Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The effect of dietary serine and choline supplements on the expression of fertility-related genes in the testicular tissue of aged Ross roosters

Seiedeh Zahra Badvi
Msc student of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: zahrabadvi7878@gmail.com

Mahmood Nazari
*Corresponding author. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

Ali Aghaei
Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. E-mail: aghaei@asnrukh.ac.ir

Sepideh Rostami
Ph. D graduate of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran E-mail: s.rostami1585@gmail.com

Abstract

Objective

Oxidative and membrane damage reduce the fertility, motility, and quality of the sperm with increasing age. Changes such as lowered phosphatidylcholine and increased phosphatidylserine weaken the membrane structure and the health of the sperm. Supplementation with choline and serine in the diet can increase the resistance of the sperm membrane to oxidative damage and increase the fertility and health of aging roosters. The aim of this study was to investigate the effect of these supplements on the expression of key genes related to fertility (StAR and PVRL3) in the testicular tissue of aged roosters.

Materials and methods

This Study was conducted on 36 aged Ross 308 breeder cockerels for 10 weeks. Birds were randomly assigned to six dietary treatments containing different levels of serine (0, 0.15, and 0.3%) and choline (0 and 470 mg/kg).Four cocks from each group were killed at the end of the trial, and testicular tissue samples were collected and preserved in Freezer –80°C. The relative expression of the StAR and PVRL3 genes was identified using real-time PCR and was compared with the reference gene β-Actin after normalization.

Results

The results showed that adding serine to the rooster diet decreased *PVRL3* gene expression and increased *StAR* gene expression, while choline increased the expression of both genes. The effect of simultaneous addition of serine and choline on *StAR* gene was dependent on the diet level and a significant increase was observed in the combination of 0.3% serine with 470 mg/kg choline. While the simultaneous addition of 0.15 and 0.3% serine with 470 mg/kg choline caused a significant decrease in *PVRL3* gene expression, indicating that choline could not prevent the decrease in *PVRL3* expression by serine, although the diet level-dependent interaction affected the simultaneous regulation of steroidogenesis and spermatogenesis genes.

Conclusions

Dietary supplementation with choline (470 mg/kg) and serine (0.15% and 0.3% levels) may facilitate improved fertility in older roosters. It appears that choline, by strengthening sperm membrane structure and increasing mitochondrial energy, and serine, by synthesizing glutathione, protect sperm from oxidative stress, leading to improved testicular function and improved fertility.

Keywords: Aged Ross breed rooster, choline, Gene expression, *PVRL3*, Serine, *StAR*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Badvi Z, Nazari M, Aghaei H, Rostami S (2026) The effect of dietary serine and choline supplements on the expression of fertility-related genes in the testicular tissue of aged Ross roosters. *Agricultural Biotechnology Journal,* 18(4), 45-64.

Agricultural Biotechnology Journal, 18(4), 45-64. DOI: 10.22103/jab.2026.26330.1800

Received: April 02, 2026. Received in revised form: June 03, 2026.

Accepted: June 04, 2026. Published online: August 30, 2026.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Rapid global population growth, projected to exceed 9 billion by 2050 per UN reports, has heightened demand for affordable, high-quality protein, shifting consumption toward white meat. Commercial broilers, with fast growth, low production costs, favorable feed conversion, and high nutritional value, serve as a key animal protein source. Low-fat, healthy chicken meat meets evolving dietary needs, making broiler industry expansion vital for future food. Roosters play a significant role in broiler breeding schemes despite composing only 10 % of the flock since they provide half of the genetic load as well as fertility. Fertility declines with rooster age mainly due to oxidative stress that injures sperm membrane lipids, reduces membrane fluidity and function, hence negatively fertility. Aged roosters possess phospholipid profile changes, e.g., reduced phosphatidylcholine and increased

phosphatidylserine, impacting sperm quality and viability. Nutritional supplementation with lipid sources and antioxidants may enhance the resistance of the sperm membrane to oxidative stress and enhance fertility performance in aging roosters. Serine is involved in glucose and protein metabolism and biosynthesis of key phospholipids phosphatidylserine and sphingolipids required in cell membranes. Serine proteases are involved in sperm migration and plasminogen activation, which are vital in maintaining sperm growth and development. Its metabolism produces glycine, a glutathione precursor, an antioxidant that protects against oxidative stress damage to sperm. Choline is an essential micronutrient and a precursor for acetylcholine and phosphatidylcholine, critical for the maintenance of membrane structure, signal transduction, and lipid metabolism. Choline increases sperm mitochondrial ATP biosynthesis and epigenetically regulates gene expression, improving quality, motility, and fertility of sperm. Deficiency in choline leads to reduced sperm motility and reproductive disorder. Thus, choline and serine complement each other in enhancing reproductive function, sperm health, and fertility. *PVRL3* and *StAR* genes have significantly contributed to male fertility. *PVRL3* is involved in cell adhesion between Sertoli cells and sperm that is critical for normal sperm maturation and function; loss or dysfunction leads to infertility. *StAR* encodes for a protein that facilitates the transport of cholesterol into steroidogenic cell mitochondria-initial step in the synthesis of sex hormones. Deficiency or failure of *StAR* renders steroid hormone synthesis and fertility compromised. However, the aim of the present study was to investigate the effect of serine and choline supplements on the expression of *PVRL3* and *StAR* genes and improve the fertility of aged broiler roosters to compensate for the decline in reproductive capacity due to age.

Materials and methods

The experiment was conducted on 36 mature Ross 308 broiler breeder roosters, approximately 65 weeks old, for a period of 10 weeks. It utilized a totally randomized 2×3 factorial design with the following six treatments: 1) basal diet devoid of serine or choline (control); 2) basal diet with 470 mg choline per kg feed without serine; 3) basal diet with 0.15 % serine, without choline; 4) basal diet with 0.15 % serine, supplemented with 470 mg of choline; 5) basal diet with 0.3 % serine, and without choline; and 6) basal diet with 0.3 % serine, supplemented with 470 mg of choline. Roosters were housed separately with ad libitum fresh water and feed supply. At the end of the period, testicular tissue samples were carefully isolated after the killing process and immediately stored at -80°C to prevent any molecular degradation or changes in gene expression. Four replicates were considered for each treatment to ensure that the results of the analyses were statistically valid and reliable. The total RNA was extracted from the testis tissues, and the quantity and quality were ascertained using 2% agarose gel electrophoresis and Nanodrop spectrophotometry (Thermo Scientific NanOdrOp. 2000 C. USA). Following RNA integrity establishment, cDNA synthesis was performed. After confirming the specific

amplification of the genes, which was performed by a thermal cycler (Thermalcycler Mini model, made in Germany), the relative expression of the *StAR* and *PVRL3* genes was measured using the Real-time-PCR technique using the Step One Plus Real-Time PCR System (made in the USA) and specific primers. The Ct values generated were normalized to the reference gene (*β-actin*), and fold changes were calculated. Data was analyzed by SAS software (v 9.4) using the GLM procedure. Finally, the means were compared using the LSD test.

Results

The quality and integrity of the RNA obtained were determined by the unambiguous detection of 18 S and 28 S bands on the agarose gel. The purity and concentration of RNA were assessed using a Nanodrop, and absorbance ratios were within bounds, hence determining the RNA to be of high quality and not contaminated. The results confirmed the success of extraction and that samples were of correct quality to be used for downstream analysis. Furthermore, the occurrence of single bands of approximately 160 base pairs for the *StAR* gene, 150 base pairs for the *PVRL3* gene, and 145 base pairs for the *β-actin* gene on gel electrophoresis validated the experiment and proper amplification of the target fragments by PCR. Melting curve analyses of Real-Time PCR showed single peaks at specific temperatures for the *PVRL3*, *StAR*, and *β-actin* genes that represent high specificity and lack of contamination or nonspecific products and thereby confirming reaction quality and gene expression. The research results showed that supplementing the rooster feed with serine significantly diminished *PVRL3* gene expression but significantly increased *StAR* gene expression ($P<0.05$). The supplementation of choline also resulted in a significant up-regulation of both the genes ($P<0.05$). Their combined supplementation resulted in a significant up-regulation of the gene ($P<0.05$). Interestingly, concomitant administration of 0.15 % and 0.3 % serine and 470 mg/kg choline resulted in a significant suppression of *PVRL3* gene expression ($P<0.05$), suggesting that choline was unable to counteract the suppression of the *PVRL3* gene by serine. Supplementing the amino acids serine and choline to the diet of older roosters can affect fertility through several biological mechanisms. These two substances differ in structure and function, but both play key roles in metabolism, cellular structure, and reproductive system function.

