



## Improving the Sperm Quality by supplementation the Disaccharide Trehalose to Semen Extender in Rooster

Saleh Tabatabaei Vakili<sup>1</sup> , Safoura Barzegar<sup>2</sup> 

1. Corresponding author, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran; Department of Theriogenology and Poultry Disease, Urmia University, Urmia, Iran. Email: [tabatabaei@asnrukh.ac.ir](mailto:tabatabaei@asnrukh.ac.ir)
- 2., Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: [s.barzegar@asnrukh.ac.ir](mailto:s.barzegar@asnrukh.ac.ir)

| Article Info                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Article type:</b><br>Research Article                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | The aim of this study was to investigate the effect of trehalose on semen quality of Ross-308 roosters during 24 hours of storage at 5°C. Semen samples were collected from 10 adult roosters and diluted with Ringer's solution containing different concentrations of trehalose (0, 50, and 100 mM). The experiment was conducted in a completely randomized design with three treatments and four replicates. Semen quality was assessed at 0, 6, 12, and 24 hours of storage. Evaluated parameters included total and progressive motility, viability, plasma membrane integrity, and morphological abnormalities. Data were analyzed using SAS software. The results indicated that addition of 50 mM trehalose significantly improved sperm quality at all storage times compared with both the control and the 100 mM treatment. In this group, total and progressive motility, viability, and membrane integrity were increased, while morphological abnormalities were reduced. On the other hand, the use of a higher concentration of trehalose (100 mM) not only did not improve sperm quality parameters, but also showed a negative effect on certain indices, including sperm morphology. In conclusion, supplementation of rooster semen diluent with 50 mM trehalose exerts a protective effect and is recommended for short-term storage at low temperature (5 °C). However, higher concentrations are not advisable due to their detrimental impact on sperm quality. |
| <b>Article history:</b><br>Received: 5 December 2025<br>Received in revised form: 7 May 2026<br>Accepted: 10 May 2026<br>Published online: Autumn 2026                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Keywords:</b><br><i>Rooster, Semen storage, Sperm quality, Trehalose.</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Cite this article:</b> Tabatabaei- Vakili, S. & Barzegar, S. (2026). Improving the Sperm Quality by supplementation the Disaccharide Trehalose to Semen Extender in Rooster. <i>Iranian Journal of Animal Science</i> , 57 (3), 369-384. DOI: <a href="https://doi.org/10.22059/ijas.2026.407236.654109">https://doi.org/10.22059/ijas.2026.407236.654109</a> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.407236.654109>

**Publisher:** The University of Tehran Press.

## Extended Abstract

### Introduction

Trehalose, a non-reducing disaccharide with membrane-stabilizing and antioxidant properties, has shown protective effects in sperm preservation across various species. Its mechanisms of action are primarily due to the prevention of ice crystal formation, reduction of oxidative stress, and stabilization of the plasma membrane. However, the optimal concentration of trehalose appears to vary between species and extender types. Despite extensive research on mammalian sperm cryopreservation, there is limited information on the effects of trehalose on poultry semen, particularly rooster sperm. The aim of the present study was to evaluate the effect of two concentrations of trehalose (50 and 100 mM) added to Ringer's extender on sperm quality parameters of aging Ross roosters stored for 24 hours at 5 °C.

### Materials and Methods

The study was carried out on ten mature Ross roosters (45 weeks of age). Birds were kept under controlled environmental conditions for two weeks prior to semen collection, with ambient temperature maintained at 19–23 °C and a photoperiod of 14 hours light and 10 hours dark. Feed and water were provided ad libitum in accordance with Ross management guidelines. Semen was collected by abdominal massage every three days in four separate sessions. Immediately after collection, ejaculates were placed in pre-warmed tubes (38 °C) and transferred to the laboratory. After initial evaluation, ejaculates with poor quality were discarded, and only samples meeting the required standards were pooled. Each pooled sample was diluted at a ratio of 1:20 with Ringer's solution and divided into three experimental groups: control (without trehalose), extender supplemented with 50 mM trehalose, and extender supplemented with 100 mM trehalose. Diluted semen samples were stored at 5 °C for 24 hours, and assessments were performed at 0, 6, 12, and 24 hours of storage. The parameters measured included total motility and progressive motility (evaluated under phase-contrast microscopy, 40× magnification), viability (eosin-nigrosin staining), plasma membrane integrity (hypo-osmotic swelling test), and morphological abnormalities. The experiment was conducted in a completely randomized design with three treatments and four replicates. Data were analyzed using the GLM procedure of SAS software. Least square means were compared using Duncan's multiple range test, and differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

### Results and Discussion

The addition of trehalose significantly influenced sperm quality parameters during storage. The 50 mM trehalose treatment consistently preserved higher values of total and progressive motility compared with both the control and the 100 mM group ( $P < 0.05$ ). This effect was particularly evident at 12 and 24 hours of storage, where the differences between treatments were most pronounced. In contrast, the 100 mM trehalose treatment in some cases presented a negative trend on sperm morphology. Sperm viability was markedly enhanced in the 50 mM group, with higher percentages of live spermatozoa throughout the storage period compared to the other treatments. Similarly, plasma membrane integrity was best maintained with 50 mM trehalose, confirming its protective role in preserving sperm structural functionality. The incidence of morphological abnormalities was also significantly reduced in the 50 mM group. The findings of this study clearly demonstrate the protective role of trehalose at the optimal concentration of 50 mM in preserving rooster sperm during short-term storage at 5 °C. The beneficial effects of trehalose can be attributed to its ability to stabilize the lipid bilayer of the sperm plasma membrane, prevent osmotic stress, and reduce lipid peroxidation. These results are consistent with previous reports in mammalian species such as bull, ram, and rabbit, where trehalose supplementation improved post-storage sperm quality. However, the lack of beneficial effects at 100 mM trehalose suggests that excessive concentrations may induce hyperosmotic stress, leading to detrimental impacts on spermatozoa. Such concentration-dependent responses highlight the importance of optimizing trehalose levels for each species and storage condition. This study also underlines the potential of trehalose as a non-toxic, cost-effective additive that could be incorporated into rooster semen extenders to enhance fertility outcomes in artificial insemination programs. Nevertheless, further research is necessary to investigate fertility performance following insemination with trehalose-treated semen and to compare trehalose with other protective agents under different extender formulations and storage conditions.

### **Conclusion**

In conclusion, supplementation of Ringer's extender with 50 mM trehalose significantly improved semen quality in aging Ross roosters during 24-hour storage at 5 °C. This concentration effectively preserved motility, viability, plasma membrane integrity, and reduced morphological abnormalities compared with the control. The higher concentration (100 mM) was not beneficial and may even have adverse effects. These results suggest that 50 mM trehalose can be recommended as an effective additive for short-term storage of rooster semen. Future studies should focus on fertility trials, longer storage periods, and interaction effects with other extender components to validate the practical applications of these findings.

### **Author Contributions**

Saleh Tabatabaei Vakili: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing-Review & Editing  
Safoura Barzegar: Investigation, Software, Formal analysis, Writing-Original draft

### **Data Availability Statement**

Data available on request from the authors

### **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledged the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan for supporting and funding this research.

### **Ethical considerations**

The study was approved by the Ethics Committee of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

### **Conflict of interest**

The author declares no conflict of interest.

