Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Hamidreza Taghian[1]*, Kian Sadeghi[2]

[1] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, Email: hamidreza.taghian@ut.ac.ir

[2] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: kian.sadeghi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received:
Revised:
Accepted:

Keywords:
Murciana buck
Zinc
Zn-methionine
Zn sulfate
Zn nanoparticles

ABSTRACT

Background and objectives: Goat as a multipurpose animal is crucial for the economy and food supply for urban and rural communities. Zinc is one of the most restricted trace minerals, which should be included in the diet of ruminants on daily. Research has shown that the use of organic or zinc nanoparticle supplements compared to inorganic supplements causes the stability of the sperm membrane and reduces oxidative damage, as well as improves the preservation of the integrity of the sperm membrane. Studies conducted in humans, mice, dogs, cows and goats showed that zinc chelates are more effective in maintenance, stability, motility and attachment of head to tail of spermatozoa. Also, since different sources of zinc have different bioavailability and there are few studies about the effects of different sources of zinc on the reproductive attributes in bucks, the present experiment is to investigate the effect of different sources of zinc on reproductive performance and some blood parameters in Murciana bucks.

Materials and methods: Forty mature Murciana bucks (with an average age of approximately 1.5 years and an average body weight of 43±1.54 kg) were applied for a 60-day experiment in a completely randomized design model. The animals were randomly assigned into 4 experimental treatments with 10 replications, which included: control (containing 19.95 mg kg^{-1} Zn without supplementation), 32 $mgkg^{-1}$ ZnSO4, 32 mg kg^{-1} ZnMet, and 32 mg kg^{-1} nano-Zn. Blood samples were collected by jugular vein puncture containing an anti-coagulant agent before morning meal on days 30 and 60 days of the experiment. Chemical analysis of feed samples was adjusted through international instructions for dry matter, ash, crude protein, ether extract, and neutral detergent fiber. Ejaculate volume was evaluated in a graduated glass tube that was adjusted to the artificial vagina. Moreover, the concentration of sperm to each ejaculation was carry out by a hemocytometer chamber through an optical microscope. The Eosin-Nigrosin stain was utilized to calculate the proportions of live, dead and abnormalities including head, mid-piece and tail. The CASA computer software was used to evaluate sperm motility characteristics according to reference guidelines. The ELISA method measured plasma testosterone concentration using a

PROOF

commercial kit. Plasma samples were digested with hydrochloric acid and then the concentrations of Fe, Zn and Cu were determined by a flame atomic absorption spectrometry. Semen quality and quantity traits were analyzed by completely randomized design (CRD) using the Proc GLM. Blood testosterone concentrations were analyzed as repeated measures in a completely randomized design using the Proc MIXED.

Results: In this research, Zn supplementation caused an increase in ejaculate volume, sperm concentration, viability, sperm membrane integrity, sperm morphology and some sperm velocity characteristics ($P \leq 0.05$). Also, no significant difference was observed between the quantitative, qualitative, motility and morphological characteristics of sperm among the source of Zn supplements ($ZnSO_4$, Zn-Met, nano-Zn) ($P > 0.05$). The Zn plasma concentration and testosterone were improved in the treatments fed Zn supplements compared to the control group ($P \leq 0.05$), but no significant difference was observed between the plasma concentrations of Cu and Fe ($P > 0.05$).

Conclusion: Feeding various types of Zn supplements (organic, inorganic and nanoparticles) improved the reproductive performance of Murciana bucks, which seems to be probably due to the lack of sufficient amounts of Zn in the diets. Considering the amount of zinc in the basal diet and the conditions of this experiment, it is suggested to use zinc sulfate in rations to improve reproductive performance and feed cost management.

Cite this article: Taghian, H.R., Sadeghi, K. (2024). ----------. *Journal of Ruminant Research*, 12(4),.

