مقاله علمی پژوهشی/نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۹ شماره ۴/ سال۱۳۹۸/ صفحات ۵۵ تا ۶۷

تاثیر عصاره الکلی رزماری روی آسیب DNA اسپرم و برخی فراسنجه‌های منی خروس در شرایط مایع

اکرم فلاحی[۱]*، سعید محمدزاده[۲] و علی فروهرمهر[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۵

[۱] فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه لرستان

[۲] به‌ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم دامی دانشگاه لرستان

*مسئول مکاتبه: Email: akramfallahipoor@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش آسیب‌های وارده به سلول اسپرم طی سردسازی می‌شود. **هدف**: این پژوهش به‌منظور افزایش خصوصیات کیفی منی خروس به وسیله عصاره الکلی رزماری طی فرآیند سردسازی و نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس انجام گرفت. **روش کار**: جمع‌آوری منی دو بار در هفته در شش نوبت از ۱۰ قطعه خروس بالغ با روش مالش‌شکمی انجام گرفت. نمونه‌های منی در هر نوبت، با رقیق‌کننده سکستون ارزیابی اولیه شد. سپس نمونه‌ها به ٦ قسمت تقسیم و پس از افزودن مقادیر صفر (شاهد)، ۱۵، ۲۵، ۳۵، ٤٥ و ٦٠ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی رزماری به هر قسمت، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. تحرک کل، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی در زمان‌های صفر،٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی بررسی شد. درصد قطعه‌قطعه شدن DNA در نمونه‌ها پس از ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (تکرار در اندازه‌گیری) در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شد. میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن مقایسه شدند. **نتایج**: اضافه نمودن ۳۵ میکروگرم عصاره رزماری به رقیق‌کننده منی میزان قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم‌ها را کاهش داد (P<۰/۰۵). همچنین، ٤٨ ساعت پس از ذخیره‌سازی، تحرک، زنده‌مانی وسلامت غشای پلاسمایی اسپرم در نمونه‌هایی که ٦٠ میکروگرم عصاره رزماری به آن‌ها اضافه شد، پایین‌تر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). پس از ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی، تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در نمونه‌هایی حاوی ۳۵ میکروگرم بر میلی لیترعصاره رزماری در رقیق‌کننده، بالاتر از گروه شاهد بود(P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری نهایی**: بر اساس نتایج تحقیق حاضر، برای ذخیره‌سازی اسپرم خروس در ٤ درجه سلسیوس افزودن ۳۵ میکروگرم عصاره رزماری به رقیق‌کننده پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: عصاره رزماری، اسپرم، خروس، قطعه‌قطعه شدن DNA

مقدمه

عملکرد تولیدمثلی در حیوانات تحت تأثیر ژنتیک، تغذیه، مدیریت و محیط است (کومار ۲۰۰۳). یکی از اهداف بزرگ در صنعت پرورش طیور تولید انبوه تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار با قابلیت جوجه‌درآوری بالا است. اگرچه جهت نیل به نرخ باروری مناسب در گله، هم مرغ و هم خروس نقش مهمی ایفا می‌کنند اما تأثیر خروس بیشتر از مرغ است، زیرا در گله تعداد خروس‌ها نسبت به مرغ‌ها کمتر است (امتی و همکاران ۲۰۱۳). با وجود این که تلقیح مصنوعی یکی از ابزارهای مدیریتی کارآمد برای

بهینه‌سازی تولیدمثل ماکیان در جهت افزایش تولید گوشت مرغ و تخم‌مرغ است، اما دارای محدودیت‌هایی است که مهم‌ترین آن کاهش توان باروری اسپرم هنگام ذخیره سازی به شکل مایع یا منجمد است. بنابراین ارتقاء روش‌های ذخیره و نگهداری اسپرم می‌تواند این محدودیت‌ها را کاهش دهد (اسکات ۱۹۷۳). لیپیدها از اجزای مهم غشاء اسپرم بوده و نقش عمده‌ای دراباروری اسپرم‌ها دارند (اسکات ۱۹۷۳). در حقیقت فسفولیپیدهای غشای اسپرم پرندگان دارای مقدار زیادی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه هستند (سورایی و همکاران ۱۹۹۸) که این موضوع موجب می‌شود اسپرم‌ها نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی بسیار حساس شوند. پراکسیداسیون لیپیدها با ناباروری جنس نر همبستگی مثبت دارد (فوجیهارا و هوارت ۱۹۷۸). بسیاری از مطالعات اثرات سودمند افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به مایع رقیق‌کننده منی برای جلوگیری از زیان گونه‌های فعال اکسیژن را نشان داده‌اند (مالو و همکاران ۲۰۱۱). عصاره الکلی رزماری به میزان ٤٠میکروگرم در میلی لیتر به منی در هنگام ذخیره سازی سبب بهبود کیفیت منی خروس شد (رمضانی نژاد و روستایی مهر۲۰۱۷). صفا و همکاران (۲۰۱٦) نشان دادند افزودن ویتامین E و نانوسلنیوم به محیط رقیق‌کننده منی خروس موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های اکسیداتیو به اسپرم شده و خصوصیات کیفی اسپرم خروس را طی نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس بهبود می‌بخشد.