## بهبود کیفیت اسپرم خروس با افزودن دی ساکارید ترهالوز به رقیق کننده منی

صالح طباطبائی وکیلی<sup>۱</sup> | صفورا برزگر<sup>۲</sup>

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران و گروه

مامایی و طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: [tabatabaei@asnrukh.ac.ir](mailto:tabatabaei@asnrukh.ac.ir)

۲. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران. رایانامه:

[s.barzegar@asnrukh.ac.ir](mailto:s.barzegar@asnrukh.ac.ir)

| اطلاعات مقاله                            | چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>نوع مقاله:</b>                        | هدف این پژوهش، بررسی اثر ترهالوز بر کیفیت اسپرم خروس‌های نژاد راس ۳۰۸ طی نگهداری ۲۴ ساعته در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه‌های منی از ۱۰ خروس بالغ جمع‌آوری، مخلوط و پس از رقیق‌سازی با محلول رینگر اصلاح شده به ۳ گروه آزمایشی شامل سطوح مختلف ترهالوز (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) تقسیم و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی کیفیت اسپرم در هر نمونه آزمایشی طی چهار زمان صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از نگهداری انجام شد. شاخص‌های مورد مطالعه دربر گیرنده‌ی تحرک کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلاسمایی و ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم‌ها بودند. نتایج نشان داد افزودن ترهالوز با غلظت ۵۰ میلی‌مولار در اغلب زمان‌های آزمایش و بخصوص بعد از ۶ ساعت از ذخیره‌سازی منی، به‌طور معنی‌داری کیفیت اسپرم را بهبود بخشید و نسبت به گروه شاهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار برتر بود. به نحوی که در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز، تحرک کل و پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم افزایش یافت و میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی کاهش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). در مقابل، استفاده از غلظت بالاتر ترهالوز (۱۰۰ میلی‌مولار) نه تنها سبب بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم نشد، بلکه در برخی شاخص‌ها از جمله مورفولوژی اسپرم، اثر منفی نشان داد. به طور کلی از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که افزودن ترهالوز به رقیق کننده منی خروس در غلظت بهینه ۵۰ میلی‌مولار نقش حفاظتی موثری بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم دارد و در نگهداری کوتاه‌مدت در دمای پایین توصیه می‌شود، اما استفاده از غلظت‌های بالاتر مناسب نیست. |
| <b>تاریخ دریافت:</b> ۱۴۰۴/۰۹/۱۴          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>تاریخ بازنگری:</b> ۱۴۰۵/۰۲/۱۷         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>تاریخ پذیرش:</b> ۱۴۰۵/۰۲/۲۰           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>تاریخ انتشار:</b> پاییز ۱۴۰۵          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>کلیدواژه‌ها:</b>                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ترهالوز، خروس، کیفیت اسپرم، نگهداری منی. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

**استناد:** طباطبائی وکیلی، صالح و برزگر، صفورا (۱۴۰۵). بهبود کیفیت اسپرم خروس با افزودن دی ساکارید ترهالوز به رقیق کننده منی. نشریه علوم دامی ایران، ۵۲ (۳)، ۳۶۹-۳۸۴

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.407236.654109>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijas.2026.407236.654109>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

افزایش مداوم جمعیت جهان و تقاضای فزاینده مرتبط برای محصولات با منشأ حیوانی از جمله مرغ (تخم‌مرغ، گوشت)، گسترش راه‌حل‌های مدرن برای افزایش کارایی تولید به منظور کاهش هزینه‌های آن ضروری می‌کند. یکی از اهداف اصلی در بخش پرندگان، تولید تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار در مقیاس زیاد همراه با قابلیت جوجه‌دآوری بالا است. اگرچه هم مرغ‌ها و هم خروس‌ها به‌طور چشمگیری در رسیدن به نرخ باروری رضایت‌بخش در گله نقش دارند، اما به دلیل تعداد کمتر خروس‌ها نسبت به مرغ‌ها، تأثیر آن‌ها محسوس‌تر است (Ommati et al., 2013). مدیریت خروس و حفظ باروری در دوران تولید از مهمترین مسائل مورد توجه مدیران واحدهای مرغ مادر است. از طرف دیگر، دستیابی به این هدف، نیازمند یک برنامه مدیریتی منظم و هماهنگ برای رسیدن به حداکثر پتانسیل تولید می‌باشد (Devasagayam et al., 2004).

باروری یکی از عوامل اصلی تأثیرگذار بر پیامد اقتصادی در گله‌های طیور است و تحت تأثیر متغیرهای مختلفی مانند نژاد، کیفیت تغذیه، سن گله و کیفیت مایع منی تلقیح شده قرار می‌گیرد (Miazi et al., 2012). در جهت بهبود نرخ باروری و ارتقاء کیفیت نسل پرندگان، تلقیح مصنوعی که امکان کاهش تعداد نرها و انتخاب بهینه خروس‌های برتر برای گله را فراهم می‌آورد، به طور قطع به دستیابی به این اهداف کمک می‌کند. مایع منی در نظر گرفته شده برای تلقیح باید کیفیت بسیار خوبی داشته باشد. کیفیت منی به مواردی از جمله منشأ ژنتیکی (Ameen et al., 2014)، تغذیه به‌ویژه آنتی‌اکسیدان‌ها در خروس (Jerysz and qukaszewicz, 2013) که بر فعالیت بافت بیضه طی اسپرم‌زایی تأثیر می‌گذارند (Barber et al., 2005)، نوع رقیق‌کننده منی انتخاب شده برای گونه‌ها (Kowalczyk et al., 2017)، زمان سپری شده از جمع‌آوری مایع منی و شرایط نگهداری قبل از تلقیح (Siudzińska and qukaszewicz, 2008) بستگی دارد.

با افزایش سن پرنده خصوصاً از هفته‌های ۴۰ الی ۴۵ تا انتهای دوره تولید به عبارت بهتر پس از پیک تولید گله‌های مادر، قدرت باروری خروس‌ها کاهش یافته و گله را با مشکل باروری مواجه می‌سازد (Sarabia Frago et al., 2023). محققان تغییر در برخی از شاخص‌های کمی و کیفی مرتبط با تولیدمثل شامل کاهش در وزن بیضه، غلظت هورمون تستوسترون، حجم مایع منی، غلظت اسپرم و تحرک پیش‌رونده اسپرم را با افزایش سن پرنده گزارش کرده‌اند (Avital-Cohen et al., 2013). ترکیبی از عواملی مانند افزایش وزن بدن و استرس اکسیداتیو، کاهش تستوسترون، کاهش رفتار تولیدمثلی، تولید کم اسپرم و کیفیت پایین اسپرم در اختلالات تولیدمثل گله‌های مسن دخیل است. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در منی خروس با افزایش سن کاهش می‌یابد (Kelso et al., 1996).

غشای پلاسمایی نقش مهمی در شکل‌گیری و حفظ بسیاری از عملکردهای اسپرم ایفا می‌کند. سه جز اصلی در غشای پلاسمای وجود دارد: فسفولیپیدها، استرول‌ها و گلیکولیپیدها. بسیاری از پژوهش‌ها نقش ویژه فسفولیپیدهای دارای مقدار قابل توجهی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFA) را مشخص کرده‌اند که درجه لازم جهت سیالیت غشا را فراهم می‌کنند، اما در عین حال بیشترین آسیب‌پذیری را نسبت به اثر مضر گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون دارند (Gautier and Aurich, 2022). بنابراین یکی از راه‌های بهبود کیفیت مایع منی در تلقیح مصنوعی، استفاده از رقیق‌کننده‌های مناسب است که به‌ویژه حاوی مواد آنتی‌اکسیدانی بوده و به حفظ و بهبود کیفیت مایع منی کمک می‌کنند. آن‌ها می‌توانند از غشای سلولی محافظت کرده و از آزاد شدن لیپیدها و فسفولیپیدها از اسپرم به داخل پلاسمای مایع منی طی نگهداری طولانی مدت جلوگیری کنند (Dimitrov et al., 2007).