© The Author(s).
DOI:
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

PROOF

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

بررسی اثر منابع مختلف روی بر عملکرد تولید مثلی و برخی از فراسنجه‌های خونی در بزهای نر بالغ مورسیا

حمیدرضا تقیان[1*]، کیان صادقی[2]

[1] گروه علوم‌دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hamidreza.taghian@ut.ac.ir

[2] گروه علوم‌دامی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: kian.sadeghi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت:
تاریخ ویرایش:
تاریخ پذیرش:

واژه‌های کلیدی:
بز مورسیا
روی
روی-متیونین
سولفات روی
نانوذرات روی

چکیده

سابقه و هدف: بز به‌عنوان حیوانی چند منظوره برای اقتصاد و تأمین مواد غذایی برای جوامع شهری و روستایی حائز اهمیت است. روی یکی از محدود کننده‌ترین مواد معدنی کم‌مصرف بوده که بایستی به‌صورت روزانه در جیره غذایی نشخوارکنندگان گنجانده شود. تحقیقات نشان‌داده‌اند که استفاده از مکمل‌های آلی و یا نانو ذرات روی در مقایسه با مکمل‌های معدنی سبب پایداری غشای اسپرم و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو همچنین سبب بهبود حفظ یکپارچگی غشای اسپرم می‌شوند. پژوهش‌های انجام شده در انسان، موش، سگ، گاو و بز نشان دادند که کیلات روی بر حفظ، پایداری، جنبایی و اتصال سر به دم اسپرماتوزوآ مؤثر است. همچنین از آنجا که منابع مختلف روی زیست فراهمی متفاوتی دارند و مطالعات اندکی پیرامون اثرات منابع مختلف روی بر خصوصیات تولید مثلی بز نر وجود دارد، آزمایش حاضر به منظور بررسی اثر منابع مختلف روی بر عملکرد تولید مثلی و برخی از فراسنجه‌های خون در بزهای نر بالغ مورسیا طراحی شد.

مواد و روش‌ها: از ۴۰ رأس بز نر بالغ مورسیا (با میانگین سنی تقریباً ۱/۵ سال و میانگین وزن زنده ۱/۵۴±۴۳ کیلوگرم) به‌مدت ۶۰ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. دام‌ها به‌طور تصادفی در ۴ تیمار آزمایشی و ۱۰ تکرار گروه‌بندی شدند که شامل: شاهد (دارای ۱۹/۹۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بدون مکمل)، ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی، ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم روی-متیونین، ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات روی بودند. نمونه‌برداری خون در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش پس از مصرف خوراک با استفاده از لوله‌های تحت خلاء حاوی ماده ضد انعقاد خون انجام شد. آنالیز شیمیایی نمونه‌های مربوط به خوراک از طریق دستورالعمل‌های بین‌المللی برای ماده خشک، خاکستر خام، پروتئین خام، چربی خام و فیبر محلول در شوینده خنثی انجام شد. حجم انزال با استفاده از لوله‌های مدرج اندازه‌گیری گردید. همچنین غلظت اسپرم مربوط به هر انزال با استفاده از لام هموسایتومتر و با کمک میکروسکوپ نوری تعیین شد. از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین به‌منظور تعیین درصد اسپرم‌های زنده، مرده و ریخت‌شناسی اسپرم شامل ناهنجاری سر، تنه و دم استفاده شد. سیستم واکاوی کامپیوتری

PROOF

به‌منظور ارزیابی خصوصیات حرکتی اسپرم مطابق با دستورالعمل‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پلاسمایی تستوسترون با استفاده از کیت‌های تجاری و از طریق دستگاه الایزا تعیین شدند. نمونه‌های پلاسما با اسید کلریدریک هضم شدند و سپس از طریق دستگاه جذب اتمی مقادیر مربوط به عناصر آهن، روی و مس اندازه‌گیری شدند. خصوصیات کمی و کیفی منی از طریق مدل آماری طرح کاملاً تصادفی و به روش آنالیز واریانس و رویه GLM آنالیز شد. همچنین غلظت عناصر معدنی و تستوسترون پلاسما به‌صورت اندازه‌های تکرار شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه ترکیب شده واکاوی شد.