Conclusions

Dietary supplementation with choline (level 470 mg/kg) and serine (levels 0.15 and 0.3%) can facilitate improved fertility in older roosters. These compounds support testicular function, maintain reproductive cell health, and improve sperm membrane stability, leading to better sperm motility and output. Their inclusion in the feeding of aging roosters may enhance fertility potential, improve reproductive performance, and ultimately lead to higher sperm quality and reproductive success.

Author contributions

Conceptualization, M.N. and A.A.; methodology, S.R.; formal analysis, Z.B.; writing-original draft preparation, M.N. and S.R.; writing-review and editing, M.N.; project administration, M.N.; funding acquisition, M.N. All authors have read and agreed to the published

version of the manuscript. All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

We acknowledge the Research deputy of Agricultural Sciences and the Natural Resources University of Khuzestan for all their support.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the Agricultural Sciences and the Natural Resources University of Khuzestan, Iran. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تأثیر مکمل‌های سرین و کولین جیره بر بیان ژن‌های مرتبط با باروری در بافت بیضه خروس‌های مسن نژاد راس

سیده زهرا بدوی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: zahrabadvi7878@gmail.com

محمود نظری

*نویسنده مسئول. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

علی آقائی

استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: aghaei@asnrukh.ac.ir

سپیده رستمی

دانش آموخته دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران. رایانامه: s.rostami1585@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۱۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۵/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۴

چکیده

هدف: با افزایش سن، استرس اکسیداتیو و آسیب به غشای اسپرم باعث کاهش کیفیت، تحرک و باروری خروس‌ها می‌شود. تغییراتی مانند کاهش فسفاتیدیل کولین و افزایش فسفاتیدیل سرین ساختار غشا و کیفیت اسپرم را تحت تأثیر منفی قرار می‌دهد. افزودن مکمل‌های سرین و کولین به رژیم غذایی، با تقویت مقاومت غشای اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو، می‌تواند سلامت و باروری خروس‌های مسن را بهبود دهد. با این حال، هدف این پژوهش بررسی اثر این مکمل‌ها بر بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با باروری (*StAR* و *PVRL3*) در بافت بیضه خروس‌های مسن بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه روی ۳۶ خروس مادر گوشتی نژاد راس ۳۰۸ مسن به‌مدت ۱۰ هفته انجام شد. پرندگان به‌طور تصادفی در شش تیمار تغذیه‌ای شامل سطوح مختلف سرین (۰، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد) و کولین (۰ و ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار گرفتند. در انتهای آزمایش، ۴ خروس از هر تیمار کشتار و قسمتی از بافت بیضه جدا شده و نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. بیان نسبی ژن‌های *StAR* و *PVRL3* با روش Real-time PCR اندازه‌گیری و با نرمال‌سازی نسبت به ژن *β-actin* تحلیل شدند.

نتایج: نتایج نشان داد افزودن سرین به جیره خروس‌ها سبب کاهش بیان ژن *PVRL3* و افزایش بیان ژن *StAR* شد، در حالی‌که کولین بیان هر دو ژن را افزایش داد. اثر افزودن همزمان سرین و کولین بر ژن *StAR* وابسته به سطح جیره بود و در ترکیب ۰/۳ درصد سرین با ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین افزایش معنی‌دار مشاهده شد. در حالی که افزودن همزمان ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سرین (به‌طور جداگانه) به همراه ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن *PVRL3* شد، که نشان می‌دهد کولین نتوانسته از کاهش بیان *PVRL3* توسط سرین جلوگیری کند، هرچند تعامل وابسته به سطح جیره تنظیم همزمان ژن‌های استروئیدوژنز و اسپرماتوژنز را تحت تأثیر قرار داد.

نتیجه‌گیری: نتایج ارزیابی معیارهای مختلف تنوع ژنتیکی همگی گویای این است که جمعیت از تنوع بالایی برخوردار است، اما عواملی در حال کاهش تنوع در بین جمعیت مورد مطالعه هستند. به طوری که جمعیت از تعادل خارج شده است و تعداد هتروزیگوت‌های مشاهده شده کمتر از هتروزیگوت‌های مورد انتظار شده است. لازم است عواملی که منجر به کاهش تنوع شده است مورد بررسی قرار گیرد تا از کاهش بیشتر آن جلوگیری گردد. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که SSRهای جدید می‌توانند برای شناخت ساختار جمعیت و بررسی تنوع ژنتیکی عقرب اندراکتونوس کراسیکودا مفید باشند.

کلیدواژه‌ها : بیان ژن، خروس نژاد راس مسن، سرین، کولین، *StAR*، *PVRL3*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بدوی سیده زهرا، نظری محمود، آقائی علی، رستمی سپیده (۱۴۰۵) تأثیر مکمل‌های سرین و کولین جیره بر بیان ژن‌های مرتبط با باروری در بافت بیضه خروس‌های مسن نژاد راس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۸(۴)، ۴۵-۶۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

با توجه به رشد سریع جمعیت جهان که بر اساس گزارش سازمان ملل پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۹ میلیارد نفر برسد، تأمین پروتئین کافی و باکیفیت به یکی از مهم‌ترین چالش‌های امنیت غذایی تبدیل شده است. این افزایش جمعیت، تقاضا برای منابع پروتئینی ارزان، سالم و قابل دسترس را به‌شدت بالا برده و الگوی مصرف جهانی را به سمت گوشت سفید هدایت کرده است. در این میان، مرغ گوشتی تجاری به‌دلیل رشد سریع، هزینه تولید کمتر، ضریب تبدیل خوراک مطلوب و ارزش تغذیه‌ای بالا، جایگاهی ویژه در تأمین پروتئین حیوانی یافته است. علاوه‌براین، گوشت مرغ به‌عنوان منبعی کم‌چرب و سالم، پاسخ‌گوی نیاز رو به افزایش جمعیت و تغییر سبک تغذیه‌ای جوامع است. بنابراین، توسعه صنعت پرورش مرغ گوشتی نقشی اساسی در تضمین امنیت غذایی آینده ایفا می‌کند (Chiari, 2017). در این سیستم تولید، خروس‌ها نیز نقش اساسی دارند؛ زیرا با وجود اینکه تنها ۱۰ درصد از گله را نسبت به مرغ‌ها تشکیل می‌دهند، ۵۰ درصد از بار ژنتیکی فرزندان و باروری گله را بر عهده دارند (Sabah & Dikmen., 2023). اوج باروری خروس‌ها در حدود ۳۷ هفتگی است و با افزایش سن (با توجه به نژاد ژنتیکی) از حدود ۴۰ هفتگی به بعد کاهش می‌یابد. باروری پایین منجر به کاهش تولید تخم برای جوجه‌کشی و ضررهای اقتصادی هنگفت می‌شود (Lagares et al., 2017). با افزایش سن، لیپیدهای غشای اسپرم شامل پیوندهای دوگانه که بصورت غیر مزدوج هستند، توسط گروه‌های متیل از هم جدا شده و به همین دلیل مستعد آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشند. افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) موجب پراکسیداسیون لیپیدها