ترهالوز، یک دی‌ساکارید غیر احیاکننده دارای دو مولکول گلوکز است که با پیوند گلیکوزیدی ( $\alpha$ -d-glucopyranosyl-1,1) به هم مرتبط شده‌اند و معمولاً در غلظت‌های بالا در هاگ‌های برخی مخمر و قارچ‌ها از جمله ساکارومایسس و آسپرژیلوس یافت می‌شود (Aisen et al., 2000). ترهالوز به‌عنوان تثبیت‌کننده غشای سلول اسپرم عمل می‌کند (Ahmad and Aksoy, 2012). مشخص شده است که دی‌ساکارید ترهالوز قادر است از لیپیدها و پروتئین‌های غشای پلاسمایی سلولی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از قرار گرفتن در معرض گونه‌های فعال اکسیژن محافظت کند و از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع جلوگیری کند (Herdeiro et al., 2006). ترهالوز با ایجاد سه مکانیسم از جمله جلوگیری از خروج آب از سیتوزول سلولی، به حداقل رساندن تشکیل بلورهای یخ و اطمینان از پایداری شیمیایی مولکول‌های زیستی از مولکول‌های بیولوژیکی

محافظت می‌کند. این مکانیسم‌ها باعث شده است که، ترهالوز به‌عنوان یک جز زیستی بسیار موثر برای محیط‌های محافظ سرما عمل کرده و در حفظ یکپارچگی مورفولوژیکی اسپرم‌ها و عملکرد آن‌ها در دمای بسیار پایین نقش داشته باشد (Kikawada et al., 2007). باتوجه به اهمیت تولید تخم نطفه‌دار و کاربرد گسترده تلقیح مصنوعی در صنعت طیور، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر ترهالوز بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم خروس در شرایط نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

### پیشینه پژوهش

قندها در جلوگیری از تغییرات زیان‌آور غشای سلولی اسپرم‌ها در طول ذخیره و نگهداری نمونه‌های منی نقش کلیدی دارند. این ترکیبات عملکردهای بسیاری برای اسپرم مانند فراهم‌سازی انرژی در طول انکوباسیون، حفظ فشار اسمزی، نقش محافظتی، افزایش سیالیت غشای سلولی داشته و به اسپرم‌ها این قابلیت را می‌دهند تا آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد و یخ‌گشایی را تحمل کند. مکانیسمی که به‌وسیله آن ترهالوز از سلول‌ها در برابر ذخیره‌سازی محافظت می‌کند، به‌نظر می‌رسد که شامل برقراری ثبات در پروتئین‌ها و غشاهای سلولی باشد. اگرچه طبیعت این مکانیسم همچنان مبهم باقی مانده است، برخی مطالعات بر این باورند که توقف آسیب در سیالیت غشای سلول عامل آن می‌باشد (Bathgate et al., 2008; Hassani-Bafrani et al., 2020).

در تحقیقات پیشین، اثرات مثبت ترهالوز بر اسپرم در طی فرایند ذخیره و انجماد گزارش شده است. به نحوی که ترهالوز کیفیت منی را در حیوانات اهلی از جمله گوسفند (Aisen et al., 2000)، بز (Naing et al., 2010) و گاو (Arifiantini and Yusuf, 2010) بهبود بخشید. مولکول‌های ترهالوز می‌توانند بین فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم وارد شده و با افزایش سیالیت غشا، سبب حفاظت از اسپرم در هنگام انجماد یا یخ‌گشایی شوند (Ahmad and Aksoy, 2012). به عنوان مثال، بهترین نتایج در اسپرم گوسفند با استفاده از ترکیب‌های تریس، اسید سیتریک، فروکتوز، زرده تخم‌مرغ و گلیسرول غنی‌سازی شده با ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌اسمول ترهالوز به دست آمد، در حالی که کیفیت اسپرم پس از یخ‌گشایی به طور قابل توجهی با ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌اسمول ترهالوز کاهش یافت (Jia et al., 2024). با وجود این، هنوز برخی اختلاف نظرها در مورد خواص محافظت‌کنندگی ترهالوز برای اسپرم وجود دارد. در یک پژوهش، ترهالوز کیفیت اسپرم‌های منجمد شده بز را بهبود نبخشید (Quan et al., 2012). علاوه بر این، ترهالوز تاثیرات منفی بر فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی داشت (Bittencourt et al., 2018). همچنین با افزودن ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول ترهالوز به محیط رقیق‌کننده قوچ، تحرک و مورفولوژی اسپرم پس از یخ‌گشایی بهبود نیافت (Cirit et al., 2013).

در انسان مشخص شد که با افزودن ترهالوز به محیط‌های انجمادی، بقا و فراسنجه‌های کیفی اسپرم شامل تحرک کلی و پیشرفته، نرخ اسپرم‌های زنده، سلامت غشاء سلولی، یکپارچگی DNA و آکروزوم بهبود یافت و اسپرم‌های درمان شده با ترهالوز در محیط انجماد، مورفولوژی غیرطبیعی کمتری داشتند. از طرف دیگر، آسیب اکسیداتیو با ارزیابی غلظت مالون‌دی‌آلدئید به طور چشمگیری روند کاهشی داشت. بر اساس این نتایج، استفاده از ترهالوز در محیط نگهداری اسپرم به عنوان یک استراتژی مناسب، می‌تواند به بهبود تحرک و پارامترهای سلولی اسپرم کمک کند (Gholami et al., 2023).

### روش‌شناسی پژوهش

تحقیق حاضر با استفاده از ۱۰ قطعه خروس نژاد راس ۳۰۸ با سن ۴۵ هفته انجام شد. پرنده‌ها در دمای ۱۹-۲۳ درجه سانتی‌گراد، تحت برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب به صورت آزاد و خوراک روزانه به مقدار ۱۵۰ گرم بر اساس کاتالوگ سویه راس در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت. پس از دو هفته عادت‌دهی خروس‌ها، نمونه‌های منی با مالش شکمی هر سه روز یکبار در چهار نوبت جمع‌آوری شد. نمونه‌های منی پس از جمع‌آوری درون فلاسک آب گرم ۳۸ درجه سانتی‌گراد به دور از نور و تکان شدید به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه در آغاز غلظت و تحرک هر نمونه تعیین شد و بر پایه‌ی آن نمونه‌هایی با غلظت کمتر از  $3 \times 10^9$  و تحرک کمتر از ۷۰ درصد از آزمایش حذف شدند. نمونه‌ی منی تجمع شده با رقیق‌کننده رینگر اصلاح شده (شامل کلرید سدیم ۶/۸ گرم، کلرید پتاسیم ۱/۷۳ گرم، کلرید کلسیم ۰/۶۴ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲۵ گرم و بیکربنات سدیم ۲/۴۵ گرم در یک لیتر آب مقطر) با نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شد و به سه بخش مساوی تقسیم و سپس به مقدار صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز به هر بخش اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

نگهداری شدند. تحرک کل، تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ذخیره‌سازی اندازه‌گیری شد (Bazpour et al., 2019).

### بررسی فراسنجه‌های اسپرم

برای بررسی تحرک اسپرم، ۵ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده روی لام قرار گرفت. پس از گذاشتن لام، حرکت اسپرم‌ها توسط میکروسکوپ فاز کنتراست (المپوس، ژاپن) مجهز به صفحه گرم و با بزرگنمایی  $\times 400$  ارزیابی شد. اسپرم‌ها بر اساس نوع حرکت در قالب دو دسته تحرک کل و پیشرفته (جلورونده) ارزیابی شدند. درصد هر نوع تحرک از تعداد کل اسپرم‌های مشاهده شده در هر میدان دید محاسبه شد. میانگین درصد تحرک کل و پیشرفته از پنج میدان دید مختلف به عنوان نتیجه نهایی برای هر نمونه گزارش گردید (Sharideh et al., 2019).