یافته‌ها: در این پژوهش تغذیه مکمل روی سبب افزایش حجم انزال، غلظت اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشای اسپرم و بهبود ریخت‌شناسی و برخی از خصوصیات حرکتی اسپرم شد ($P \leq ۰/۰۵$). همچنین تفاوت معنی‌داری میان خصوصیات کمی، کیفی، حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم میان انواع مکمل‌های تغذیه شده (سولفات روی، روی–متیونین، نانوذرات روی) مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). غلظت پلاسمایی روی و تستوسترون در تیمارهای تغذیه شده با انواع مکمل روی نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت ($P \leq ۰/۰۵$) اما میان غلظت پلاسمایی مس و آهن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تغذیه انواع مکمل روی (آلی، غیرآلی و نانو ذرات) سبب بهبود عملکرد تولید مثلی بزهای نر مورسیا شد که به نظر می‌رسد احتمالاً این بهبود خصوصیات کمی و کیفی اسپرم به دلیل کمبود مقادیر کافی روی در جیره‌های غذایی است. با توجه به میزان روی در جیره پایه و شرایط آزمایش حاضر پیشنهاد می‌گردد به منظور بهبود عملکرد تولید مثلی و مدیریت هزینه خوراک از سولفات روی در جیره‌های غذایی استفاده شود.

استناد: تقیان، حمیدرضا؛ صادقی، کیان. (۱٤۰۳). بررسی اثر منابع مختلف روی بر عملکرد تولید مثلی و برخی از فراسنجه‌های خونی در بزهای نر بالغ مورسیا. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۲(٤)،

DOI:

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

PROOF

مقدمه

بز به‌عنوان حیوانی چند منظوره برای اقتصاد و تأمین مواد غذایی برای جوامع شهری و روستایی حائز اهمیت می‌باشد. پرورش و نگهداری این حیوان در مناطق با خاک فقیر، بارندگی کم و پوشش گیاهی فصلی نیز امکان‌پذیر است (Ukanwoko و همکاران، ۲۰۱۳). جمعیت روستایی ایران تا حد زیادی به پرورش بز برای گذران زندگی خود وابسته می‌باشند. علاوه بر اینکه گوشت و شیر بز جزو منابع پروتئینی ضروری محسوب می‌شوند، بهبود تولید مثل در این حیوان سبب افزایش تعداد بزغاله‌های متولد شده و متعاقباً سبب بهبود اقتصادی خواهد شد.

روی یکی از محدود کننده‌ترین عناصر در تغذیه دام‌ها است و از آنجا که بدن نمی‌تواند مقدار زیادی از آن را ذخیره کند، لذا باید به‌صورت روزانه در جیره غذایی دام‌ها گنجانده شود (Suttle، ۲۰۱۰). روی نقش مهمی در تولید مثل نشخوارکنندگان بازی می‌کند و برای حفظ و پیشرفت فرآیند اسپرم‌سازی و تنظیم جنبایی اسپرم‌ها، رشد بیضه‌ها، بلوغ اسپرم و ساخت تستوسترون ضروری است (Liu و همکاران، ۲۰۲۰). رابطه بسیار قوی بین روی و اسپرم‌سازی وجود دارد و بخش‌های مختلف دستگاه تولید مثلی حیوان نر و همچنین مایع منی آن دارای مقادیر بالایی از عنصر روی است (Liu و همکاران، ۲۰۱۵). کمبود روی باعث اخلال در عملکرد فعالیت غ‌کدد جنسی، کاهش حجم بیضه‌ها، ظهور نامناسب صفات جنسی ثانویه و تحلیل لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود (Hernández-Meléndez و همکاران، ۲۰۱۵). عنصر روی جنبایی اسپرماتوزوا را به واسطه کنترل استفاده از انرژی در سیستم ATP تحت تأثیر قرار داده و همچنین انرژی دریافتی از فسفولیپیدها را تنظیم می‌کند (El-Masry و همکاران، ۱۹۹٤). بین غلظت پلاسمایی عنصر روی و تستوسترون پلاسما ارتباط معنی‌داری وجود دارد و پیشنهاد شده است که تأمین مقادیر کافی روی برای عملکرد اسپرم ضروری می‌باشد (Liu و همکاران، ۲۰۲۰).