(LPO) می‌شود که ساختار، نفوذپذیری و سیالیت غشا را تغییر داده و ظرفیت ذوب اسپرم را کاهش می‌دهد که بر باروری اثر منفی می‌گذارد (Gallo et al., 2021; Partyka et al., 2023). یکی از روش‌های کاهش اثرات استرس اکسیداتیو، تغییر رژیم غذایی با افزودن منابع لیپیدی و آنتی‌اکسیدان‌ها است (Asl et al., 2018) که می‌توانند سیالیت و انعطاف‌پذیری غشای اسپرم را افزایش داده و مقاومت آن را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو بهبود بخشند. این منابع همچنین در مسیرهای آنتی‌اکسیدانی و استروئیدزایی نقش دارند (Nakamura et al., 2004). سرین به‌عنوان یک اسید آمینه پرکاربرد، علاوه بر نقش خود در سنتز گلوکز و پروتئین، یکی از اجزای اصلی فسفولیپیدهایی مانند فسفاتیدیل‌سرین (PS) و اسفنگولیپیدهایی نظیر سرامیدها و گلیکواسفنگولیپیدهاست که به‌صورت متمرکز در غشاهای سلولی وجود دارند (Holeček., 2022). افزون بر نقش ساختاری، سرین در مسیرهای سیگنال‌دهی و متابولیکی نیز اثرگذار است؛ به‌گونه‌ای که متابولیسم آن منجر به تولید گلیسین می‌شود، آمینواسیدی که در سنتز گلوتاتیون نقش دارد. گلوتاتیون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زاد، از اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کرده و به حفظ بقا و افزایش تحرک آن کمک می‌کند (Zhou et al., 2018). در همین راستا، مطالعات نشان داده‌اند که پروتئازهای سرین در فرآیند باروری نقش کلیدی ایفا می‌کنند؛ این آنزیم‌ها با مشارکت در مهاجرت اسپرم، تعامل اسپرم با تخمک و نیز فعالیت سیستم فعال‌سازی پلاسمینوژن، برای حفظ ساختار و کارکرد صحیح بیضه و بلوغ مناسب اسپرم ضروری‌اند و به‌طور مستقیم با باروری مرتبط هستند (Sharma & Bansal., 2023). کولین نیز یک ریزمغذی ضروری است که نقش‌های متعددی در سلامت و عملکرد سلول‌های بدن ایفا می‌کند. این ماده نه‌تنها به‌عنوان پیش‌ساز انتقال‌دهنده عصبی استیل‌کولین برای عملکرد سیستم عصبی، حافظه، یادگیری و حرکت عضلات ضروری است، بلکه در ساختار و پایداری غشای سلولی نیز نقش کلیدی دارد (Billah et al., 2022). کولین در سنتز فسفولیپیدهای حیاتی مانند فسفاتیدیل‌کولین مشارکت کرده و غشاهای سلولی را تقویت می‌کند. اگرچه بخشی از کولین به‌صورت درون‌زاد توسط آنزیم فسفاتیدیل اتانولامین N – متیل ترانسفراز (PEMT) تولید می‌شود، این مسیر به تنهایی کافی نیست و نیاز به دریافت کولین از طریق رژیم غذایی وجود دارد (Kenny et al., 2025). از نظر متابولیکی، کولین با اکسیداسیون به بتائین تبدیل شده و در مسیرهای متعددی شرکت می‌کند که تولید سوبستراهای زنجیره انتقال الکترون و در نهایت سنتز ATP در میتوکندری اسپرم را افزایش می‌دهد، بنابراین، کمبود کولین می‌تواند به‌صورت کاهش تولید انرژی، اختلال در متابولیسم چربی، کاهش تحرک اسپرم و اختلالات باروری بروز کند (Li et al., 2023). ژن‌های مؤثر در باروری مانند *PVRL3* و *StAR* به‌عنوان شاخص‌های کلیدی فرآیندهای تولیدمثل انتخاب شده‌اند. ژن PVRL3 (Poliovirus Receptor-Related 3) یا Nectin-3، پروتئینی است که در اتصال اسپرم به سلول‌های سرتولی نقش دارد و برای رشد طبیعی اسپرم و حفظ باروری ضروری است (Bronson et al., 2017). در حالی‌که ژن *StAR* (Steroidogenic Acute Regulatory) ورود کلسترول به میتوکندری سلول‌های تولیدکننده استروئید را تسهیل می‌کند و گام اولیه در سنتز هورمون‌های جنسی است (Clark, 2001 & Stocco). مطالعات انجام‌شده در طیور نشان داده‌اند که عوامل تغذیه‌ای و وضعیت اکسیداتیو بیضه می‌توانند بیان ژن *StAR* را تحت تأثیر قرار دهند، به‌گونه‌ای که استفاده از اسیدهای چرب غیر اشباع، کوآنزیمQ10 (Feng et al, 2015; Salari et al, 2021) و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی (Xiang et al., 2023) موجب افزایش بیان این ژن و بهبود شاخص‌های تولیدمثلی خروس‌ها شده است، در حالی‌که اطلاعات مربوط به تنظیم تغذیه‌ای بیان ژن *PVRL3* در بیضه خروس‌ها همچنان محدود است. با توجه به نقش این ژن‌ها در مسیرهای کلیدی باروری، فرض می‌شود که مکمل‌های سرین و کولین می‌توانند به‌صورت غیرمستقیم از طریق بهبود سلامت غشا، مسیرهای سیگنال‌دهی و متابولیسم انرژی، بیان این ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین، هدف این پژوهش بررسی

اثر مکمل‌های سرین و کولین بر بیان ژن‌های *StAR* و *PVRL3* در بافت بیضه خروس‌های مسن نژاد راس و ارزیابی نقش احتمالی این ترکیبات در بهبود فرآیندهای مولکولی مرتبط با باروری است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۳۶ قطعه خروس مسن مادرگوشتی نژاد راس ۳۰۸ با سن تقریبی ۶۵ هفته و میانگین وزن حدود ۲۰۰ ± ۵۱۰۰ گرم انجام شد. طرح آزمایش به‌صورت کاملاً تصادفی در قالب طرح فاکتوریل ۲×۳ طراحی شد، که دو عامل مورد بررسی شامل میزان افزودن اسیدآمینه سرین (۰، ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد) و تأمین کولین (۰ و ۴۷۰ میلی‌گرم کولین در هر کیلوگرم خوراک) بودند؛ به‌طوری‌که سرین و کولین مطابق تیمارها به‌صورت سرک به جیره پایه افزوده شدند. بر این اساس، ۶ تیمار حاصل شد: ۱) جیره بدون سرین و بدون کولین، ۲) جیره بدون سرین همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم کولین در هر کیلوگرم خوراک، ۳) جیره حاوی ۰/۱۵ درصد سرین بدون کولین، ۴) جیره حاوی ۰/۱۵ درصد سرین همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم کولین، ۵) جیره حاوی ۰/۳ درصد سرین بدون کولین و ۶) جیره حاوی ۰/۳ درصد سرین همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم کولین بودند. خروس‌ها در طول آزمایش بصورت انفرادی در قفس نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب تازه و خوراک مطابق با دستورالعمل مدیریت نژاد راس ۳۰۸ (Ross, 2016) داشتند (جدول ۱). شرایط سالن پرورش نیز مطابق با استانداردهای رفاهی طیور تنظیم شد؛ به‌طوری‌که دما در محدوده ۱۹–۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی بین ۷۰–۵۰ درصد نگه‌داری گردید. برنامه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی اعمال شد و تهویه یکنواخت سالن از طریق فن‌های مکنده و دریچه‌های ورودی هوا تأمین گردید. در پایان دوره آزمایش، نمونه‌های بافت بیضه بلافاصله پس از کشتار و در کمتر از چند دقیقه برداشت شدند. عملیات تشریح و جداسازی بافت‌ها تحت شرایط RNase-free و با استفاده از وسایل استریل انجام گرفت تا از تخریب RNA جلوگیری شود. نمونه‌ها فوراً پس از جداسازی در ازت مایع قرار داده شدند و سپس بدون وقفه به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا ثبات مولکولی و بیان ژنی حفظ شود. برای هر تیمار مورد آزمایش نیز ۴ تکرار در نظر گرفته شد تا نتایج حاصل از تحلیل‌ها از لحاظ آماری معتبر و قابل اطمینان باشند. RNA کل از بافت بیضه‌ها با استفاده از کیت ستونی Animal Tissue RNA Isolation شرکت دنازیست (ایران) استخراج شد و کمیت و کیفیت آنها با استفاده از الکتروفورز روی ژل اگارز ۲ درصد و دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific NanoDrop, 2000C, USA) تعیین گردید. RNA استخراج‌شده از نظر خلوص با نسبت‌های A260/A280 و A260/A230 بررسی شد نمونه‌هایی با نسبت‌های بین ۱/۸ تا ۲/۲ برای مراحل بعدی استفاده شدند. متعاقباً، سنتز cDNA با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (شرکت سیناکلون، ایران) انجام شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر و مطابق دستورالعمل شرکت انجام گرفت. برنامه حرارتی شامل مرحله جداسازی RNA در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، سنتز cDNA در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ دقیقه و غیرفعال‌سازی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه بود. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا متعاقباً سطح بیان نسبی mRNA مربوط به *StAR*، *PVRL3* در بافت بیضه با استفاده از Real time-PCR تعیین شود. در جدول ۲ لیست و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *StAR*، *PVRL3* و *β*-actin (بعنوان مرجع) ارائه شده است. پرایمرهای مربوط به این ژن‌ها مطابق با مطالعات پیشین طراحی شده‌اند که برای ژن *PVRL3* به

Adeldust et al. (2022) و برای ژن‌های *StAR* و *β-actin* به Amin Altawash et al (2019) ارجاع داده شده است. تمامی پرایمرهای ذکر شده از شرکت سیناکلون (ایران) تهیه و سنتز شده‌اند.