ارزیابی زنده‌مانی و ناهنجاری مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از رنگ اتوزین-نیگروزین انجام شد. به این منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از رنگ مخلوط شد و پس از ۳۰ ثانیه در دمای اتاق، ۵ میکرولیتر از نمونه را روی لام قرار داده و گسترش تهیه شد. در نهایت لام‌های تهیه شده با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی  $\times 400$  مورد بررسی قرار گرفتند و ۲۰۰ اسپرم شمارش شد، اسپرم‌های به رنگ صورتی مرده (پاسخ مثبت) و اسپرم‌های سفید یا بی رنگ زنده (پاسخ منفی) در نظر گرفته شدند. برای بررسی اسپرم‌های ناهنجار، نمونه‌ی کوچکی از منی روی لام با رنگ اتوزین-نیگروزین رنگ آمیزی شد. سپس، درصد اسپرم‌های ناهنجار با استفاده از روغن ایمرسیون و شمارش حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام تحت بزرگ‌نمایی  $\times 1000$  میکروسکوپ تعیین گردید. در ارزیابی مورفولوژی اسپرم، مواردی همچون سر غول پیکر، کوچک یا غیرطبیعی، قطعه میانی متورم و خمیده و دم خمیده یا پیچ‌خورده مورد توجه قرار گرفتند (Kazemizadeh et al., 2019).

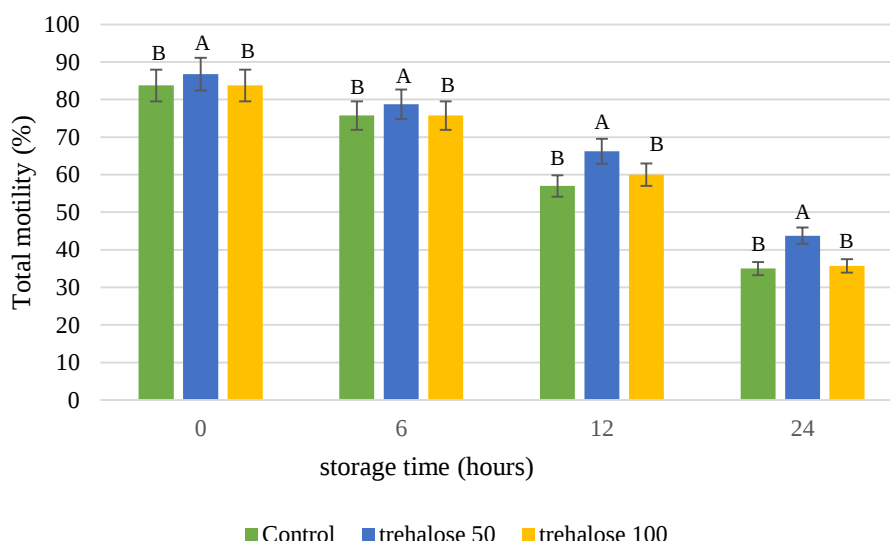
برای تعیین عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هایپواسموتیک (۰/۳۷۵ گرم سیترات سدیم دی هیدرات و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس یک قطره از آن روی لام ریخته و با لامل پوشانده شد داده شد و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی  $\times 40$  مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده به عنوان پاسخ مثبت (غشای پلاسمایی سالم) و اسپرم‌های با دم بدون پیچ‌خوردگی به عنوان پاسخ منفی (غشای پلاسمایی ناسالم) در نظر گرفته شدند (Sharideh et al., 2019).

### آنالیز آماری

مطالعه‌ی حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار آزمایشی و ۴ تکرار برای هر تیمار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه 9.4) و مدل خطی عمومی (GLM) همراه با مدل اندازه‌گیری مکرر (Repeated Measures) انجام شد. برای بررسی اثرات زمان، تیمار و اثر متقابل آن‌ها، از روش LSmeans و آزمون Duncan's Multiple Range Test در سطح ۰/۰۵ برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید.

### یافته‌های پژوهش

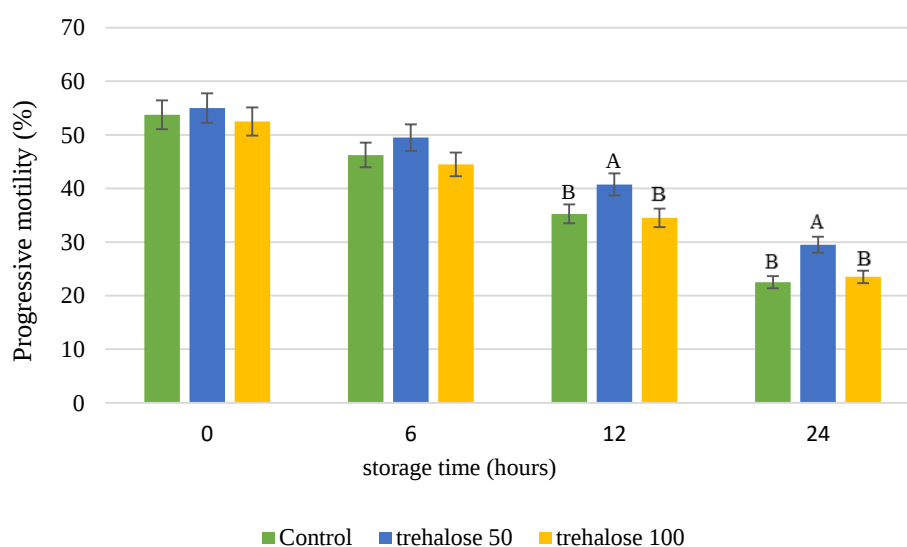
تاثیر تیمارهای آزمایشی بر تحرک کل اسپرم‌ها در شکل ۱ مشخص شده است. در گروه شاهد، کاهش معنی‌داری در تحرک اسپرم با گذشت زمان مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز، علی‌رغم کاهش تحرک اسپرم از ۸۶/۷۵ به ۴۳/۷۵ درصد در طول زمان، این گروه در تمامی زمان‌ها تحرک بیشتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. در گروه ترهالوز ۱۰۰ میلی‌مولار، روند کاهش تحرک اسپرم به لحاظ آماری مشابه گروه شاهد بود. در مقایسه بین گروهی در زمان‌های مختلف مشخص شد که در زمان صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ بیشترین میزان تحرک مربوط به تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بود و تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز هیچ اختلافی با گروه شاهد نداشت.



شکل ۱. اثر ترهالوز بر تحرک کل اسپرم مسن گوشتی در شرایط دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

**Figure 1.** The effect of trehalose on the total sperm motility of aged broiler roosters at 5°C

شکل ۲، تغییرات تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها در بین گروه‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. در گروه شاهد، کاهش معنی‌داری در تحرک پیش‌رونده اسپرم در طول زمان دیده شد ( $P < 0.05$ ). اما، تیمار ترهالوز ۵۰ میلی‌مولار از نظر حفظ تحرک پیش‌رونده عملکرد بهتری نسبت به گروه شاهد و گروه ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت از ذخیره منی داشت. در زمان صفر و ۶ ساعت از ذخیره‌سازی منی، تحرک پیش‌رونده اسپرم‌ها تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. این در حالی است که در زمان‌های بعدی تا ۲۴ ساعت، گروه ۵۰ میلی‌مولار سبب حفظ تحرک پیش‌رونده اسپرم شد ( $P < 0.05$ ).