روی برای آغاز و حفظ فرآیند تولید اسپرم در بز ضروری محسوب می‌شود (Rahman و همکاران، ۲۰۱٤؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸) به‌طوری که افزودن روی به جیره‌غذایی بزهای جوان سبب افزایش تولید اسپرم می‌شود (Underwood و Somers، ۱۹٦۹؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸؛ Liu و همکاران،۲۰۲۰). تغذیه مکمل روی سبب کاهش تشکیل اسپرم‌های غیرطبیعی می‌شود (Roy و همکاران، ۲۰۱۳) درحالی که مصرف ناکافی روی می‌تواند مکانیسم بازسازی و اصلاح DNA را به خطر انداخته و سلول اسپرم را در معرض آسیب اکسیداتیو قرار دهد (Suttle، ۲۰۱۰). مواد معدنی آلی دارای زیست فراهمی نسبی بالاتری نسبت به انواع غیرآلی بوده و از میزان نرخ جذب بالاتری برخوردار هستند (Garg و همکاران، ۲۰۰۸) که سبب بهبود باروری جنس نر می‌شوند (Arthington و همکاران، ۲۰۰۲؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰٦؛ Rowe و همکاران، ۲۰۱٤).

تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های آلی و یا نانو ذرات روی در مقایسه با مکمل‌های معدنی سبب پایداری غشای اسپرم و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در بز می‌شود (Roy و همکاران، ۲۰۱۳؛ Rahman و همکاران، ۲۰۱٤؛ Raje و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸) و همچنین سبب بهبود حفظ یکپارچگی غشای اسپرم می‌گردد (Kumar و همکاران، ۲۰۰٦). مطالعات انجام شده در انسان، موش صحرایی، سگ، گاو و بز نشان دادند که کیلات روی بر حفظ، پایداری، جنبایی و اتصال سر به دم اسپرماتوزوآ مؤثر است (Kvist و

PROOF

همکـــاران، ۱۹۸۸؛ Kumar و همکـــاران، ۲۰۰٦؛ Arangasamyو همکاران، ۲۰۱۸). باتوجـه بـه اینکـه خاک‌های مناطق مختلف ایران دارای کمبود روی بوده و خوراک‌های دامـی بدسـت آمـده نیـز دارای کمبـود روی می‌باشـند (Ziaeian و همکـاران، ۲۰۰۱)، جیـره غذایی دام‌ها نیازمند مکمـل روی اسـت. همچنـین از آنجا که منابع مختلف روی زیست فراهمـی متفـاوتی دارند و مطالعات اندکی پیرامون اثرات منـابع مختلـف روی بر خصوصیات تولید مثلـی بـز نـر وجـود دارد، آزمایش حاضر به منظور بررسی اثر مکمل‌سازی جیره با منابع مختلف روی بر خصوصـیات کمـی و کیفـی منی، غلظت پلاسمایی تستوسترون و برخـی از مـواد معدنی کم‌مصرف در بزهای نر بـالغ مورسـیا طراحـی شد.