جدول ۱. اجزاء و ترکیبات شیمیایی جیره استاندارد خروس

Table 1. Composition and nutrients of experimental diets for roosters

ماده خوراکی		درصد
ذرت	Maize	56.00
کنجاله سویا	Soybean meal	9
سبوس گندم	Wheat bran	19.25
جو	Barley	10.00
روغن	oil	2.25
جوش شیرین	Sodium bicarbonate	0.2
متیونین	Methionine	0.18
صدف	Oyster shell	1.05
دی کلسیم فسفات	Dicalcium phosphate	1.3
نمک	Salt	0.27
مکمل ویتامینه[۱]	Vitamin[1]	0.25
مکمل مواد معدنی[۲]	Mineral[2]	0.25
ترکیب شیمیایی	**Composition**	
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم) Metabolizable Energy (Kcal/kg)		2800
پروتئین خام (٪)	Crude protein	12.62
لیزین (٪)	Lysine	0.55
متیونین	Methionine	0.39
متیونین + سیستئین (٪)	Methionine + Cysteine	0.64
ترئونین (٪)	Threonine	0.45
کلسیم (٪)	Calcium	0.75
فسفر قابل دسترس (٪)	Available phosphorus	0.37
سدیم	Sodium	0.19
کلر	chlorine	0.19

[۱] مکمل ویتامینه (به ازای هر کیلوگرم جیره) حاوی ۹۰۰۰ IU ویتامین A، ۲۰۰۰ IU ویتامین D3، ۱۸ IU ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین K، ۱/۸ میلی‌گرم ویتامین B1، ۵/۵ میلی‌گرم ویتامین B2، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B3، ۳۰ میلی‌گرم ویتامین B5، ۳ میلی‌گرم ویتامین B6، ۱ میلی‌گرم ویتامین B9، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم ویتامین B12 و ۰/۲ میلی‌گرم ویتامین H2 بود.

[۲] مکمل مواد معدنی (به ازای هر کیلوگرم جیره) حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم منگنز، ۴۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ روی، ۱۶ میلی‌گرم مس، ۲ میلی‌گرم ید ۰/۳ میلی‌گرم سلنیم بود.

[1] The vitamin supplement (per kilogram of diet) contained 9000 IU of vitamin A, 2000 IU of vitamin D3, 18 IU of vitamin E, 2 mg of vitamin K, 1.8 mg of vitamin B1, 5.5 mg of vitamin B2, 10 mg of vitamin B3, 30 mg of vitamin B5, 3 mg of vitamin B6, 1 mg of vitamin B9, 0.015 mg of vitamin B12, and 0.2 mg of vitamin H2.

[2] The mineral supplement (per kilogram of diet) contained 120 mg manganese, 40 mg iron, 120 mg zinc, 16 mg copper, 2 mg iodine, and 0.3 mg selenium.

برای هر سه ژن دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت تجربی تعیین شد تا بیشترین کارایی تکثیر و اختصاصیت پرایمرها حاصل شود. پس از تایید تکثیر اختصاصی ژن‌ها که توسط دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermalcycler Mini ساخت آلمان)

انجام شد در ادامه کار واکنش Real time PCR با استفاده از دستگاه (StepOne Plus Real-Time PCR System. ساخت کشور آمریکا) اجرا شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix SYBR Green، ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر cDNA الگو و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. در ادامه جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌ها، نمونه‌ها در دستگاه طبق برنامه حرارتی جدول ۳ قرار گرفتند. پس از پایان واکنش Real time PCR، CTهای حاصل از واکنش Real time PCR نسبت به ژن مرجع نرمال‌سازی شدند هر واکنش برای هر نمونه در دو تکرار تکنیکی انجام گرفت تا دقت اندازه‌گیری حفظ شود. میزان تغییر بیان ژن‌ها برای هرکدام از ژن‌ها با استفاده از روش (Pfaffl et al., 2002) با لحاظ بازده واقعی هر پرایمر محاسبه شد. بازده پرایمرها از منحنی استاندارد برای هر ژن تعیین گردید.

جدول ۲. لیست توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای تکنیک Real time PCR

Table 2. List of sequences and properties of primers used in this study for the Real-time PCR technique

کد دسترسی Accession number	دمای اتصال (°C) Annealing temperature	طول قطعه Piece length (bp)	توالی Sequence	نام ژن Gene name
X00182	60	145	F: 5'- ACGTCGCACTGGATTTCGAG-3' R: 5'- AAAGATGGCTGGAAGAGGGC-3'	**β-actin**
XM_015298356.3	60	160	F: 5'- TTCAGCGAGATGGAGATGTCC-3' R: 5'- GGAACACCTTACCCACGTCC-3'	**StAR**
XM_416630.5	60	150	F: 5'- CATGTGGACCAGGCTGGATG-3' R: 5'- GTCTTCTGATCACTCCTCTGACC-3'	**PVRL3**

جدول ۳. چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش Real- time PCR

Table 3. Temperature cycle used in Real-time PCR reaction

زمان Time	دما (°C) Temperature (°C)		تعداد چرخه‌ها Number of cycles	مراحل Steps
15 min	95	واسرشت سازی اولیه	1	مرحله اول
		Primary Denaturation		Step 1
15-30 S	95	واسرشت سازی Denaturation	40	مرحله دوم
30 S	60	اتصال پرایمر Annealing		Step 2
30 S	72	بسط Extension		
10 S	55-59	(رسم منحنی تفکیک)		مرحله سوم
		Plotting the melting curve		Step 3

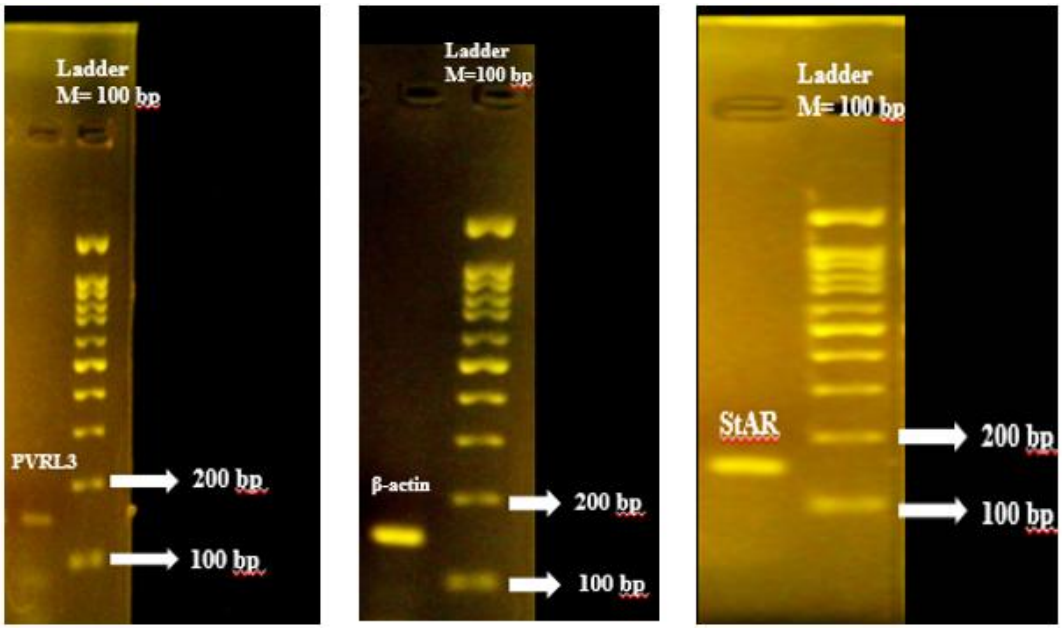
داده‌ها با نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۴) و رویه GLM تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD با سطح احتمال معنی‌داری ۵ درصد ($\alpha = 0.05$) اجرا گردید. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت زیر بود.

$$y_{ijk} = \mu + C_i + T_j + (CT)_{ij} + e_{ijk}$$

در این رابطه: y_{ijk} مربوط به مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، C_i اثر سطوح کولین، T_j اثر سطوح سرین، $(CT)_{ij}$ اثر متقابل سرین و کولین و e_{ijk} اثر خطای آزمایش است.