رزماری یکی از گیاهان دارویی است که قابلیت زیادی در تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی دارد. گیاه رزماری (*Rosmarinus Officinalis*) متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiacea) است. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد سرطانی این گیاه به خوبی مشخص‌شده است (دل‌ازکان ۲۰۰۳ و دل‌کامپو و همکاران ۲۰۰۰). عصاره الکلی رزماری حاوی ترکیبات - فنولیک مانند کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و رزمانول است که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قوی هستند (ایرکان و همکاران۲۰۰۸). تغذیه پودر برگ رزماری به خروس‌های مادر گوشتی مسن، سبب بهبود معنی‌دار کیفیت اسپرم آنها شد (برقعی راد و همکاران ۲۰۱٦). عصاره رزماری به مقدار ۱۰ و ۱۲/۵ میلی‌گرم در لیتردر مایع رقیق کننده موجب افزایش کیفیت اسپرم خروس پس از یخ‌گشایی شد (شفیق و همکاران ۲۰۱٦). علی رغم تاثیر عصاره رزماری در بهبود کیفیت منی، تا کنون در ایران روی آسیب DNA اسپرم خروس بررسی صورت نگرفته است. چه بسا نمونه اسپرمی از نظر تحرک، زنده مانی و سایر فراسنجه‌های منی برجسته و انتخاب شود ولی به جهت آسیب در DNA باروری را به شدت کاهش دهد (شانموگان و همکاران ۲۰۱٤). هدف در پژوهش پیش رو بررسی تأثیر عصاره رزماری به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی در رقیق‌کننده، روی آسیب DNA و برخی خصوصیات منی خروس در دمای ٤ درجه سلسیوس است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با استفاده از ۱۰ قطعه خروس بومی، سالم، بارور و کمابیش هم سن (۱۸-۲۲ ماهگی) انجام پذیرفت. خروس‌ها در قفس‌های انفرادی به ابعاد ۷۰×۷۰×۸۵ سانتی‌متردر دمای ۲۵-۲۷ درجه سلسیوس تحت برنامه نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. خروس‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمامی خروس‌ها با جیره بر پایه ذرت و سویا دارای ۳۱۷۰ کیلوکالری انرژی و ۱۲ درصد پروتئین در هر کیلوگرم ماده خشک، تغذیه شدند. استخراج عصاره گیاهی با روش خیساندن انجام شد (پاتریسیا گارسیا- سالاس و همکاران ۲۰۱۰). برای این منظور از ارلن‌های حاوی ۱۰ گرم گیاه خشک آسیاب شده رزماری (تهیه شده از مزرعه گیاهان دارویی) حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول- آب (۸۰ درصد) استفاده شد. ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده شدند. سپس محتویات ارلن‌ها از کاغذ صافی عبور داده

شد. به منظور خارج کردن متانول از عصاره و تغلیظ آن، محلول متانولی به دستگاه روتاری تحت خلأ انتقال یافت. در پایان عصاره خالص به‌دست‌آمده تا زمان آنالیزهای موردنظر در شیشه‌های تیره رنگ و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از یک هفته عادت‌دهی خروس‌ها، اسپرم‌گیری به روش مالش پشتی- شکمی بر اساس روش بروس و کویین ۱۹۳۷ و به مدت سه هفته و در هر هفته ۲ بار انجام پذیرفت. نمونه‌های اسپرم بلافاصله پس از اخذ توسط فلاسک حاوی آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا اسپرم‌ها از نظر غلظت، رنگ و مورفولوژی بررسی شد و نمونه منی با غلظت بیش از ۳×۱۰^{۹} اسپرم در هر میلی‌لیتر و تحرک بیش از ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفت. به منظور از بین بردن اثرات انفرادی (اثر حیوان)، نمونه‌های انتخاب شده با یکدیگر مخلوط شده و به‌صورت یک نمونه واحد درآمدند. به منظور رقیق‌سازی اسپرم‌ها از رقیق‌کننده سکستون استفاده گردید (سکستون و همکاران 1989) (جدول ۱).

جدول ۱- اجزا و مقادیر رقیق‌کننده سکستون

Table 1- Ingredient and amounts of sexton extender

Number	Component	Quantity(g)/liter
1	Potassium monohydrate citrate	0.64
2	Sodium glutamate	8.70
3	Magnesium chloride	0.34
4	Fructose	5
5	Dipotassium trihydrate phosphate	12.7
6	Phosphate mono potassium	0.65
7	Tris	3.95
8	Sodium acetate	4.3
9	Double distilled water	1 liter

با استفاده از رقیق‌کننده سکستون محلول ۲۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی رزماری تهیه شد. برای این منظور ابتدا یک محلول با غلظت ۱۰X(ده برابر) از عصاره با کمک رقیق‌کننده سکستون و دی متیل سولفاکساید (DMSO) تهیه گردید (۲میلی‌گرم عصاره+۱۰میکرولیتر DMSO +۹۹۰میکرولیتر محلول سکستون در یک میلی لیتر). با استفاده از همزن (ورتکس) محلول کاملاً یکنواخت شد. این محلول به‌عنوان نمونه‌ی الف در نظر گرفته شد. با استفاده از نمونه الف غلظت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵، ٤٥ و ٦٠ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره رزماری تهیه شد. میکروتیوب‌های آماده شده درون یخچال در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس ازاضافه کردن حجم ثابت از منی خروس، در زمان‌های صفر، ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت، ارزیابی نمونه‌ها از نظر فراسنجه‌های،جنبایی، زنده‌مانی، فعالیت غشای پلاسمایی و آسیب DNA اسپرم صورت گرفت.

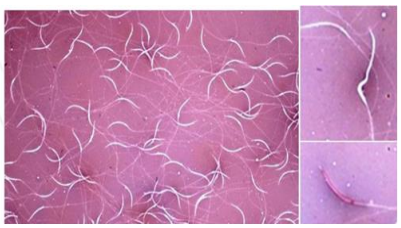
ارزیابی فراسنجه‌های اسپرم

جنبایی

جنبایی کل اسپرم با روش (ایوانس و مکسول ۱۹۸۷) انجام گرفت. ۱۰ میکرولیتر ازمنی رقیق شده روی لام گرم (۳۷ درجه سلسیوس) منتقل و برای هر تکرار حداقل ۱۰ میدان دید (فیلد) زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤۰۰ بررسی شد. تعداد اسپرم‌های متحرک به کل اسپرم در هر میدان دید تعیین و سپس در صد تحرک آن‌ها تعیین گردید..