مواد و روش‌ها

ایـن پـژوهش در مجموعـه بـزداری صـنعتی شـرکت مگسال واقع در شهرسـتان آبیـک قـزوین و در فصـل تولید مثلی سال ۱٤۰۲ انجام شد. چهل رأس بز نر بالغ مورسیا (با میانگین سنی تقریبـاً ۱/۵ سـال و میـانگین وزن زنده ۱/٥٤ ± ٤۳ کیلوگرم) که از سلامتی عمومی مناسبی برخوردار بودند در جایگاه‌های انفرادی مقید و به مدت ٦۰ روز در قالب طرح کاملاً تصـادفی مـورد استفاده قرار گرفتند. بزهای مورد آزمـایش بـر اسـاس میانگین وزن بـدن بـه‌طـور تصـادفی در چهـار تیمـار آزمایشی و ۱۰ تکرار (جمعـاً ٤۰ رأس)، گـروه‌بنـدی شـدند: ۱) جیـره‌پایـه (دارای ۱۹/۹۵ میلـی‌گـرم در کیلوگرم روی بدون مکمـل)، ۲) جیـره‌پایـه دارای ۳۲ میلی‌گـرم در کیلـوگرم سـولفات روی، ۳) جیـره‌پایـه دارای ۳۲ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم روی-متیـونین، ٤) جیره‌پایه دارای ۳۲ میلـی‌گـرم در کیلـوگرم نـانوذرات روی. جیره‌های آزمایشی و ترکیبات شیمیایی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده‌شده است. تمام جیره‌های آزمایشی به نحوی متعادل شدند که ضمن یکسان بـودن میـزان پروتئین و انرژی، احتیاجات مـواد مغـذی مـورد نیـاز بزها را مطابق توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات فراهم می‌نمودنـد (NRC، ۲۰۰۷). تمـام جیـره‌هـای غـذایی به‌طور روزانه تهیه و به‌صورت کاملاً مخلـوط‌شـده در دو وعده صبح (ساعت ۸:۰۰) و عصر (ساعت ۱٦:۰۰) در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت و همچنین دسترسی آزاد به آب تازه نیز وجود داشت. در ایـن آزمـایش از سولفات روی با خلوص ۳۵ درصد بدون آب (شرکت دامیار جـامع، تهـران، ایـران)، روی-متیـونین آلـی بـا خلوص ۵ درصد (شرکت دانش بنیان آریانـا، مشـهد، ایران)، نانو ذرات روی با خلوص ۹۵ درصد تهیه شده در آزمایشگاه تغذیه دانشگاه تهـران، کـرج مطـابق بـا روش Dhoke (۲۰۲۳) اسـتفاده شـد. بـا توجـه بـه توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات بزهای نر با میـانگین وزن بدن ٤۰ کیلوگرم، مقدار ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک به روی نیاز دارند؛ بنـابراین بـا توجـه بـه مقدار روی موجود در جیره پایه و با در نظـر گـرفتن میزان گـوارش‌پـذیری، ضـریب جـذب (٦۰ الـی ۷۰ درصد) و احتمال وجود ترکیبات آنتاگونیست (NRC، ۲۰۰۷)، مقدار ۳۲ میلی‌گرم در کیلـوگرم مکمـل روی بر اساس ماده خشک مصرفی برای هـر رأس در نظـر گرفته شد. مکمل‌های روی ابتـدا بـا مقـداری از جـو آسیاب شده مخلوط و سـپس بـه صـورت سـرک بـه خوراک وعده صبح اضافه می‌گردید (بر اسـاس مـاده خشک مصرفی روزانه).

جمع آوری نمونه‌ها

قبل از شروع آزمایش، عملیات وزن‌کشی انجـام و بـر همین اساس بزها در تیمارهـای مختلـف بـه‌صـورت تصادفی گروه‌بندی شـدند. نمونـه‌گیـری از علوفـه‌هـا جهت تعیـین مـاده خشـک و تنظـیم مقـدار خـوراک مصرفی به صورت هفتگی انجام شـد. قبـل از شـروع