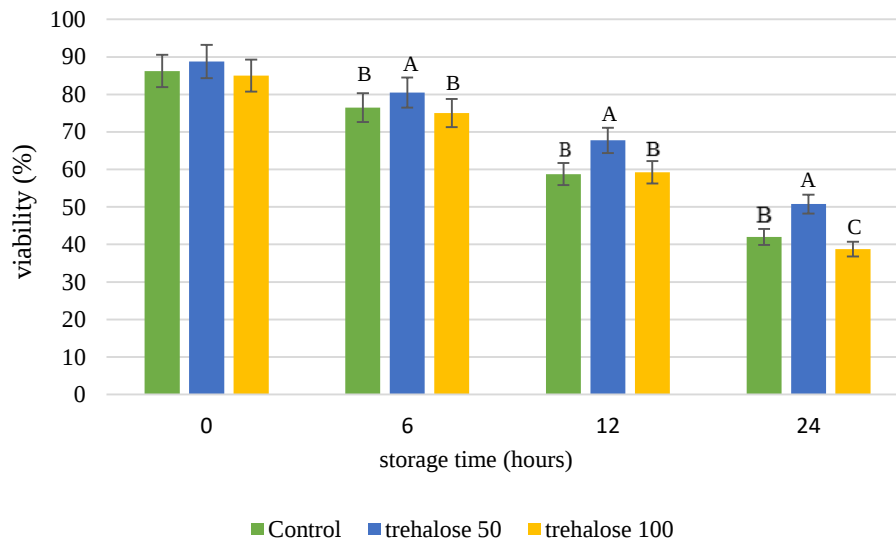


شکل ۲. اثر ترهالوز بر تحرک پیش‌رونده اسپرم مسن گوشتی در شرایط دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

**Figure 2.** The effect of trehalose on the progressive sperm motility of aged broiler roosters at 5°C

طبق نتایج شکل ۳ در خصوص زنده‌مانی اسپرم، با افزایش زمان نگهداری منی، زنده‌مانی اسپرم در گروه شاهد کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). این شاخص از ۸۶/۲۵ در زمان صفر به ۴۴/۰۰ درصد در ۲۴ ساعت کاهش یافت. زنده‌مانی اسپرم با گذشت زمان در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز کاهش یافت (از ۸۸/۷۵ به ۵۰/۷۵ درصد)، اما این کاهش نسبت به گروه شاهد با شیب کمتری همراه بود. در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت، ترهالوز ۱۰۰ میلی‌مولار به لحاظ مقدار زنده‌مانی اسپرم روندی مشابه با گروه شاهد داشت.

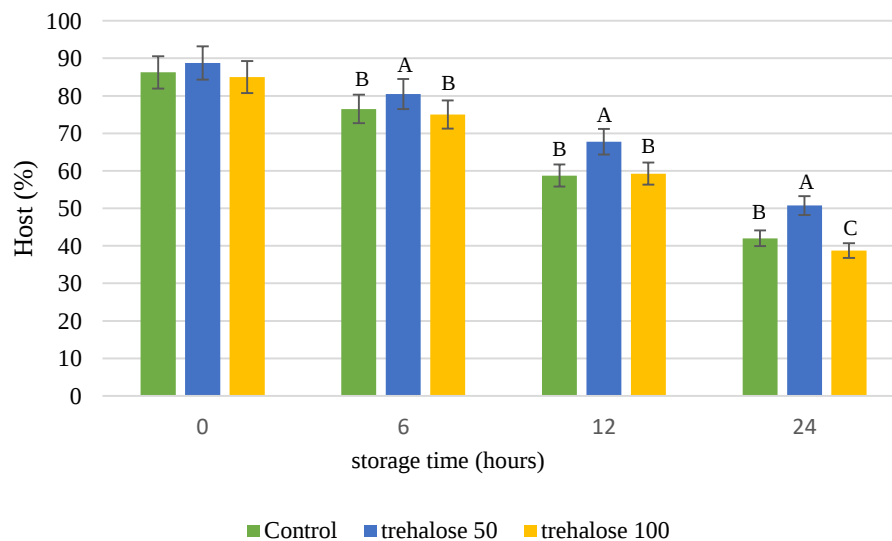
پایان زمان نگهداری (۲۴ ساعت)، این گروه کمترین مقدار زنده‌مانی را داشت. در مقایسه بین گروه‌ها در زمان صفر اختلاف آماری بین تیمارها معنی‌دار نبود. در زمان ۶ گروه ۵۰ میلی‌مولار با ۸۰/۵۰ درصد، بیشترین زنده‌مانی را داشت و به‌طور معنی‌داری بهتر از گروه شاهد (۷۶/۵۰ درصد) و ۱۰۰ میلی‌مولار (۷۵/۰۰ درصد) بود ( $P < 0.05$ ). در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت از ذخیره منی، همچنان گروه ۵۰ میلی‌مولار عملکرد بهتری نسبت به دیگر گروه‌های آزمایشی در حفظ زنده‌مانی اسپرم‌ها داشت ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳. اثر ترهالوز بر زنده‌مانی اسپرم خروس مسن گوشتی در شرایط دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 3. The effect of trehalose on the sperm viability of aged broiler roosters at 5°C

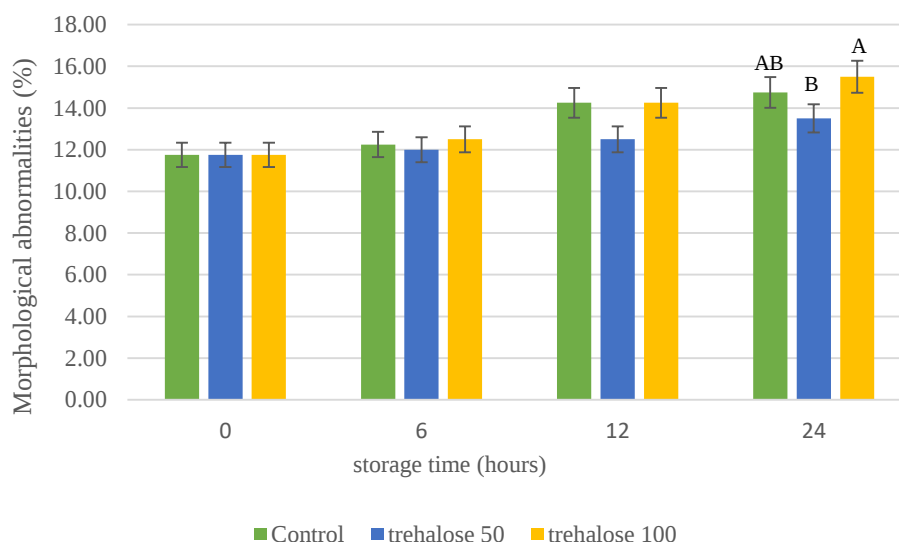
با توجه به شکل ۴ در مورد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم، هرچند که با گذشت زمان نگهداری منی، سلامت غشای پلاسمایی اسپرم در گروه‌های آزمایشی روند کاهشی داشت، اما مقدار این فراسنجه در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز، از شیب کاهشی کمتری در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی برخوردار بود و بهترین عملکرد را در حفظ غشای پلاسمایی اسپرم در بازه زمانی ۶ تا ۲۴ ساعت از ذخیره منی در مقایسه با شاهد و سطح ۱۰۰ ترهالوز نشان داد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۴. اثر ترهالوز بر عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم خروس مسن گوشتی در شرایط دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 4. The effect of trehalose on the sperm plasma membrane integrity of aged broiler roosters at 5°C

نتایج شکل ۵ در مورد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم نشان می‌دهد که تا زمان ۱۲ ساعت از نگهداری منی، مقدار این فراسنجه در بین گروه‌های آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت. اما در زمان ۲۴ ساعت، میزان ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بطور معنی‌داری کمتر از سطح ۱۰۰ میلی‌مولار این دی‌ساکارید بود ( $P < 0.05$ ). کمترین نوسان افزایشی ناهنجاری‌های اسپرم با افزایش زمان نگهداری منی تا ۲۴ ساعت، متعلق به تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بود.



