutrition and Feeds. 20: 227-236.

33. **Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. and Fisher, J.S., 2003.** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. Reproduction. 125: 769-784.

34. **Shi, L., Zhang, C., Yue, W., Shi, L., Zhu, X. and Lei, F., 2010.** Short-term effect of dietary selenium-enriched yeast on semen parameters ,antioxidant status and Se concentration in goat seminal plasma. Animal Feed Science and Technology. 157: 104-108.

35. **Słowińska, M., Jankowski, J., Dietrich, G.J., Karol, H., Liszewska, E., Glogowski, J., Kozłowski, K., Sartowska, K. and Ciereszko, A., 2011.** Effect of organic and inorganic forms of selenium in diets on turkey semen quality. Poultry Science. 90: 181-190.

36. **Vahedi, V. and Hedayat Evrigh, N., 2019.** Improvement in frozen-thawed ram sperm quality parameters by adding Mentha piperita extract in extender. Journal of Animal Environment. 11(1): 83-90. (In Persian).

37. **Watanabe, T. and Endo, A., 1991.** Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. Mutation Research Letters. 262: 93-99.