نتایج

در نتایج حاصل از استخراج RNA روی ژل آگارز کیفیت و یکپارچگی RNA استخراج‌شده مورد تایید قرار گرفت. باندهای واضح و قوی مربوط به RNA ریبوزومی 18S و 28S مشاهده شدند که نشان‌دهنده کیفیت مطلوب RNAهای استخراج‌شده است. علاوه بر این، غلظت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتر بطور دقیق اندازه‌گیری شد. نسبت‌های جذب A260/A280 و A260/A230 در محدوده ۲/۱ – ۱/۸ نشان‌دهنده کیفیت بالای RNAها و عدم آلودگی نمونه‌ها بود. این نتایج تاییدکننده موفقیت فرایند استخراج و مناسب بودن نمونه‌ها برای آزمایش‌های بعدی بود. در شکل ۱، نتایج تکثیر اختصاصی سه ژن *StAR*، *PVRL3* و *β-actin* نشان داده شده است. همانطور که می‌بینیم تکثیر موفق این ژن‌ها با باندهایی در اندازه‌های مورد *انتظار* (160 bp) *StAR*، (150 bp) *PVRL3* و (145 bp) *β-actin* تأیید شد.

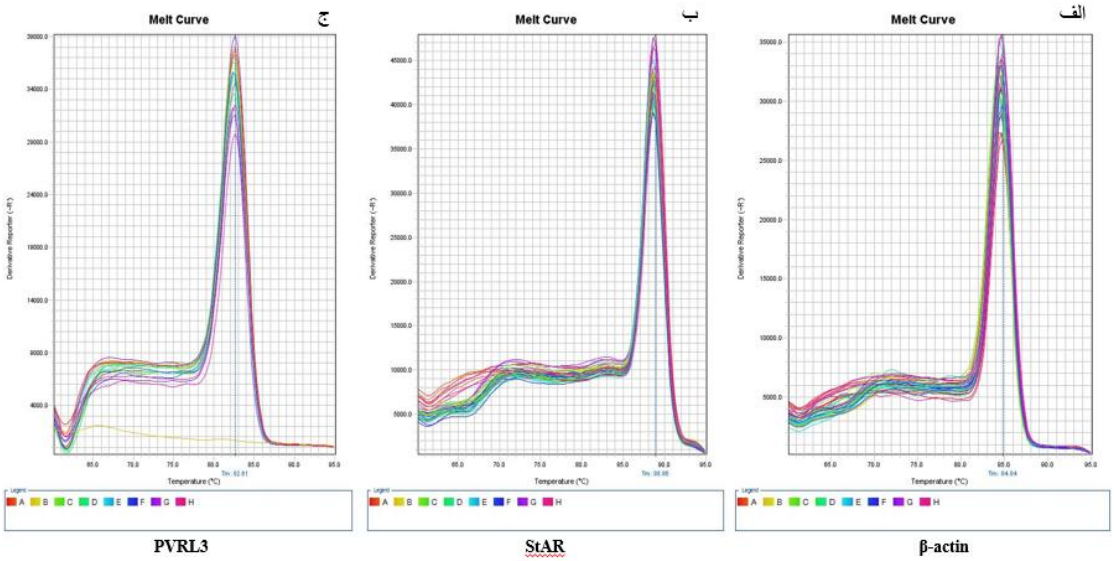


شکل ۱. نتایج تکثیر اختصاصی ژن‌های StAR ، PVRL3 و β-actin بر روی ژل آگارز ۲ درصد

Figure 1. Results of specific amplification of StAR, PVRL3 and β-actin genes on 2% agarose gel

منحنی‌های ذوب واکنش Real-Time PCR نشان‌دهنده اختصاصیت بالای محصول تکثیر شده است (شکل ۲). وجود قله‌های تکی در دمای ذوب مشخص، تایید کننده نبود آلودگی، دایمر پرایمر و محصولات غیر اختصاصی می‌باشد. این نتایج نشان‌دهنده صحت و کیفیت بالای واکنش و اعتبار داده‌های بیان ژن است. علاوه بر این، بازده واکنش‌ها برای ژن‌های *β-actin*، *StAR* و *PVRL3* به ترتیب ۹۵، ۹۷ و ۹۴ درصد بوده و ضریب همبستگی (R^2) برای هر سه ژن بالاتر از ۰/۹۵ محاسبه شد، که

صحت و کیفیت بالای واکنش و اعتبار داده‌های بیان ژن را تضمین می‌کند. نمودارهای ذوب برای ژن‌های *β-actin*، *StAR* و *PVRL3* به‌ترتیب در بخش‌های الف، ب و ج شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. نمودارهای ذوب برای ژن‌های β-actin، StAR و PVRL3

Figure 2. Melting plots for β-actin, StAR, and PVRL3 genes

جدول ۴ نشان‌دهنده تأثیر غلظت‌های مختلف اسید آمینه سرین بر بیان ژن‌های *PVRL3* و *StAR* است. افزودن سرین در جیره خروس‌ها تأثیر معنی‌داری بر بیان هر دو ژن داشت ($P<0.05$)، به گونه‌ای که افزودن دو سطح ۰/۱۵ و ۰/۳ سرین به جیره منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن *PVRL3* شده است. در حالی‌که برای ژن *StAR* افزودن دو سطح ۰/۱۵ و ۰/۳سرین منجر به افزایش معنی‌دار بیان این ژن شده است ($P<0.05$). علاوه‌بر این، افزودن کولین در جیره خروس‌ها تأثیر معنی‌داری بر بیان هر دو ژن داشت ($P<0.05$). با افزودن ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین افزایش معنی‌دار در بیان هردو ژن *StAR* و *PVRL3* مشاهده شد ($P<0.05$).استفاده همزمان ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین به همراه ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن *StAR* شده است ($P<0.05$) که نشان‌دهنده اثر مثبت حضور کولین در جیره حاوی سرین بوده است. همچنین، اثرات متقابل افزودن سرین و کولین بر بیان ژن *PVRL3* معنی‌دار شده است ($P<0.05$). افزودن کولین به جیره سبب افزایش بیان ژن *PVRL3* می‌شود در حالی‌که افزودن سرین به جیره منجر به کاهش ژن *PVRL3* می‌شود. افزودن ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین به‌طور جداگانه، هر کدام همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین، سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن *PVRL3* شد ($P<0.05$) که نشان می‌دهد، حضور کولین نتوانسته است از کاهش بیان ژن *PVRL3* توسط سرین جلوگیری کند. نتایج نشان داد که مصرف سرین با الگوی متفاوتی در دو ژن همراه است؛ به‌طوری‌که بیان *StAR* را افزایش می‌دهد، اما سطح بیان *PVRL3* را کاهش می‌دهد. در مقابل، افزودن کولین به جیره موجب ارتقای معنی‌دار بیان هر دو ژن شد. ژن *StAR* نقشی کلیدی در باروری ایفا می‌کند، زیرا مسئول انتقال کلسترول به درون میتوکندری برای استروئیدزایی است که هورمون‌های جنسی مانند تستوسترون و استروژن را تولید می‌کند (Christenson & Strauss, 2000). ژن *PVRL3* نیز نقش مهمی در اسپرم‌ریزی (آزادسازی اسپرم از

سلول‌های زاینده) ایفا می‌کند. به‌طور خاص، تغییر بیان این ژن در فرایند آزادسازی اسپرم و در نتیجه باروری نرها موثر است (Adeldust et al., 2021).

جدول ٤. تاثیر اسید آمینه سرین و کولین بر بیان ژن‌های StAR و PVRL3

Table 4. Effect of amino acids serine and choline on the expression of StAR and PVRL3 genes

PVRL3	StAR	Main effect اثرات اصلی		Treatment تیمار
1.43 a	1.21 ab	0		جیره پایه+ اسید آمینه سرین
0.64 b	1.34 ab	0.15		Basal diet + amino acid serine
0.53 b	1.49 a	0.3		
0.1	0.06			SEM
0.69 b	1.15 b	0		جیره پایه+ ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین
1.04 a	1.55 a	470		Basal diet + 470 mg/kg choline
0.08	0.05			SEM
				اثر ترکیبی Interactions
1 b	1 C	0	0	جیره پایه (کنترل) Basal diet (control)
1.86 a	1.42 b	470	0	جیره پایه+ ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین Basal diet + 470 mg/kg choline
0.51 C	1.27 b	0	0.15	جیره پایه+ ۰/۱۵ درصد اسید آمینه سرین Basal diet + 0.15% amino acid serine
0.77 bc	1.42 b	470	0.15	جیره پایه+ ۰/۱۵ درصد اسید آمینه سرین +۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین Basal diet + 0.15% amino acid serine + 470 mg/kg choline
0.57 C	1.18 bC	0	0.3	جیره پایه+ ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین Basal diet + 0.3% amino acid serine
0.49 C	1.8 a	470	0.3	جیره پایه+ ۰/۳ درصد اسید آمینه سرین + ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کولین Basal diet + 0.3% amino acid serine + 470 mg/kg choline

*حروف مختلف (a, b, c) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار میان میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($\alpha = 0.05$) هستند.