شکل ۵. اثر ترهالوز بر ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم خروس مسن گوشتی در شرایط دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

Figure 5. The effect of trehalose on the sperm morphological defects of aged broiler roosters at 5°C

## بحث

در این پژوهش، کاهش معنی‌داری در تحرک اسپرم با گذشت زمان در گروه شاهد مشاهده شد که معمولاً ناشی از استرس اکسیداتیو و آسیب به غشای اسپرم است که طی ذخیره‌سازی در دماهای پایین رخ می‌دهد. در مقابل، تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز در زمان‌های مختلف نگهداری منی، بیشترین تحرک اسپرم را نشان داد. در حالی که تحرک اسپرم در تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز هیچ تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. این یافته نشان می‌دهد که غلظت بالاتر ترهالوز ممکن است اثرات منفی بر کیفیت اسپرم داشته باشد. در پژوهش‌های مختلف، تاثیر ترهالوز در گونه‌های جانوری متفاوت ارزیابی شده است. در گاو نر، افزودن ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز به رقیق‌کننده تریس، تاثیر مثبتی در بهبود کیفیت منی سردشده نشان داد (El-Sheshtawy *et al.*, 2015). در گاو نر (Uysal *et al.*, 2007) و نریان (El-Badry *et al.*, 2017) نیز افزودن ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز به رقیق‌کننده منی، سبب بهبود کیفیت و تحرک اسپرم پس از فرایند انجماد و یخ‌گشایی منی شد. اما Zhao و همکاران (2020) که به بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ترهالوز در رقیق‌کننده تریس بر حفظ مایع منی قوچ در دمای صفر درجه سانتی‌گراد پرداختند، نشان دادند که مکمل ترهالوز در رقیق‌کننده مایع منی هرچند که به‌طور قابل توجهی یکپارچگی آکروزوم اسپرم را بهبود می‌بخشد، هیچ تاثیری بر تحرک پیش‌رونده اسپرم ندارد.

Thananurak و همکاران (2016) گزارش کردند که در خروس‌های اهلی تایلند، افزودن ۵ میلی‌مولار ترهالوز به رقیق‌کننده، بهترین نتایج را از نظر تحرک پیش‌رونده اسپرم داشت. همچنین، Stanishchevskaya و همکاران (2023) بیان نمودند که ترهالوز در غلظت خاصی سبب بهبود تحرک اسپرم در محیط انجماد خروس شد. در پژوهشی، افزودن ترهالوز در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار به منی اسب، سبب حفظ تحرک اسپرم در برابر شوک سرمایی در مقایسه با گروه شاهد شد (Srinutiyakorn *et al.*, 2017). همچنین، مطالعه Fu و همکاران (2023) در مورد اسپرم غاز نشان داد که ترکیب ۱۰ درصد دی‌متیل‌سولفوکسید و ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز به‌طور قابل توجهی موجب بهبود تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی شد. Petričáková و همکاران (2024) دریافتند

که افزودن ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز مطلوب‌ترین اثر را بر تحرک کلی و پیش‌رونده اسپرم پس از یخ‌گشایی دارد و این گروه درصد بیشتری از اسپرم‌های بدون آسیب غشای پلاسمایی یا آسیب آکروزومی را نشان داد. با این حال، نتایج مطالعه کنونی در مورد غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز با این یافته‌ها هم‌خوانی نداشت که ممکن است ناشی از تفاوت‌های گونه‌ای، شرایط نگهداری (مانند دمای ۵ درجه سانتی‌گراد)، یا نوع رقیق‌کننده باشد.

در مورد زنده‌مانی اسپرم، نتایج نشان داد که با گذشت زمان، زنده‌مانی اسپرم در گروه شاهد کاهش یافت. در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز، کاهش زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد با شیب کمتری مشاهده شد و در زمان‌های ۶ و ۱۲ ساعت، ترهالوز ۵۰ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری عملکرد بهتری در حفظ زنده‌مانی اسپرم نسبت به گروه شاهد داشت. این نتایج مشابه نتایج پژوهش‌های Perumal و همکاران (2022) و Öztürk و همکاران (2017) است که نشان داده‌اند ترهالوز در غلظت ۵۰ میلی‌مولار موجب بهبود زنده‌مانی اسپرم و فعالیت میتوکندری می‌شود. در مقابل، تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز در این مطالعه نتایج مشابهی با گروه شاهد داشت و در زمان‌های مختلف، کمترین زنده‌مانی را نشان داد. این یافته‌ها به‌طور غیرمستقیم به تأثیر منفی افزایش اسمولاریته در این غلظت اشاره دارند که می‌تواند آسیب‌های بیشتری به غشای اسپرم وارد کند و باعث کاهش زنده‌مانی شود. این یافته‌ها با نتایج Vitkova et al. (2021) که اشاره دارند غلظت‌های بالاتر ترهالوز می‌توانند منجر به کاهش حیات اسپرم از طریق اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی آن شامل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase: SOD)، کاتالاز (Catalase: CAT)، گلووتاتیون (Glutathione: GSH) و گلووتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase: GPX) شوند، هم‌خوانی دارد. در مورد عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم، نتایج این تحقیق نشان داد که ترهالوز ۵۰ میلی‌مولار در زمان‌های مورد بررسی از شیب کاهشی کمتری نسبت به دیگر گروه‌ها برخوردار بود. ترهالوز احتمالاً با حفظ فشار اسمزی رقیق‌کننده، نقش حیاتی در جلوگیری از تغییرات مضر در غشای اسپرم ایفا می‌کند و به‌عنوان یک محافظ انجماد غیرکاهنده عمل می‌کند (Bucak and Uysal, 2008). از طریق ایجاد محیط‌های هائپرتونیک و کم‌آبی اسمزی پیش از انجماد، آسیب ناشی از بلورهای یخی را کاهش می‌دهد (Badr et al., 2010). همچنین، وجود ترهالوز موجب حفظ سیالیت غشاء با قرارگیری در دولایه فسفولیپیدها شده و باعث پایداری بیشتر غشا در دمای پایین می‌شود (Aboagla and Terada, 2003). ترهالوز به غشای سلولی اسپرم متصل می‌شود، که آسیب اسپرم ناشی از کم‌آبی و آسیب به غشای آکروزوم و غشای پلاسمایی اسپرم را کاهش می‌دهد، بنابراین ساختار غشای سلولی اسپرم را تثبیت می‌کند (Zhu et al., 2017). تشخیص یکپارچگی آکروزوم می‌تواند به‌طور غیرمستقیم عملکرد اسپرم را منعکس کند که در ارزیابی عملکرد غیرطبیعی اسپرم و اثربخشی لقاح مصنوعی اهمیت زیادی دارد. اثر محافظتی ترهالوز با گذشت زمان آشکارتر می‌شود. این به دلیل اثر محافظتی غیراختصاصی ترهالوز بر روی مولکول‌های زیستی و تجمع ترهالوز در سلول‌های برخی ارگانیسم‌ها در تلاش برای مقابله با تنش‌های محیطی شدید از جمله خشکی و استرس اسمزی بود (Han et al., 2016). توانایی ترهالوز برای محافظت از اسیدهای چرب لیپیدهای غشایی با تشکیل یک کمپلکس ویژه با گروه‌های قطبی درشت مولکول‌ها ثابت شده است (Yatsyshyn et al., 2017) که به‌طور قابل توجهی حالت اکسیداسیون آن‌ها را کاهش داده و از تجزیه آن‌ها جلوگیری می‌کند (Nery et al., 2008). همچنین، ترهالوز با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و جریان کلسترول در غشای اسپرم، به حفظ یکپارچگی آن کمک کرده و از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، پروفایل آنتی‌اکسیدانی و یکپارچگی DNA را بهبود می‌بخشد (Perumal et al., 2022).