PROOF

آزمایش، بزها برای نمونه‌گیری از منی به کمک واژن مصنوعی عادت‌دهی شدند و سپس ۳ انزال در هفته پایانی آزمایش (با فاصله دو روز) از یکایک دام‌ها (جمعاً ۱۲۰ انزال) جمع‌آوری شد. عملیات نمونه‌گیری توسط یک شخص متخصص انجام و بلافاصله پس از آن در حمام آب‌گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری می‌شدند. نمونه‌برداری خون در روزهای ۳۰ و ٦۰ آزمایش حدود ۳ ساعت پس از مصرف خوراک با استفاده از لوله‌های تحت خلاء حاوی ماده ضد انعقاد خون از سیاهرگ گردنی انجام شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و سپس پلاسماهای به‌دست آمده در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آنالیز نمونه‌ها: آنالیز شیمیایی نمونه‌های مربوط به خوراک پس از خشک نمودن از طریق آون در دمای ٦۰ درجه سلسیوس (به‌مدت ۷۲ ساعت) و آسیاب نمودن با توری به قطر ۱ میلی‌متر از طریق دستورالعمل‌های بین‌المللی برای ماده خشک، ماده آلی، خاکستر خام (کوره الکتریکی) پروتئین خام (کجلدال اتوماتیک) و چربی خام (سوکسله) انجام شد (AOAC، ۲۰۰٦). به‌منظور تعیین الیاف نامحلول در شوینده خنثی از طریق روش استاندارد با استفاده از سدیم سولفات و آلفا آمیلاز پایدار در برابر حرارت (۱۰۰ میکرولیتر به ازای ۰/۵ گرم نمونه) توسط دستگاه آنکوم تک (اصفهان، ایران) انجام شد (Van Soest و همکاران، ۱۹۹۱). میزان کربوهیدرات‌های غیرالیافی از رابطه ذیل محاسبه گردید (AOAC، ۲۰۰٦).

NFC=100-(NDF+CP+Ash+EE)

در رابطه فوق NDF، الیاف نامحلول در شوینده خنثی؛ CP، پروتئین خام؛ Ash، خاکستر خام؛ EE، عصاره اتری است. علاوه بر این میزان انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی نیز با استفاده از جداول انجمن ملی تحقیقات برآورد گردید (NRC، ۲۰۰۷).

حجم انزال مربوط به هریک از بزها با استفاده از لوله‌های مدرج جداگانه‌ای (با دقت ۰/۱ میلی‌لیتر) که به واژن مصنوعی متصل می‌شد اندازه‌گیری گردید. سپس غلظت اسپرم مربوط به هر انزال با استفاده از لام هموسایتومتر[1]، توسط یک فرد متخصص پس از رقیق‌سازی منی به نسبت ۱ به ۲۰۰ با آب مقطر از طریق میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابری تعیین و غلظت‌ها بر اساس $۱۰^{۹}$/ میلی‌لیتر بیان شدند (Mekasha و همکاران، ۲۰۰۷). از رنگ‌آمیزی ائوزین-نیگروزین حداقل ۲۰۰ عدد اسپرم به‌منظور تعیین درصد اسپرم‌های زنده، مرده و ریخت‌شناسی اسپرم شامل ناهنجاری سر، تنه و دم (وجود قطره سیتوپلاسمی، دم بریده، کج، گره خورده و بند کفشی) با استفاده از میکروسکوپ نوری (لابومد الایکس٤۰۰، فریمونت، ایالات متحده امریکا) در بزرگ‌نمایی ٤۰۰ برابری شمارش گردید (Swanson و همکاران، ۱۹۵۱). برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم ابتدا مقدار ۱۰ میکرولیتر نمونه منی به آرامی با ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول هیپواسمتیک[2] (شامل ۰/۹ گرم فروکتوز، ۰/٤۹ گرم سدیم سیترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر با فشار اسمزی ۱۲۵ mOms kg^{-1}) مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید؛ سپس یک قطره از نمونه انکوبه‌شده بر روی لام منتقل و با لامل پوشانده شد، آنگاه حداقل ۲۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری تضاد فاز[3] (لابومد الایکس٤۰۰، فریمونت، ایالات متحده امریکا) با بزرگ‌نمایی ٤۰۰ برابری شمارش شد. دم اسپرم‌های با غشای سالم در

1. Hemocytometer
2. Hypo-osmotic solution
3. Phase-contrast microscope

PROOF

واکنش با این آزمایش گره می‌خورد (پدیده‌ای که در آن دم پیچ خورده یا خم می‌شد) اما دم اسپرم‌های با غشای آسیب دیده به‌صورت صاف باقی می‌ماند. از سیستم واکاوی کامپیوتری (ویدئو تست اسپرم ۲,۱) به‌منظور ارزیابی خصوصیات حرکتی اسپرم مطابق با دستورالعمل‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت (Larsen و همکاران، ۲۰۰۰).