*Different letters (a, b, c) indicate significant differences among means at a significance level of 5% ($\alpha = 0.05$).

پارامترهای کمی و کیفی اسپرم که پیش‌تر در پژوهشی دیگر مورد بررسی قرار گرفته بود، نتایج این مطالعه را تایید می‌کند. نتایج نشان داد که غلظت اسپرم، جنبش پیش‌رونده، تحرک کل، سلامت غشا و زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای حاوی سرین و کولین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. به‌طور خاص، غلظت اسپرم، جنبش پیش‌رونده و سلامت غشای اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۳ درصد مکمل سرین به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. همچنین درصد تحرک کل و زنده‌مانی اسپرم با تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سرین همراه با ۴۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مکمل کولین نسبت به گروه فاقد سرین و کولین به‌طور معنی‌داری

افزایش یافت. درصد اسپرم‌های با ریخت‌شناسی ناهنجار در تیمارهای حاوی ۰/۱۵ و ۰/۳ درصد سرین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. بیشترین غلظت اسپرم نیز در تیماری مشاهده شد که حاوی ۰/۳ درصد سرین و ۴۷۰ میلی‌گرم کولین بود، که نشان‌دهنده اثر مثبت این ترکیبات بر اسپرماتوژنز و افزایش تولید اسپرم است. نتایج تحقیق قبلی نیز نشان داد که استفاده از سطوح مورد مطالعه اسیدآمینه L- سرین و مکمل کولین در جیره غذایی موجب بهبود کیفیت اسپرم و افزایش باروری در خروس‌های مسن گله‌های مادر گوشتی می‌شود (Alizadeh et al, 2025). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های مطالعات پیشین در طیور همخوانی دارد. (Feng et al, 2015) نشان دادند که بهبود وضعیت تغذیه‌ای از طریق تنظیم نسبت اسیدهای چرب امگا ۳ به امگا ۶ در جیره خروس‌های مولد، با افزایش بیان mRNA ژن *StAR*، افزایش ترشح هورمون‌های تولیدمثلی و تقویت فرآیند اسپرماتوژنز همراه است. همچنین، محققان گزارش کردند که استفاده از ترکیبات تغذیه‌ای دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، از جمله کوآنزیم Q10 و اسیدهای چرب امگا ۳، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن *StAR* و بهبود شاخص‌های بافت‌شناسی بیضه خروس‌ها می‌شود (Salari et al, 2021). علاوه‌بر این، بررسی‌ها روی نشانگرهای کلیدی سنتز تستوسترون نشان داده که استرس اکسیداتیو موجب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین و mRNA ژن *StAR* در بیضه خروس‌ها می‌شود، در حالی‌که پیش‌تیمار با مخمر سلنیوم این تغییرات را به‌طور مؤثری معکوس کرده و عملکرد طبیعی تولیدمثلی را حفظ می‌کند (Xiong et al, 2025). در مجموع، این یافته‌ها تأیید می‌کند که بهبود وضعیت متابولیکی و کاهش تنش اکسیداتیو بیضه، از طریق تنظیم بیان ژن‌های کلیدی استروئیدوژنز نظیر *StAR*، نقش تعیین‌کننده‌ای در حفظ و ارتقای باروری طیور دارد؛ نتایجی که با افزایش بیان *StAR*، بهبود کیفیت اسپرم و افزایش باروری مشاهده‌شده در پژوهش حاضر در خروس‌های مسن مادر گوشتی همسو است. افزودن اسیدآمینه‌های سرین و کولین به جیره خروس‌های مسن می‌تواند از طریق چندین مکانیسم بیولوژیکی باروری را تحت تاثیر قرار دهند. این دو ماده از نظر ساختار و عملکرد متفاوتند اما هر دو در متابولیسم، ساختار سلولی و عملکرد سیستم تولیدمثلی نقش کلیدی دارند. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داد، سرین علاوه بر شرکت در ساخت پروتئین‌ها، در مسیر متابولیسم یک‌کربنه و سنتز متیونین فعالیت دارد (Yang & Vousden, 2016; Holeček et al., 2022; Pan et al., 2020). به نظر می‌رسد این ترکیب از طریق تسهیل فراهمی متیلاسیون ژن‌ها می‌تواند به تنظیم بیان ژن‌ها از جمله ژن *StAR* کمک کند. ژن StAR به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی انتقال کلسترول به میتوکندری‌های سلول‌های بینابینی بیضه عمل می‌کند، فرایندی که به‌عنوان نخستین و محدودکننده‌ترین مرحله در مسیر بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، از جمله تستوسترون، شناخته شده است. افزایش بیان ژن *StAR* موجب تقویت تولید تستوسترون می‌شود؛ تستوسترونی که برای فرایند اسپرماتوژنز، بلوغ و تحرک اسپرم حیاتی است. در خروس‌های مسن، بالا بردن بیان *StAR* از طریق مصرف سرین می‌تواند به تقویت فرآیند اسپرم‌زایی و بهبود کیفیت اسپرم منجر شود و در نهایت میزان باروری را افزایش دهد. سرین به‌طور ویژه در ساخت مولکول‌های فسفاتیدیل سرین شرکت دارد که بخش مهمی از غشای سلولی اسپرم به شمار می‌آید (Kotwicka et al., 2011). فسفاتیدیل‌سرین به حفظ یکپارچگی و انعطاف‌پذیری غشای اسپرم کمک کرده و از آسیب‌پذیری اسپرم علیه استرس اکسیداتیو و تخریب‌های ناشی از افزایش سن محافظت می‌کند (Esfahani et al., 2013). همچنین سرین در فرآیندهای فسفوریلاسیون پروتئین‌ها نقش دارد که در تنظیم عملکرد سلولی و سیگنالینگ تولیدمثلی حیاتی است. به عبارت دیگر، سرین از طریق بهبود کیفیت و استحکام غشای اسپرم و تقویت مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید انرژی و حفاظت آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش تحرک و زنده‌مانی اسپرم شده و در نتیجه باروری را در خروس‌های مسن ارتقاء می‌دهد (Díaz Ruiz et al., 2024; Santiago-Moreno et al., 2019). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب می‌تواند به این دلیل باشد که سنتز گلوتاتیون و چرخه