در مورد ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم، نتایج نشان داد که در زمان ۲۴ ساعت، میزان ناهنجاری‌ها در تیمار ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز بود. ترهالوز از نشت آنزیم‌های درون‌سلولی جلوگیری کرده و در حفظ مورفولوژی سلولی موثر بوده است. مطالعات گسترده‌ای در گونه‌های مختلف مانند گاو (Hu et al., 2010)، بز (Khalili et al., 2009) و قوچ (Jafaroghli et al., 2011) نیز اثربخشی ترهالوز در بهبود یکپارچگی غشا و مورفولوژی اسپرم را تأیید کرده‌اند. در همین راستا، Starciuc و همکاران (2020) نشان داد که ترهالوز می‌تواند به‌عنوان یک عامل پایدارکننده پروتئینی در طول ذخیره‌سازی بلندمدت در دماهای پایین عمل کند. همچنین، Bucak and Tekin (2007) اثر محافظتی ترهالوز در برابر آسیب به ساختار اسپرم گوسفند را ثبت کردند. در مطالعات جدید، به‌ویژه در اسپرم گاو و اسب، گزارش شده است که غلظت ۵۰ میلی‌مولار ترهالوز بهترین نتایج را ارائه می‌دهد و غلظت‌های بیشتر ممکن است به آکروزوم آسیب بزنند (Jhamb et al., 2021).

(Perumal et al., 2022). ترهالوز با افزایش فعالیت میتوکندری، تولید انرژی و تحرک اسپرم را ارتقاء می‌دهد و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، از یکپارچگی DNA و ساختار مورفولوژیکی اسپرم در طی انجماد محافظت می‌کند (Hu et al., 2010; Perumal et al., 2022). Zhu و همکاران (2017) نشان دادند که افزودن ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز به رقیق‌کننده تریس-سیتریک، باعث بهبود یکپارچگی غشا، سلامت آکروزوم و فعالیت میتوکندری شده و سطح گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) و مالون دی‌آلدهید در اسپرم خرگوش را کاهش داده است.

اسپرم در طول نگهداری در معرض گونه‌های فعال اکسیژن قرار می‌گیرد و اثر آنتی‌اکسیدانی ترهالوز در برابر آسیب آن‌ها اثر حفاظتی دارد. فزون بر این، ترهالوز انرژی اسپرم را در طول ذخیره‌سازی اسپرم تامین می‌کند (Watson, 1979) و امکان ذخیره‌سازی طولانی مدت را فراهم می‌کند. در نهایت، نقش ترهالوز در فعال‌سازی مسیر اتوفاژی، که فرآیندی مهم در سلامت سلولی و کاهش پیری بیضه‌هاست، نیز مطرح شده است (Xi et al., 2025). این مکانیسم به حفظ عملکرد سلول‌های اسپرم کمک می‌کند.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از ترهالوز در غلظت بهینه ۵۰ میلی‌مولار، با حفاظت از ساختار غشای اسپرم و بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم، می‌تواند گزینه‌ای موثر و کاربردی در صنعت اصلاح نژاد و تلقیح مصنوعی طیور باشد. با این حال، استفاده از غلظت‌های بیشتر پیشنهاد نمی‌شود، زیرا می‌تواند اثر منفی بر کیفیت اسپرم داشته باشد.

### تقدیر و تشکر

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل فراهم نمودن امکانات تحقیق قدرانی به عمل می‌آید.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تایید همه آن‌هاست.

### تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

## REFERENCES

- Aboagla, E. M. E., & Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction*, 69(4), 1245-1250. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017889>
- Ahmad, E., & Aksoy, M. (2012). Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: A Mini Review. *Animal Health, Production and Hygiene*, 1(2), 123-129.
- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A., & Garde, J. J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053-1061. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00251-X)
- Ameen, S. A., Opayemi, O. S., Ajayi, J. A., & Adediwura, M. A. (2014). Evaluation of semen quality of five different cockerel breed used in poultry industry in Nigeria. *Journal of Environmental Issues and Agriculture in Developing Countries*, 6(1), 30-36.
- Arifiantini, R. I., & Yusuf, T. L. (2010). Developing of tris soy milk diluent for Frisian Holstein bull frozen semen. *HAYATI Journal of Biosciences*, 17(2), 91-94. <https://doi.org/10.4308/hjb.17.2.91>
- Avital-Cohen, N., Heiblum, R., Argov-Argaman, N., Rosenstrauch, A., Chaiseha, Y., Mobarkey, N. & Rozenboim, I. (2013). Age-related changes in gonadal and serotonergic axes of broiler breeder roosters. *Domestic Animal Endocrinology*, 44(3), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.01.002>.
- Badr, M. R., Abd El-Malak, M. G., & Hassan, H. M. (2010). Effect of trehalose on cryopreservation, oxidative stress and DNA integrity of buffalo spermatozoa. *Journal of Reproduction and Infertility*, 1(2), 50-57.
- Barber, S. J., Parker, H. M., & McDaniel, C. D. (2005). Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals in vitro. *Poultry Science*, 84(1), 100-105. <https://doi.org/10.1093/ps/84.1.100>
- Bathgate, R., Eriksson, B. M., Thomson, P. C., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2008). Field fertility of frozenthawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination. *Animal Reproduction Science*, 103(3-4), 323-35. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.008>
- Bazpour, M., Tabatabaei Vakili, S., Mirzadeh, Kh., & Aghaei, A. (2025). Supplementation of biotin to the semen dilution medium improves sperm quality parameters in turkeys. *Archives of Veterinary Science*, 30(1), 1-8. <https://doi.org/10.5380/avs.v30i1.96899>
- Bittencourt, R. F., Oba, E., de Almeida Biscarde, C. E., Azevedo, H. C., Bittencourt, M. V., de Menezes, G. F. O., da Silva Lima, A., da Mata Fuchs, K., & de Lisboa Ribeiro Filho, A. (2018). Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 85, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266>
- Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.12.001>
- Bucak, M. N., & Uysal, O. (2008). The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. *Indian Veterinary Journal*, 85(2), 148-150.
- Cirit, Ü., Bağış, H., Demir, K., Agca, C., Pabuccuoğlu, S., Varişli, Ö., Clifford-Rathert, C., & Agca, Y. (2013). Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.010>
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of Association Physicians of India*, 52, 794-804.
- Dimitrov, S. G., Atanasov, V. K., Surai, P. F., & Denev, S. A. (2007). Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 100(3-4), 311-317. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.07.007>
- El-Badry, D. A., El-Maaty, A. M. A., & Gamal, A. (2017). The effect of trehalose supplementation of INRA-82 extender on quality and fertility of cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.020>
- El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A., & El-Nattat, W. S. (2015). Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 26-31. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60053-1](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60053-1)