زنده مانی

برای ارزیابی یکپارچگی غشای پلاسمایی از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده شد (شکل۲). مواد تشکیل دهنده شامل رنگ ائوزین (۱/٦۷ گرم)، رنگ نیگروزین(۱۰ گرم) وسیترات سدیم (۲/۹گرم) در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود (ایوانزو مکس‌ول ۱۹۷۸). در این روش اسپرم-های مرده، رنگ ائوزین را به خود جذب، ولی اسپرم‌های زنده فاقد این ویژگی‌اند. پس از رنگ‌آمیزی منی، لام‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ٤۰۰ ارزیابی شد. از هر لام، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های زنده (رنگ نشده) محاسبه گردید (باکست و دیموند ۲۰۱۳) (شکل ۱).



شکل ۱-اسپرم‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین نیگروزین برگرفته از شانموگان و همکاران ۲۰۱٤.

Figure 1-The sperms stained by Eosin-Nigrosin

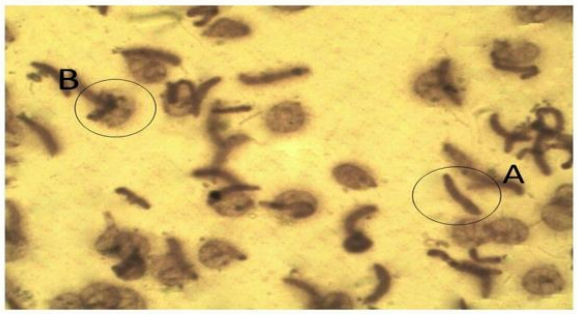
سلامت غشای پلاسمایی

سلامت غشای پلاسمایی اسپرم، به وسیله آزمایش تورم هایپواسموتیک (HOS) بررسی گردید برای تهیه محلول هاس، ۰/۹ گرم فروکتوز و ۰/٤۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. فشار اسمزی محلول ۱۰۰ میلی‌اسمول و pH آن ۸/۰۲ بود (ریول و مرود ۱۹۹٤). ۳۰ میکرولیتر از نمونه منی به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول هایپواسموتیک اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس از آن گسترش تهیه شد. لام حاصل زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰۰ ارزیابی گردید. از هر لام تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های دارای غشای سالم (پیچ خورده) محاسبه شد.

ارزیابی آسیب DNA اسپرم

آزمایش با اصلاحات جزئی از فرناندز و همکاران ۲۰۰۳ انجام شد. حجم مساوی نمونه منی رقیق و ۱٪ آگارز با درجه ذوب پائین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مخلوط شدند. مقدار ۳۰ میکرولیتر مخلوط روی اسلایدهای شیشه‌ای پوشیده شده با آگارز با ذوب معمولی ۰,٦۵٪، ریخته، لامل گذاری و به مدت ٤ دقیقه روی یخ، سرمادهی شد. بلافاصله پس از برداشتن لامل اسلایدها به صورت افقی در یک سینی حاوی محلول دناتوراسیون ۰,۰۸ نرمال اسید کلریدریک به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد در تاریکی قرار داده شد. سپس دناچوراسیون متوقف و پروتئین‌ها با محلول خنثی‌کننده و لیزکننده (۰,٤ مولار تریس، ۰,۸ مولارDTT، SDS ٪1، 50 میلی مولارEDTA با pH 7.5) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق حذف شدند. اسلایدها توسط EDTA تریس بورات شستشو و بمدت ۲ دقیقه درالکل های ۷۰، ۹۰، و ۱۰۰ آبگیری شدند. مبانی این روش در کیت‌های ارزیابی سلامت DNA اسپرم طراحی شده است. در این تحقیق از کیت آزمون قطعه قطعه شدنDNA اسپرم[1] (شرکت هوشمند فن‌آور) استفاده گردید. با استفاده از یک بستر میکرو ژلی تیمار اسیدی، تهیه و کروماتین اسپرم دناتوره شد. در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش گردید و پس از رنگ‌آمیزی در اطراف سر اسپرم سالم، هاله‌ای مشاهده شد. اسپرمی که DNA آن قطعه قطعه شده بود در زیر میکروسکوپ فاقد هاله یا بعضا به صورت جزئی در اطراف سر اسپرم دیده شد(شکل ٤). در هر اسلاید از هر ناحیه حداقل ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ٤۰ شمارش شد و درصد اسپرم-های دارای هاله و اسپرم‌های فاقد هاله تعیین گردید (فرناندز و همکاران ۲۰۰۳) (شکل ۲).

1 Sperm DNA fragmentation assey



شکل ۲- (A) اسپرم‌های بدون هاله نور ،(B) اسپرم‌های دارای هاله نور

Figure 2- (A) The sperms without halo, (B) The sperms with halo

مدل آماری

داده‌های آماری به‌دست‌آمده از آزمایش حاضر توسط نرم‌افزار SAS Repeated measurment(تکرار در اندازه‌گیری) طرح کاملاً تصادفی آنالیز و میانگین‌ها تیمارها و تکرار تیمارها در زمان توسط آزمون دانکن مقایسه شد.