متیونین را که با کاهش استرس اکسیداتیو نقش دارند، تسهیل می‌کند (Zhou et al., 2017). یافته‌های مطالعه حاضر با این مکانیسم‌ها همخوانی دارد، زیرا نشان داد مصرف سرین موجب افزایش بیان ژن *StAR* و کاهش بیان ژن *PVRL3* شد؛ این نتایج می‌تواند منعکس‌کننده بهبود ساختار و مقاومت غشای اسپرم و ارتقای مسیرهای متابولیکی انرژی و دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد که در نهایت باروری خروس‌های مسن را بهبود می‌بخشد. سرین موجود در جیره باعث کاهش مشهود سطح رونویسی ژن *PVRL3* گردید. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اثر سرین بر بیان این ژن انجام نشده، به‌نظر می‌رسد در صورت اختلال در مسیرهای متابولیکی یک‌کربنه و اینکه میزان سرین بیش از حد یا نامتعادل باشد، ممکن است موجب تغییرات ناسازگار در گروه‌های متیل‌دهی روی DNA و هیستون‌ها گردد که باعث سرکوب بیان ژن *PVRL3* شود. همچنین، افزایش مصرف سرین ممکن است باعث فعال شدن مکانیزم‌های بازخورد منفی شود که بطور مستقیم یا غیرمستقیم باعث مهار بیان ژن *PVRL3* گردد. در کل، تأثیر سرین بر کاهش بیان ژن *PVRL3* بستگی به دوز، تعادل متابولیکی، و وضعیت سلولی خروس‌های مسن دارد و نیاز به بررسی‌های دقیق‌تر بیوشیمیایی و مولکولی برای تعیین دقیق مکانیسم دارد. به نظر می‌رسد مکانیسم نقش کولین در افزایش بیان ژن‌های *StAR* و *PVRL3* عمدتاً از طریق تأثیر اپی‌ژنتیکی و بهبود ساختار کروماتین است. کولین نیز به‌عنوان پیش‌ساز گروه‌های متیل‌دهنده در مسیرهای متابولیسم یک‌کربنه نقش دارد، که این گروه‌های متیل می‌توانند موجب متیلاسیون DNA و هیستون‌ها در نواحی پروموتر و افزاینده ژن‌ها شوند (Singh Rawat et al., 2022; Bekdash et al., 2019; Friso et al., 2017). این تغییرات اپی‌ژنتیکی باعث باز شدن ساختار کروماتین و افزایش دسترسی فاکتورهای رونویسی به پروموتر ژن‌ها (مانند *Star* و *PVRL3*) می‌شود و در نتیجه رونویسی و بیان این ژن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین، کولین با حفظ ساختار غشای سلولی و فاکتورهای تنظیمی می‌تواند بطور غیرمستقیم از پایداری رونویسی و ترجمه این ژن‌ها حمایت کند (Kenny et al., 2025). کولین به‌عنوان یک ترکیب شبه‌ویتامینی شناخته می‌شود که پیش‌ساز فسفولیپیدهای غشایی مانند فسفاتیدیل‌کولین است. فسفاتیدیل کولین جزئی اساسی از ساختار غشاهای سلولی اسپرم و سلول‌های تولیدمثلی است (Fagone & Jackowski, 2013). همچنین در سنتز استیل‌کولین، یک انتقال‌دهنده عصبی مهم که بر کارکرد سیستم عصبی و واکنش‌های هورمونی تاثیرگذار است، نقش دارد (Kansakar et al., 2023). کولین با تقویت ساخت فسفولیپیدهای غشایی، به حفظ انعطاف‌پذیری و یکپارچگی غشا کمک کرده و از آسیب ناشی از پیری و استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Hanley, 2023) و نقش بسیار مهمی در حفظ سلامت غشای اسپرم ایفا می‌کند. غشای اسپرم به دلیل داشتن چربی‌های غیراشباع بالا، بسیار مستعد آسیب اکسیداتیو است که می‌تواند منجر به کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم شود. کولین با حفظ یکپارچگی غشا، مانع از ایجاد آسیب‌های مربوط به استرس اکسیداتیو و تخریب ساختارهای سلولی می‌شود و به این ترتیب کیفیت اسپرم را در خروس‌های مسن بهبود می‌بخشد (Attia et al., 2019). همچنین، به تنظیم متابولیسم چربی در کبد کمک کرده و از این طریق انرژی لازم برای فعالیت اسپرم و فرآیندهای تولیدمثل را تامین می‌کند. این محافظت غشایی، نقش اساسی در جلوگیری از کاهش باروری مرتبط با پیر شدن اسپرم ایفا می‌کند (Billah et al., 2022). کولین در متابولیسم چربی نقش مهمی دارد و با کمک به انتقال و استفاده بهتر چربی‌ها، سلامت کبد را حفظ می‌کند. این عملکرد تسهیل‌کننده تأمین انرژی لازم برای فعالیت‌های تولیدمثلی است. بنابراین، بهبود کارایی متابولیسم و افزایش کیفیت تولیدمثلی در خروس‌های مسن را ممکن می‌سازد. این امر به حفظ و ارتقای باروری کمک می‌کند (Crisóstomo et al., 2022) و از طریق دخالت در متابولیسم گروه‌های متیل، می‌تواند بر هورمون‌های تولیدمثلی نظیر تستوسترون تاثیر مثبت گذاشته و عملکرد بیضه‌ها و تولید اسپرم را تقویت کند (Prasetiyono et al., 2020). همانطور که گفته شد، کولین یک منبع اصلی گروه‌های متیل است که در واکنش‌های

متیلاسیون در بدن نقش حیاتی دارد. متیلاسیون به‌ویژه در تنظیم بیان ژن‌ها بسیار مهم است و می‌تواند فعالیت ژن‌های مرتبط با سنتز هورمون‌های جنسی مانند تستوسترون را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین گروه‌های متیل در مسیرهای تولید انرژی و سنتز فسفولیپیدهای غشایی سلول‌ها نقش دارند که برای عملکرد سالم بیضه‌ها و فرآیند اسپرماژنز ضروری است. با تأمین این گروه‌های متیل، می‌تواند از طریق تنظیم اپی‌ژنتیک، بیان ژن‌های کلیدی برای تولید هورمون‌های جنسی تستوسترون و استروژن و بهبود کیفیت اسپرم را افزایش دهد (Harbs et al., 2023; Jiang et al. 2020). بنابراین، کولین با شرکت در این مکانیسم‌ها، به تقویت عملکرد بیضه‌ها و افزایش تولید تستوسترون و استروژن کمک می‌کند که در نهایت منجر به بهبود کیفیت و کمیت اسپرم و باروری بهتر می‌شود. این مکانیسم‌ها مخصوصاً برای خروس‌های مسن که دچار ضعف عملکرد تولید مثلی به‌دلیل سن بالاتر هستند، اهمیت ویژه‌ای دارد. به‌طور کلی، کولین با تامین گروه‌های متیل مورد نیاز برای واکنش‌های بیوشیمیایی مرتبط با سنتز DNA و تنظیم بیان ژن‌ها (Krzysztof Blusztajn & Mellott, 2012; Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011)، و سرین با شرکت در ساخت پروتئین‌های ساختاری و فعالیت‌های فسفوریلاسیون، به‌صورت هم‌افزایانه باعث تقویت عملکرد تولیدمثلی می‌شوند (Zhang et al., 2023). هر دو ترکیب با بهبود استحکام و سلامت غشای اسپرم، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تنظیم متابولیسم انرژی، عوامل کلیدی مرتبط با افزایش کیفیت اسپرم را در خروس‌های مسن بهبود می‌بخشند. این بهبود در کیفیت اسپرم شامل افزایش حجم، تحرک، کاهش آسیب DNA و افزایش پایداری سلولی است که مستقیماً موجب افزایش نرخ باروری می‌شود.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مکمل‌های تغذیه‌ای سرین و کولین می‌توانند به‌عنوان عوامل مؤثر در بهبود وضعیت مولکولی مرتبط با باروری در خروس‌های مسن مورد توجه قرار گیرند. شواهد حاصل بیانگر آن است که این ترکیبات قادرند بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با عملکرد تولیدمثلی را تعدیل کنند و از این طریق بر کیفیت فرآیند اسپرم‌زایی تأثیر بگذارند. با توجه به افت طبیعی توان باروری در خروس‌های مسن، استفاده هدفمند از چنین مکمل‌هایی می‌تواند رویکردی عملی برای حفظ کارایی تولیدمثلی و کاهش پیامدهای منفی افزایش سن باشد. در مجموع، یافته‌های این مطالعه اهمیت توجه به نقش تغذیه در مدیریت باروری خروس‌های مادر گوشتی را برجسته کرده و نشان می‌دهد که بهینه‌سازی جیره از طریق مکمل‌های مناسب می‌تواند به ارتقای بهره‌وری تولیدمثل در صنعت طیور کمک کند.

سپاسگزاری: از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مالی برای انجام این پژوهش تشکر بعمل می‌آید.

References

Adeldust, H., Farzinpour, A., Farshad, A., Rostamzadeh, J., & Béjar, M. L. (2021). Effect of orally administrated letrozole on reproduction performance and gene expression of FOXJ1, LPR2 and PVRL3 in reproductive tract in aged roosters. *Theriogenology*, *161*, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.020

Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2009). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. In C. Y. Cheng (Ed.), *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (pp. 154–171). https://doi.org/10.4161/oxim.1.1.6843

Alizadeh, M., Aghaei, A., Vakili, S. T., & Nazari, M. (2025). Effect of L-serine amino acid and choline supplementation on sperm quality of aged broiler breeder roosters. *Iranian Journal of Animal Science Research*. Advance online publication. https://doi.org/10.22067/ijasr.2025.94457.1260

Amin Altawash, A. S., Zareh Shahneh, A., Moravej, H., Ansari, M., & Deldar, H. (2019). Improvement of testis histological parameters and relative expression of StAR gene in

Chrysin-fed roosters. *Iranian Journal of Animal Science*, *50*(3), 207–215. https://doi.org/10.22059/ijas.2018.240313.653554

Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., & Rafieian-Kopaei, M. (2017). The impact of oxidative stress on testicular function and the role of antioxidants in improving it: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *11*(5), IE01–IE05. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23927.9886

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

Attia, Y. A., El-Naggar, A. S., Abou-Shehema, B. M., & Abdella, A. A. (2019). Effect of supplementation with trimethylglycine (betaine) and/or vitamins on semen quality, fertility, antioxidant status, DNA repair and welfare of roosters exposed to chronic heat stress. *Animals*, *9*(8), Article 547. https://doi.org/10.3390/ani9080547

Bekdash, R. A. (2019). Neuroprotective effects of choline and other methyl donors. *Nutrients*, *11*(12), Article 2995. https://doi.org/10.3390/nu11122995

Billah, M. M., Khatiwada, S., Lecomte, V., Morris, M. J., & Maloney, C. A. (2022). Ameliorating high-fat diet-induced sperm and testicular oxidative damage by micronutrient-based antioxidant intervention in rats. *European Journal of Nutrition*, *61*(7), 3741–3753. https://doi.org/10.1007/s00394-022-02917-9