- Fu, J., Ma, J., Feng, Z., Song, Y., Mabrouk, I., Zhou, Y., & Sun, Y. (2023). Effect of DMSO combined with trehalose on cryopreservation of goose semen. *Journal of Applied Animal Research*, 51(1), 84-91. <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2161551>
- Gautier, C., & Aurich, C. (2022). "Fine feathers make fine birds"—The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 246, 106884. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106884>
- Gholami, D., Sharafi, M., Esmaili, V., Nadri, T., Alaei, L., Riazi, G., & Shahverdi, A. (2023). Beneficial effects of trehalose and gentiobiose on human sperm cryopreservation. *PLoS ONE*, 18(4), e0271210. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271210>
- Han, B., Fu, L., Zhang, D., He, X., Chen, Q., Peng, M., & Zhang, J. (2016). Interspecies and intraspecies analysis of trehalose contents and the biosynthesis pathway gene family reveals crucial roles of trehalose in osmotic-stress tolerance in cassava. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1077. <https://doi.org/10.3390/ijms17071077>
- Hassani-Bafrani, H., Haddad-Kashani, H., & Shabehpour, F. (2020). Effects of trehalose and resveratrol on sperm cell parameters after cryopreservation. *Feyz*, 24(3), 270-281. <http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-4022-en.html>
- Herdeiro, R. S., Pereira, M. D., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2006). Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(3), 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.01.010>
- Hu, J. H., Zan, L. S., Zhao, X. L., Li, Q. W., Jiang, Z. L., Li, Y. K., & Li, X. (2010). Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1657-1662. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2335>
- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., & Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96(1), 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.11.010>
- Jerysz, A., & Lukaszewicz, E. (2013). Effect of dietary selenium and vitamin E on ganders' response to semen collection and ejaculate characteristics. *Biological Trace Element Research*, 153, 196-204. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9652-5>
- Jhamb, D., Sharma, S., Talluri, T. R., Nirwan, S. S., Juneja, R., & Kumar, V. (2021). Effect of trehalose supplementation to semen extender on quality of cryopreserved stallion semen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(01), 1342-1350. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1001.160>
- Jia, B., Allai, L., Li, C., Liang, J., Lv, C., Wu, G., & Quan, G. (2024). A review on the functional roles of trehalose during cryopreservation of small ruminant semen. *Frontiers Veterinary Science*, 11, 1467242. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1467242>
- Kazemizadeh, A., Zare Shahneh, A., Zeinoaldini, S., Yousefi, A. R., Mehrabani, Y. H., Ansari, P. Z., & Akhlaghi, A. (2019). Effects of dietary curcumin supplementation on seminal quality indices and fertility rate in broiler breeder roosters. *British Poultry Science*, 60(3), 256-264. <https://doi.org/10.1080/00071668.2019.1571165>
- Kelso, K. A., Cerolini, S., Noble, R. C., Sparks, N. C., & Speake, B. K. (1996). Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Reproduction*, 106(2), 201-206. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060201>
- 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-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(12), 1614-1619. <https://doi.org/10.5713/ajas.2009.90286>
- Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Nakahara, Y., Iwata, K. I., Tanaka, D., & Okuda, T. (2007). Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), 11585-11590. doi: [10.1073/pnas.0702538104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702538104)
- Kowalczyk, A. M., Klećkowska-Nawrot, J., & Łukaszewicz, E. T. (2017). Effect of selenium and vitamin E addition to the extender on liquid stored capercaillie (*Tetrao urogallus*) semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 603-609. <https://doi.org/10.1111/rda.12955>
- Miazi, O. F., Miah, G., Miazi, M. M., Uddin, M. M., Hassan, M. M., & Faridahsan, M. (2012). Fertility

- and hatchability of Fayoumi and Sonali chicks. *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 2(5), 83-86.
- Naing, S. W., Wahid, H., Azam, K. M., Rosnina, Y., Zuki, A. B., Kazhal, S., & San, M. M. (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.06.006>
- Nery, D. D. C. M., da Silva, C. G., Mariani, D., Fernandes, P. N., Pereira, M. D., Panek, A. D., & Eleutherio, E. C. A. (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(12), 1408-1411. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.05.011>
- Ommati, M. M., Zamiri, M. J., Akhlaghi, A., Atashi, H., Jafarzadeh, M. R., Rezvani, M. R., & Saemi, F. (2013). Seminal characteristics, sperm fatty acids, and blood biochemical attributes in breeder roosters orally administered with sage (*Salvia officinalis*) extract. *Animal Production Science*, 53(6), 548-554. doi:10.1071/AN12257
- Öztürk, C., Güngör, Ş., Ataman, M. B., Bucak, M. N., Başpınar, N., Ili, P., & Inanç, M. E. (2017). Effects of arginine and trehalose on post-thawed bovine sperm quality. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(3), 429-439. <https://doi.org/10.1556/004.2017.040>
- Perumal, P., Khate, K., Vupru, K., & Khan, M. H. (2022). Effect of trehalose on post thaw semen quality profiles, sperm kinetic profiles and antioxidant and oxidative stress profiles in mithun. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 92(3), 289-296. <https://doi.org/10.56093/ijans.v92i3.122256>
- Petričáková, K., Janošiková, M., Ptáček, M., Savvulidi, F. G., & Zita, L. (2024). In vitro and in vivo evaluation of the fertilization capacity of frozen/thawed rooster spermatozoa supplemented with different concentrations of trehalose. *Animals*, 14(24), 3586. <https://doi.org/10.3390/ani14243586>
- Quan, G. B., Hong, Q. H., Lan, Z. G., Yang, H. Y., Wu, S. S. (2012). Comparison of the effect of various disaccharides on frozen goat spermatozoa. *Biopreserv Biobank*, 10, 439-445. <https://doi.org/10.1089/bio.2012.0013>
- Sarabia Frago, J., Pizarro Díaz, M., Abad Moreno, J. C., Casanovas Infesta, P., Rodriguez-Bertos, A. & Barger, K. (2013). Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals*, 48(2), 345-352. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x>
- Sharideh, H., Zhandi, M., Zenioaldini, S., Zaghari, M., & Sadegh, M. (2019). The effect of coenzyme Q10 on rooster semen preservation in cooling condition. *Theriogenology*, 129: 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.028>
- Siudzińska, A., & Łukaszewicz, E. (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 101-108. <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00048>
- Srinutiyakorn, D., Poonyachoti, S., Nuchanart, O., Sethawong, P., Arayatham, S., & Tharasanit, T. (2017). The effects of trehalose on osmotic and cold tolerance of equine spermatozoa. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47, 281-282. <https://doi.org/10.58837/CHULA.THE.2017.452>
- Stanishevskaya, O. I., Silyukova, Y., Fedorova, E., Pleshanov, N., Kurochkin, A., Tereshina, V. M., & Ianutsevich, E. (2023). Effects of trehalose supplementation on lipid composition of rooster spermatozoa membranes in a freeze/thaw protocol. *Animals*, 13(6), 1023. <https://doi.org/10.3390/ani13061023>
- Starciuc, T., Malfait, B., Danede, F., Paccou, L., Guinet, Y., Correia, N. T., & Hedoux, A. (2020). Trehalose or sucrose: which of the two should be used for stabilizing proteins in the solid state? A dilemma investigated by in situ micro-Raman and dielectric relaxation spectroscopies during and after freeze-drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(1), 496-504. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.055>
- Thananurak, P., Vongpralup, T., Sittikasamkit, C., & Sakwiatkul, K. (2016). Optimization of trehalose concentration in semen freezing extender in Thai native chicken semen. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 46(2), 287-294. <https://doi.org/10.56808/2985-1130.2737>
- Uysal, O., Bucak, M., Yavas, I., & Varisli, O. (2007). Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(12).
- Vitkova, V., Yordanova, V., Staneva, G., Petkov, O., Stoyanova-Ivanova, A., Antonova, K., & Popkirov, G. (2021). Dielectric properties of phosphatidylcholine membranes and the effect of

- sugars. *Membranes*, 11(11), 847. <https://doi.org/10.3390/membranes11110847>
- Watson P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. In: Finn CA, ed. Oxford reviews of reproductive biology. Oxford: Oxford University Press, 283-350.
- Xi, H., Shan, W., Li, M., Wang, Z., & Li, Y. (2025). Trehalose attenuates testicular aging by activating autophagy and improving mitochondrial quality. *Andrology*, 13(4), 911-920. <https://doi.org/10.1111/andr.13746>
- Yatsyshyn, V. Y., Kvasko, A. Y., & Yemets, A. I. (2017). Genetic approaches in research on the role of trehalose in plants. *Cytology and Genetics*, 51, 371-383. DOI:[10.3103/S0095452717050127](https://doi.org/10.3103/S0095452717050127)
- Zhao, J., Xiao, G., Zhu, W., Fang, D., Li, N., Han, C., & Gao, Q. (2020). Trehalose addition to a Tris-fructose egg yolk extender on quality of ram sperm preserved at 0° C. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49, e20200061. <https://doi.org/10.37496/rbz4920200061>
- Zhu, Z., Fan, X., Pan, Y., Lu, Y., & Zeng, W. (2017). Trehalose improves rabbit sperm quality during cryopreservation. *Cryobiology*, 75, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.02.006>