$$X_{ijk}=\mu+T_i+\beta+(T_i\times\beta_j)+e_{ijk}$$

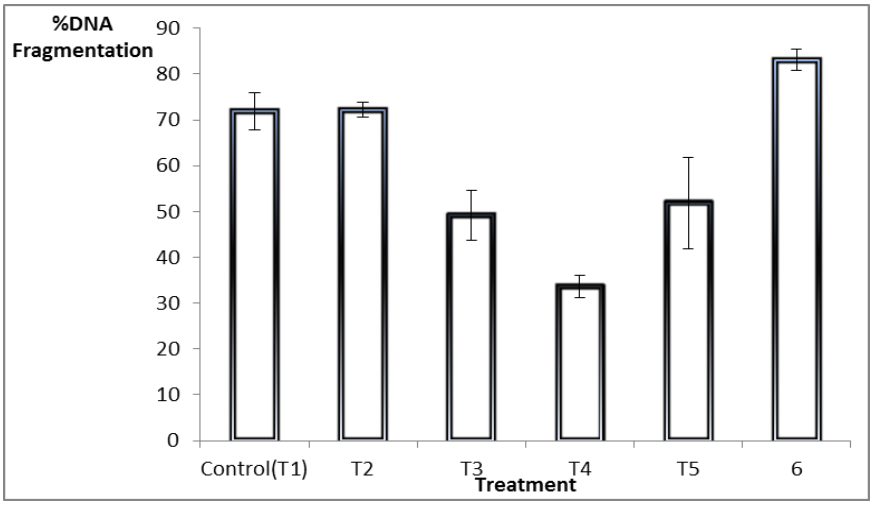
در این رابطه Xij داده آزمایش، μ میانگین جامعه، Tij اثر تیمار βj اثر زمان، (Ti×βj) اثر متقابل تیمار با زمان، eijk اثر خطای آزمایش است.

نتایج

اثر متقابل زمان و تیمارهای مختلف در فراسنجه‌های آزمایش (تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی) معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). با توجه به این که درصد قطعه قطعه شدن DNA درزمان ٤٨ نگهداری منی در ٤ درجه سلسیوس بررسی شد، مقایسه میانگین سایر فراسنجه‌های منی شامل تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی دراین زمان (٤٨ ساعت) مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت.

تأثیر عصاره الکلی رزماری بر سلامت DNA اسپرم

نتایج تأثیر عصاره الکلی رزماری بر قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم خروس پس از ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ درجه سلسیوس در شکل (۳) آمده است. کمترین میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در تیمار ٤ (۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره رزماری) مشاهده شد (P<۰/۰۵) و درصد قطعه‌قطعه‌شدنDNA در این گروه نسبت به تیمار ۱ (شاهد) و تیمارهای ۲ و ٦ معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). بیشترین میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم در تیمار ٦ (٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری روی درصد قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم خروس (میانگین ±انحراف معیار)

Figure 3- Effect of different levels of Rosemary alcoholic extract on DNA fragmentation rate of rooster sperm (Means ± standard deviation)

تأثیر عصاره الکلی رزماری بر تحرک اسپرم

در زمان صفر (شروع آزمایش)، تأثیر عصاره رزماری بر تحرک اسپرم در همه تیمارهای مورد آزمایش به طور آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵)(جدول۲). پس از ٤٨ ساعت از زمان ذخیره‌سازی، تحرک اسپرم در تیمار ٤ (۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) و پس از ۷۲ ساعت در تیمار ۲ (۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲- اثر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری روی درصد تحرک اسپرم خروس در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در ۴ درجه سلسیوس (میانگین ±انحراف معیار).

Table 2- Effect of different levels of Rosemary alcoholic extract on sperm motility rate in different storage times at 4 ºC (means ± standard deviation)

Treatmet	Microgram/milileter	Time of storage(h)			
	µg/mL	0	24	48	72
1	Control	90.16±1.04	85.83±1.79	77.53±0.69^{b}	25.83±2.82^{c}
2	15	92.66±0.94	87.83±0.98	75.38±1.6^{b}	50.66±1.66^{a}
3	25	92±0.85	88.83±1.92	78.68±0.94^{ab}	11.33±1.25^{d}
4	35	89.83±0.4	89.66±1.91	83.44±2.08^{a}	13.83±0.94^{d}
5	45	92.66±0.8	43.16±4.28	65.65±1.61^{c}	32.83±2.56^{b}
6	60	92.50±1.11	26.16±1.79	24.93±4.07^{d}	13.66±1.6^{d}

^{abcd} **Means within the same column with different superscripts letter differ significantly (P<0.05)**

تأثیر عصاره الکلی رزماری بر زنده‌مانی اسپرم

تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری بر زنده‌مانی اسپرم ٤٨ و ۷۲ ساعت پس از ذخیره‌سازی معنی‌دار بود (جدول۳)(P<۰/۰۵). پس از ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی در تیمارهای ٤ و ٥ (۳۵ و ٤٥ میکروگرم عصاره در میلی لیتر) و پس از ۷۲ ساعت ذخیره‌سازی در تیمارهای ۳ و ٤ (۲۵ و ۳۵ میکروگرم عصاره در میلی‌لیتر) زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد بیشتر بود (P<۰/۰۵). پس از ٤٨ ساعت از زمان ذخیره‌سازی، افزودن ٦٠ میکروگرم عصاره رزماری در میلی‌لیتر، باعث کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم خروس شد (P<۰/۰۵).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری روی درصد زنده‌مانی اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی در ۴ درجه سلسیوس(میانگین ±انحراف معیار).

Table 3- Effect of different levels of Rosemary alcoholic extract on viability (%) of rooster sperm (means ± standard deviation)

Treatment	Microgram/Milit	Time of storage(h)			
		0	24	48	72
1	Control	89.16±1.4	90.83±1.51	63.16±1.47^{c}	12.83±1.35^{bc}
2	15	88.83±1.4	89.66±1.85	67.66±2.75^{bc}	17.33±4.14^{b}
3	25	91.66±0.98	90±1.23	72.16±1.66^{b}	31.50±2.29^{a}
4	35	90.50±1.23	86.33±1.45	85.66±1.30^{a}	31±2^{a}
5	45	91±1.69	81.16±1.55	83.33±1.97^{a}	13±1.03^{bc}
6	60	91.83±1.57	80±1.09	54.50±3.34^{d}	9.66±0.71^{c}

$^{a.b.c.dabcd}$ Means within the same column with different superscripts letter differ significantly (P<0.05).