Bronson, R., Mikhailik, A., Schwedes, J., Gnatenko, D., & Hatchwell, E. (2017). Detection of candidate nectin gene mutations in infertile men with severe teratospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *34*(10), 1295–1302. https://doi.org/10.1007/s10815-017-0985-4

Cerolini, S., Kelso, K. A., Noble, R. C., Speake, B. K., Pizzi, F., & Cavalchini, L. G. (1997). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biology of Reproduction*, *57*(5), 976–980. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.976

Chiari, N. (2017). Food security: The challenge of nutrition in the new century. *Religions: Beyond Anthropocentrism, 5*, 145. https://doi.org/10.7358/rela-2017-002-chia

Christenson, L. K., & Strauss III, J. F. (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1529*(1–3), 175–187. https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00147-5

Crisóstomo, L., Videira, R. A., Jarak, I., Starčević, K., Mašek, T., Rato, L., & Alves, M. G. (2022). Inherited metabolic memory of high-fat diet impairs testicular fatty acid content and sperm parameters. *Molecular Nutrition & Food Research*, *66*(5), Article 2100680. https://doi.org/10.1002/mnfr.202100680

Díaz Ruiz, E., Navas González, F. J., León Jurado, J. M., Arando Arbulu, A., Delgado Bermejo, J. V., & González Ariza, A. (2024). Effects of supplementation of different antioxidants to cryopreservation extender on the post-thaw quality of rooster semen-A meta-analysis. *Animals*, *14*(20), Article 2936. https://doi.org/10.3390/ani14202936

Esfahani, B. A. S. M., Mirmoghtadaei, M., & Anaraki, S. B. (2013). Oxidative stress and aging. In *Immunology of aging* (pp. 323–338). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39495-9_24

Fagone, P., & Jackowski, S. (2013). Phosphatidylcholine and the CDP–choline cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(3), 523–532. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.009

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

Friso, S., Udali, S., De Santis, D., & Choi, S. W. (2017). One-carbon metabolism and epigenetics. *Molecular Aspects of Medicine*, *54*, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.007

Gallo, A., Esposito, M. C., Tosti, E., & Boni, R. (2021). Sperm motility, oxidative status, and mitochondrial activity: Exploring correlation in different species. *Antioxidants*, *10*(7), Article 1131. https://doi.org/10.3390/antiox10071131

Hanley, P. J. (2023). Elusive physiological role of prostatic acid phosphatase (PAP): Generation of choline for sperm motility via auto-and paracrine cholinergic signaling. *Frontiers in Physiology*, *14*, Article 1327769. https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1327769

Harbs, J., Rinaldi, S., Keski-Rahkonen, P., Liu, X., Palmqvist, R., Van Guelpen, B., & Harlid, S. (2023). An epigenome-wide analysis of sex hormone levels and DNA methylation in male blood samples. *Epigenetics*, *18*(1), Article 2196759. https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2196759

Holeček, M. (2022). Serine metabolism in health and disease and as a conditionally essential amino acid. *Nutrients*, *14*(9), Article 1987. https://doi.org/10.3390/nu14091987

Jiang, X., Li, X., Feng, W., Qin, Y., Li, Z., Nie, H., & Bai, W. (2021). Baking of methionine-choline deficient diet aggravates testis injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *154*, Article 112245. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112245

Kansakar, U., Trimarco, V., Mone, P., Varzideh, F., Lombardi, A., & Santulli, G. (2023). Choline supplements: An update. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, Article 1148166. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1148166

Kenny, T. C., Scharenberg, S., Abu-Remaileh, M., & Birsoy, K. (2025). Cellular and organismal function of choline metabolism. *Nature Metabolism*, *7*(1), 35–52. https://doi.org/10.1038/s42255-024-01203-8

Kotwicka, M., Jendraszak, M., & Jedrzejczak, P. (2011). Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: Topography in membrane domains and relation to cell vitality. *The Journal of Membrane Biology*, *240*(3), 165–170. https://doi.org/10.1007/s00232-011-9357-7

Krzysztof Blusztajn, J., & J Mellott, T. (2012). Choline nutrition programs brain development via DNA and histone methylation. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, *12*(2), 82–94. https://doi.org/10.2174/187152412800792706

Kumagai, A., Kodama, H., Kumagai, J., Fukuda, J., Kawamura, K., Tanikawa, H., & Tanaka, T. (2002). Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction*, *8*(2), 118–123. https://doi.org/10.1093/molehr/8.2.118

Li, J., Xin, Y., Li, J., Chen, H., & Li, H. (2023). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase: From functions to diseases. *Aging and Disease*, *14*(3), 879. https://doi.org/10.14336/AD.2022.1025

Nakamura, M. T., Cheon, Y., Li, Y., & Nara, T. Y. (2004). Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*, *39*(11), 1077–1083. https://doi.org/10.1007/s11745-004-1333-0

Pan, S., Fan, M., Liu, Z., Li, X., & Wang, H. (2020). Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer. *International Journal of Oncology*, *58*(2), 158–170. https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5158

Partyka, A., Babapour, A., Mikita, M., Adeniran, S., & Niżański, W. (2023). Lipid peroxidation in avian semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *26*(4), 497–509. https://doi.org/10.24425/pjvs.2023.145050

Prasetiyono, B. W. H. E., Ondho, Y. S., Subrata, A., Pratiwi, P. K., Zahra, M. B., Itmamulwafa, T., & Widiyanto, W. (2020). The effect of choline chloride supplementation on the reproductive performance of Simmental bulls fed protected protein in the ration. *Buletin Peternakan*, *44*(2), 83–89. https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v44i2.55338

Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*, *17*(3), 330–339. https://doi.org/10.1038/nm.2305

Sabah, S., & Dikmen, B. Y. (2023). Relationships between morphological characteristics of roosters in broiler breeders at different age periods. *Journal of Poultry Research*, *20*(1), 25–31. https://doi.org/10.34233/jpr.1314476

Salari, H. R., Jafari Ahangari, Y., & Ansari Pirsaraie, Z. (2021). Changes of testis histology parameters and relative expression of TGF-β4 & StAR genes in roosters fed CoQ10 and omega-3 fatty acids. *Journal of Animal Production*, *23*(2), 293–302. https://doi.org/10.22059/jap.2021.314795.623578

Saleh, R. A., & Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, *23*(6), 737–752. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02324.x

Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Perez-Cerezales, S., Castano, C., Toledano-Díaz, A., Esteso, M. C., & Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLOS ONE*, *14*(1), Article e0209910. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910

Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., & Brenig, B. (2021). Sperm lipid markers of male fertility in mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), Article 8767. https://doi.org/10.3390/ijms22168767

Sharma, A. K., & Bansal, P. (Eds.). (2023). *Serine proteases: Role in human health and disease*. Walter de Gruyter.

Singh Rawat, B., Venkataraman, R., Budhwar, R., & Tailor, P. (2022). Methionine-and choline-deficient diet identifies an essential role for DNA methylation in plasmacytoid dendritic cell biology. *The Journal of Immunology*, *208*(4), 881–897. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100763

Stocco, D. M., Clark, B. J., Reinhart, A. J., Williams, S. C., Dyson, M., Dassi, B., & Orly, J. (2001). Elements involved in the regulation of the StAR gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *177*(1–2), 55–59. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00423-3

Xiong, N., Liu, S., Hu, W., Liu, Y., Ding, X., Wu, B., & Zheng, W. (2025). Selenium yeast alleviates diquat-induced oxidative stress and testicular damage in roosters. *Animal Reproduction Science*, *273*, Article 107760. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107760

Yang, M., & Vousden, K. H. (2016). Serine and one-carbon metabolism in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *16*(10), 650–662. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.81

Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *199*(3), 316–331. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018

Zhang, X., Peng, J., Wu, M., Sun, A., Wu, X., Zheng, J., & Gao, G. (2023). Broad phosphorylation mediated by testis-specific serine/threonine kinases contributes to spermiogenesis and male fertility. *Nature Communications*, *14*(1), Article 2629. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38357-0

Zhou, X., He, L., Wu, C., Zhang, Y., Wu, X., & Yin, Y. (2017). Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(11), Article 1700262. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700262

Zhou, X., He, L., Zuo, S., Zhang, Y., Wan, D., Long, C., & Yin, Y. (2018). Serine prevented high-fat diet-induced oxidative stress by activating AMPK and epigenetically modulating the expression of glutathione synthesis-related genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1864*(2), 488–498. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.009