تأثیر عصاره الکلی رزماری بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم

تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم پس از ٤٨ و ٧٢ ساعت ذخیره‌سازی معنی‌دار بود (جدول٤) (P<۰/۰۵). پس از ٤٨ ساعت از زمان ذخیره‌سازی، تیمار ٤ (٣٥ میکروگرم عصاره) و پس از ٧٢ ساعت تیمارهای ٣ و ٤(٢٥ و ٣٥ میکروگرم عصاره) سبب افزایش سلامت غشای پلاسمایی نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها شدند (P<۰/۰۵).

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف عصاره الکلی رزماری روی درصد سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در زمان‌های مختلف ذخیره-سازی در ۴ سلسیوس. (میانگین ±انحراف معیار)

Table 4- Effect of different levels of Rosemary alcoholic extract on membrane integrity (%)of rooster sperm (means ± standard deviation)

Treatment	Microgram/Militer (µ/mL)	Time of storage(hu)			
		0	24	48	72
1	Control	93±0.68	86.16±1.86	59.67±0.61^{c}	40±2.62^{b}
2	15	92.33±0.76	83.83±2.77	67.83±1.77^{b}	33.50±2.6^{b}
3	25	94.16±0.30	91.16±1.70	68.83±2.50^{b}	69.33±1.81^{a}
4	35	92.33±3.61	91.83±1.35	85.33±1.80^{a}	65±1.43^{a}
5	45	92.16±1.10	66.83±2.79	73.17±2.24^{b}	36.33±1.62^{b}
6	60	92±0.81	63.66±3.73	54.83±1.66^{c}	36.33±2.57^{b}

^{abcd} Means within the same column with different superscripts letter differ significantly (P<0.05).

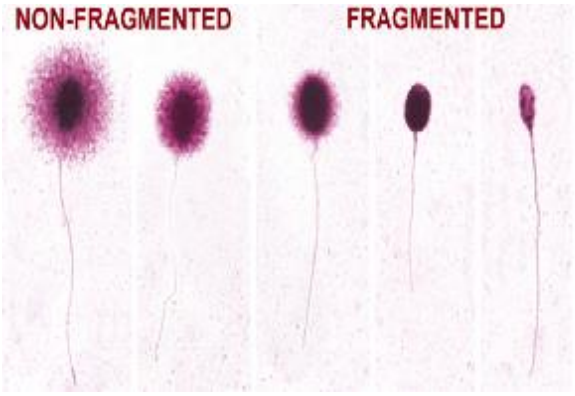
بحث

اسپرم به دلیل تغییراتی که در مدت‌زمان نگهداری متحمل می‌شود مستعد آسیب‌های مکانیکی واسترس اکسیداتیو است. در زمان نگهداری در آزمایشگاه، رادیکال‌های آزاد تولید و عملکرد آن را به شدت کاهش می‌دهند. راهکاری که امروزه پیشنهاد شده افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده منی است تا از این آسیب‌ها جلوگیری شود (ایوانس و مکسول ۱۹۸۷). در سال‌های اخیر نقش برخی گیاهان حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم گزارش شده است (نیک روش و همکاران ۲۰۱۰ و حسینی و همکاران ۲۰۱۰). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن مقدار ۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره رزماری سبب بهبود تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم خروس پس ٤٨ ساعت ذخیره‌سازی در ٤ درجه سلسیوس شد. ترکیبات عصاره رزماری در این غلظت نقش آنتی‌اکسیدانی را در نمونه منی را داشت. ترکیب لیپیدی غشای اسپرم خروس نقش تعیین‌کننده‌ای در کیفیت و میزان باروری آن ایفا می‌کند (بلسبویس ۲۰۱۱). غشای اسپرم خروس در مقایسه با اسپرم پستانداران دارای اسیدهای چرب غیراشباع بیشتری است و این امر موجب افزایش حساسیت اسپرم خروس به پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (بلسبویس و همکاران ۱۹۹۷). همچنین این ویژگی سبب افزایش آسیب‌هایی نظیر کاهش زنده‌مانی، تحرک و قابلیت باروری اسپرم خروس طی فرآیندهای نگهداری می‌شود (سورائی و همکاران ۱۹۹۸). این در حالی است که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط نگهداری کننده اسپرم طیور می‌تواند تا حدی از شدت آسیب‌های اسپرم کاسته و کیفیت اسپرم را طی فرآیندهایی نظیر سردسازی و انجماد افزایش دهد (امینی و همکاران ۲۰۱۵ و میرزایی راد و همکاران ۲۰۱۵).

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه رزماری نظیر کارنوسیک اسید و رزمارینیک اسید است که دارای دو حلقه آروماتیک با دو گروه الکلی می‌باشند،این اسیدها قادر به تبادل یون هیدروژن به عوامل اکسیدکننده

می‌شوند با این ویژگی پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن کاهش می‌یابد (ناکاتانی ۲۰۰۳، و برون و کیلی ۲۰۰۷).چنانچه نتایج برخی از پژوهش‌ها در استفاده از گیاه رزماری مبین کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد. اسانس رزماری به منی خروس به میزان ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب بهبود کیفیت اسپرم پس از یخ گشایی شد (شفیق و همکاران ۲۰۱٦). در مطالعه‌ای افزودن ٤ و ٦ درصد عصاره آبی رزماری به منی قوچ و استفاده از رقیق‌کننده‌ی حاوی لسیتین سویا سبب بهبود سلامت غشای اسپرم پس از یخ‌گشایی گردید (خدایی مطلق و همکاران ۲۰۱٤). همچنین افزودن آنتی‌اکسیدان‌هایی با منشأ گیاهی مانند کاتچین به منی بز سبب بهبود تحرک اسپرم طی ذخیره‌سازی در ٥ درجه سلسیوس شد (پاردی و همکاران ۲۰۰٤). افزودن ۱۰۰ میکرو مول سیلی‌مارین به منی رقیق‌شده‌ی خروس سبب کاهش پراکسیداسیون چربی و همچنین حفظ ساختار و عملکرد اسپرم طی روند ذخیره‌سازی در ٤ درجه سلسیوس شد (ضیایی راد و همکاران، ۲۰۱٥). در این آزمایش افزودن عصاره رزماری به مقدار ۳٥ میکروگرم در میلی لیتر موجب افزایش یکپارچگی غشا گردید.

با توجه به نتایج آزمایش حاضر، برخی از غلظت‌های عصاره الکلی رزماری، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی عمل نموده و مانع از اثرات زیان‌بار گونه‌های فعال اکسیژن روی غشای پلاسمایی اسپرم شده و در کل سبب بهبود تحرک، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در خروس طی ذخیره‌سازی در دمای ٤ درجه سلسیوس می‌شوند. غلظت بالای عصاره رزماری (٦۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) سبب افت فراسنجه‌های اسپرم در دوره ذخیره‌سازی شد. به عبارتی به نظر می‌رسد سطوح بالاتر ۳٥ میکروگرم در میلی‌لیتر اثر منفی، روی برخی از فراسنجه‌های منی خروس ایجاد می‌کند.



شکل ۴- مقایسه اسپرم سالم با اسپرم صدمه دیده در انسان (فرناندز و همکاران ۲۰۰٥).

Figure 4- Comparison of fragmented and non fragmented sperm cells in human
((Fernandez et al., 2005).

زمانی که به اسپرم صدمه وارد و در DNA شکستگی ایجاد شود این شکستگی، اسپرم را قادر می‌سازد تا ترکیبات رنگی را با خود وارد و هسته آن رنگ آمیزی شود، درحالی که اسپرم سالم بدلیل فعالیت غشاء وارد شدن رنگ را مهار نموده و رنگ به صورت هاله‌ای در اطراف هسته نمایان می‌شود. این وضعیت در اسپرم پستانداران به مراتب از نمود بیشتری نسبت به اسپرم طیور برخوردار است (شکل ٤). غلظت بالای رادیکال‌های آزاد با افزایش آسیب‌های DNA مرتبط است (آگروال و سعید ۲۰۰۳). رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پریمیدین در ساختمان DNA سلول‌های بدن از جمله اسپرم شده و در یک یا دو رشته DNA شکستگی ایجاد کنند. رادیکال‌های آزاد همچنین می‌توانند با ایجاد جایگاه‌های بدون باز و تشکیل پل‌های عرضی بین DNA و پروتئین، در نهایت منجر به تغییر در قند دزوکسی ریبوز و ایجاد ناباروری در جنس نر شوند (اوهنینگر ۲۰۰۱). جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد اولین خط دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها علیه آسیب‌های اکسیداتیو است (کاوو و همکاران۲۰۰۷). در پژوهش حاضر عصاره گیاه رزماری در غلظت ۳٥ میکروگرم در میلی‌لیتر، در جهت بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم از جمله جلوگیری از قطعه‌قطعه شدن DNA

عمل نموده و به نظر می‌رسد با این تاثیر، تحرک وزنده‌مانی افزایش یافت.

در مطالعه گریکو و همکاران (۲۰۰۵) نشان داده شد که آنتی‌اکسیدان‌ها قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم را در زمان تنش اکسیداتیو کاهش داده و استفاده روزانه از مکمل ویتامین E به مدت ۲ ماه باعث کاهش آسیب در DNA شد. سونگ و همکاران (۲۰۰٦) با بررسی تاثیر سطوح ویتامین C بر روی میزان سلامت DNA اسپرم نشان دادند که با کمبود اسید آسکوربیک در مایع منی میزان صدمه به DNA در اسپرم‌ها افزایش و تحرک آن‌ها کاهش می‌یابد. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین E، C) و مکمل روی و امگا ۳ باعث کاهش میزان قطعه-قطعه شدن DNA شد (صادق پور و همکاران ۲۰۰٤). همچنین استفاده از عصاره رزماری به صورت خوراکی در موش صحرایی تیمار شده با اتوپوساید، سبب افزایش غلظت، درصد تحرک و زنده مانی اسپرم شد (توسن و همکاران ۲۰۱۸). در این پژوهش ، عصاره رزماری در غلظت ۳۵ میکروگرم در میلی لیتر، نه تنها قادربود که مقدار قطعه‌قطعه شدنDNA اسپرم خروس را کاهش دهد، بلکه توانست فراسنجه‌های تحرک و زندمانی اسپرم را بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری کلی

عصاره الکلی رزماری در سطح ۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌تواند سبب بهبود زنده‌مانی اسپرم و کاهش آسیب DNA در زمان نگهداری(٤٨ ساعت) در دمای ٤ درجه سلسیوس گردد؛ بنابراین افزودن عصاره رزماری به رقیق‌کننده، از طریق ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در تلقیح مصنوعی، راندمان تولیدمثلی را بهبود دهد.

منابع مورد استفاده

Agarwal A and Said TM, 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male in fertility. Human Reproduction Update 9:331-345.

Amini MR, Kohram H, ZareShahaneh A, Zhandi M, Sharideh H and Nabi MM, 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality Cell Tissue Bank 16(4):587-92.

Bakst M.R. and Dymond J.S. 2013. Artificial insemination in poultry. Lemma (Ed.), Crotia pp.175–188.

Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM and Hermier D, 1997. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. Biology of Reproduction 56: 1216-1220.

Blesbois E, 2011. Freezing avian semen. Avian Biology Research 4(2): 52–58.

Borghei-Rad SM, Zenioaldini S, Zhandi M and Moravej H, 2016. Dietary Rosemary leaves powder improves semen quality parameters of aged broiler breeder.7th Iranian Congress of Animal sciences.

Burrows WH and Quinn JP, 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and Turkey. Poultary Science 16: 19-24.

Brown JE and Kelly MF, 2007. Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products.European Journal of Lipid Science and Technology 109: 66-7.

DelCampo J, Amiot MJ and Nguyen C, 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection 63: 1359-1368.

DelOzcan M, 2003. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. Journal of Medicinal Food 6: 267-270.

Evans G and Maxwell WMC, 1987. Handling and examination semen. In: Maxwell WMC, editor. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Sydney: Butterworths, PP: 93–106.

Erkan N, Ayranci G and Ayranci E, 2008. Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry110: 76-82.

Fujihara N and Howarth B, 1978. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. Poultry Science 57: 1766-1768.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, and Alvarez J G, 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method forthe determination of sperm DNA fragmentation. Journal of Andrology 24: 59–66.

Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M and Jonge C. De, 2005. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertility Sterility 84(4):833-842.

Greco E, Iacobelli M and Rienzi L, 2005. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. Journal of Andrology 26: 349–53.

Hosseini A, Zare S, Ghaderi Pakdel F and Ahmadi A, 2010. Beneficial effects of American ginseng on epididymal sperm analyses in cyclophosphamide treated rats. Journal of Reproduction and Infertility 45: 211-26. (In Persian)

Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL and Wei YH, 2007. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. Fertilty and Sterilty 89(5):1183-90.

KhodaeiMotlagh M, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Soleimani M and Zeinoaldini S, 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.)* extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. Cryobiology 69:217-222.

Malo C, Gil L, Cano R, Martinez F and Gale, 2011. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis)* on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology 75: 1735-1741.

MirzaeiRad H, Eslami M and Ghanie A, 2015. Palmitoleate enhances quality of rooster semen during chilled storage. Animal Reproduction Science 165: 38–45.

Nakatani N, 2003. Biologically functional constituents of spices and herbs (2002's JSNFS award for excellence in research). Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science 56: 389-395.

Nikravesh MR, Jalali M and Mohammadi S, 2010. Effects of crude Onion extract on murine testis. Journal of Reproduction and Infertility 10(4): 239-44. (In Persian).

Oehninger S, 2001. Strategies for the infertile man. Seminars in Reproductive Medicine 19: 231-7.

Ommati MM, Zamiri MJ, Akhlaghi A, Atashi H, Jafarzadeh MR, Rezvani MR, and 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.

Patricia Garcia-Salas, Aranzazu Morales-Soto, Antonio Segura-Carretero and Alberto Fernández-Gutiérrez, 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples Molecule 15: 8813-8826.

Purdy PH, Ericsson SA, Dodsona RE, Sternes KL and Garner DL, 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. Small Ruminant Research 55: 239-243.

Revell S and Mrode R, 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Animal Reproduction Science 36:77-86.

Ramezaninejad H and Roostaei-Ali Mehr M, 2017. Storage of rooster semen in liquid form using alcoholic extract of rosemary. Iranian journal of Animal Science 48(1):51-59.

Sadeghpour S, Ghasemzadeh A, Nouri M, Danaii SH and Qhasemnejad Berenji H, 2004. Effects of Antioxidative treatments on sperm DNA fragmentation and pregnancy results in IUI.The journal of Urmia University of Medical Sciences 25(12): 1027-3727. (In Persian).

Safa S, Moghaddam Gh, Jafari Jozani R , Daghigh Kia H , Janmohammadi H and Nemati Z, ۲۰۱٦. Evaluation the effects of different levels of vitamin E and Nano Selenium on sperm quality parameters of Leghorn rooster during chilled storage on 4◦C. Journal of Animal Science Researches 26 (4): 59-70.

Scott T, 1973. Lipid metabolism of spermatozoa. Journal of Reproduction and fertility Supplement 18:65-76.

Shafigh H, Shakeri M, Zeinoaldini S, Kohram H, Zhandi M and Moghbeli M, 2016. improving Sperm cryopreservation of rooster by using rosemary alcoholic essential oil. Journal Animal Production 18:615-624. (in Persian).

Sexton KJ, Renden JA, Marple DN and Kempainen RJ, 1989. Effects of dietary energy on semen production, fertility, plasma testosterone and carcass composition of broiler-breeder males in cages. Poultry Science 68:1688–1694.

Shanmugam M, Vinoth A, Rajaravindra KS and Rajkumar U, 2014. Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. Animal Reproduction Science 145(1-2):81-٨5.

Surai P, Kostjuk I, Wishart G, Macpherson A, Speake B, Noble R, Ionov I and Kutz E, 1998. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. Biological Trace Element Research 64: 119-132.

Song GJ, Norkus EP and Lewis V, 2006. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in fertil men. International Journal of Andrology 29(6):569-75.

Syrai PE, Cerrolini S, Wishart GJ, Speake BK, Noble RC and Sparks NHC, 1998. Lipid and antioxidant composition of chicken semen and its susceptibility to peroxidation. Poultry Avian Biology 9:11-23.

Tousson E, Bayomy MF and Ahmed AA, 2018. Rosemary extract modulates fertility potential, DNA fragmentation, injury, KI67 and P53 alterations induced by etoposide in rat testes. Biomedicine and Pharmacology 98:769-774.

Ziaeirad H, Roostaei-AliMehr M and Mohammadi M, 2015. Effect of silymarin on rooster semen during storage at 4 °C. Journal of Animal Science Researches 26(3): 1- 13. (in Persian).

Effect of rosemary extract on DNA damage and some parameters of rooster semen in liquid storage condition

A Fallahi*[1], S Mohammadzadeh[2] and A Foruharmehr[2]

Received December 2, 2018 Accepted: November 26, 2019
[1]MSc, Department of Animal Science, Lorestan University, Khorram Abad, Iran
[2]Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Animal Science, Lorestan University, Khorram Abad, Iran
*Corresponding author: Email: akramfallahipoor@gmail.com

پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Researches
Journal of Animal Science/vol.29 No.4/ 2020/pp 55-67
https://animalscience.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Introduction: The increasing use of artificial insemination (AI) in the poultry industry emphasizes the need for the sharing of good quality sperm. The evaluation of semen quality characteristics of poultry gives an excellent sign of their reproductive potential and has been reported to be a major determinant of fertility and subsequent hatchability of eggs. In poultry industry in order to take advantage of new AI techniques, proper storage of poultry semen is needed. As poultry semen is viscous, highly concentrated, with low volume, containing 6 (chicken) to 12 (turkey) billion spermatozoa/ mL, the extension of good semen with a proper diluent is required prior to AI and storage. Reproduction performance is affected some factors include; nutrition, genetic, management, and environment. One of the fundamental aim in poultry industry is production of fertile eggs with high hatchability. In reproduction physiology, male and female are important, but sire effect is more than dam because of breeding program, semen samples could be applied for females. In layer industry, number of females are more than males; so, artificial insemination is an important tool for genetic diversity and high reproductive performance. One of the major problems in artificial insemination is low quality of poultry semen. Freezing and thawing have adverse effects on sperm viability. Since lipids (poly unsaturated fatty acids) are important part of plasma membrane of sperm cells, it could be destroyed in short times of storage in a liquid condition. It has been reported that antioxidants can be employed to prevent sperm damage during chilling storage condition (Malo et al. 2011). It is well known that sperm of farm animals is highly sensitive to oxidative stress (Surai et al. 1998). The high concentration of polyunsaturated fatty acids in the cell membrane of the sperm is also considered as another key factor for susceptibility to the oxidative stress. The process of semen production of reactive oxygen species (ROS) may lead to impairment of sperm morphology, motility, and finally viability. Pharmacological plants have some antioxidant components, which decrease free radical levels in organism. One of the major problems in sperm viability is sperm fragmentation. In this case, nucleus chromatin of sperm damages or splits. In some cases, the motility and normality of the semen analysis is acceptable, but the sperm nucleus of sample is damaged. Different tests are available for detection of sperm DNA damages like COMET assay, TUNEL assay, SCSA, and Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test. Among these assays, the SCD test is a simple and low-cost method for the analysis of sperm DNA fragmentation (Shanmugam et al., 2014). This method is based on the principle that sperm with DNA fragmentation fails to produce halo of dispersed DNA loops when mixed with agarose followed by acid denaturation and nuclear protein removal. The halos can be visualized using bright-field

microscopy after staining with Wright's stain. This study was designed to evaluate the effects of Rosemary extract on rooster semen parameters during chilling storage condition at 4ºC.

Material and methods: Dimension of individual cages were 85×70×70cm. Photoperiod program was applied based on 10 h darkness and 14h light. Water and feed were ad libitum. Rooster were fed corn and soybean meals based on 2107 kcal and 12% protein per Kg of dry matter. The semen was collected twice a week for six times from 10 mature roosters using abdominal rubbing method. As the rooster responded to abdominal rubbing by everting its cloaca, the ejaculate was collected using a graduated pipette; then, total volume was recorded. Urine or fecal contamination was discarded. Fresh semen was evaluated for sperm concentration using a haemocytometer. The semen samples were diluted by Sexton extender and evaluated at 25-27 °C. Then, the samples were divided into six equal parts. Different treatments were including: 0(control), 15, 25, 35, 45 and 60 µg/ml of Rosemary extract. Rosemary extract were added to each part and kept at 4^{o}C for 72h. The parameters included motility, viability and plasma membrane integrity were evaluated at 0, 24, 48 and 72 h after storage. Also, DNA fragmentation was evaluated 48h after storage at 4 ^{o}C. In this method, sample is affected by acid treatment and denatures sperm chromatin. For elimination of proteins from chromatin, DNA strands are scattered around the sperm head and then, a halo forms around the sperm head. With staining, halo is visible under the microscope. Halo in fragmented sperm is very small. Data of the experiment were analyzed by Proc ANOVA SAS software (repeated measurement) and means were compared by Duncan's multiple range test.

Results and discussion: Sperm during time of storage undergoes different changes and potentially undergoes mechanical and oxidative damages. At the time of storage in liquid condition, free radicals are released and sperm performance decreases significantly. The results of this experiment revealed that applying 35 µg/ml Rosemary extract could decrease DNA fragmentation ($P<0.05$). It seems that this concentration of Rosemary extract has antioxidant properties in rooster semen. Avian sperm have high concentration of long chain polyunsaturated fatty acids within the phospholipids and therefore, are prone to peroxidation damage (Blesbois et al. 1997). Also, after 48h of storage, motility, viability and sperm plasma membrane integrity were lower in treatment 60µg/ml Rosemary extract than control group ($P<0.05$). Finally, it was demonstrated that 48h after storage, motility, viability and sperm plasma membrane integrity in samples treated by 35µg/ml Rosemary extract were higher than control group ($P<0.05$). High level of reactive oxygen species (ROS) in oxidative stress is related to DNA fragmentation. Free radicals oxidize purine and pyrimidine bases of DNA structure of sperm and it causes damage DNA structure. The prevention of free radicals is the first defense line of antioxidants against oxidative damage. Rosemarry extract improved rooster sperm quality after thawing (Shafigh et al. 2016). This is the first study to report the use of DNA fragmentation test in rooster sperm in Iran. This is a simple technique requiring no sophisticated instruments when Wright stain is used for visualization of the halos. According to the results of this study, it seems that applying 35µg/ml Rosemary extract can be useful in rooster semen at 4 ^{o}C. Rosemary extract effectively reduced DNA fragmentation. This effect seems to be associated with the high motility of treatment (35µg/ml Rosemary extract) compare with other treatments.

Keywords: DNA Fragmentation, Rooster, Rosemary extract, Sperm