.جدول ۱- اقلام جیره و ترکیب مواد مغذی جیره‌پایه (بر اساس ماده خشک)

Table 1- Ingredients and nutrient composition of the basal diet (dry matter basis)

درصد ماده خشک % of DM	Ingredient of diet	اجزای جیره
60	Alfalfa hay	یونجه خشک
4	Wheat straw	کاه گندم
14	Barley grain	دانه جو
14	Corn grain	دانه ذرت
6	Soybean meal	کنجاله سویا
2	Wheat straw	سبوس گندم
	Nutrients composition	ترکیب مواد مغذی
89.90	Dry matter (%)	ماده خشک (درصد)
81.61	Organic matter (%)	ماده‌آلی (درصد)
14.43	Crude protein (%)	پروتئین‌خام (درصد)
8.29	Ash (%)	خاکستر خام (درصد)
2.76	Ether extract (%)	عصاره اتری (درصد)
42.32	Neutral detergent fiber (%)	فیبر نامحلول در شوینده‌خنثی (درصد)
32.19	Non-fiber carbohydrates (%)	کربوهیدارت‌های غیرفیبری (درصد)
1.28	Calcium (%)	کلسیم (درصد)
0.28	Phosphorus (%)	فسفر (درصد)
19.95	Zinc (mg kg^{-1})	روی (میلی‌گرم در کیلوگرم)
6.92	Copper (mg kg^{-1})	مس (میلی‌گرم در کیلوگرم)
197.13	Ferrous (mg kg^{-1})	آهن (میلی‌گرم در کیلوگرم)
2.42	Metabolizable energy (Mcal kg^{-1})	انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری در کیلوگرم)

انرژی قابل متابولیسم بر اساس مگاکالری بر کیلوگرم ماده خشک است که با استفاده از جداول انجمن ملی تحقیقات برآورد شده است.

نمونه تازه منی را (۲ میکرولیتر) به آرامی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافری فسفات (اسیدیته ۷/۲) ترکیب نموده و سپس مقدار ۵ میکرولیتر از آن به اسلاید از پیش گرم شده (۳۷ درجه سلسیوس) منتقل نموده و توسط میکروسکوپ نوری تضاد فاز برای مدت ۲ ثانیه با سرعت ۵۰ فریم بر ثانیه به‌طور تصادفی از پنج ناحیه مختلف هر اسلاید تصویربرداری انجام و تجزیه و تحلیل شد (حداقل ۵۰۰ اسپرم). فراسنجه‌های حرکتی مورد نظر شامل جنبایی کل[1]، جنبایی پیش‌رونده[2]، سرعت در مسیر میانگین[3]، سرعت در

1. Total motility
2. Progressive motility
3. Average path velocity

PROOF

مسیر منحنی[1]، سرعت در مسیر مستقیم[2]، جنبایی عرضی سر[3]، تناوب عرضی زنش[4]، راستی مسیر طی شده[5] و خطی بودن جنبایی[6] مطابق دستورالعمل‌های استاندارد مورد واکاوی و محاسبه قرار گرفت (Palacín و همکاران، ۲۰۱۳).

غلظت پلاسمایی تستوسترون با استفاده از کیت‌های تجاری مونوبایند (مونوبایند، ایالات متحده امریکا) و دستگاه الایزا ریدر (بی‌تی ۱۵۰۰) آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران تعیین شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۲۵ میکرولیتر پلاسما (دو تکرار به ازای هر نمونه) به ۵۰ میکرولیتر از محلول تستوسترون-آنزیم و ۵۰ میکرولیتر از محلول تستوسترن-بیوتین اضافه (به مدت ۲۰ الی ۳۰ ثانیه به آرامی مخلوط شد) و پس از انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق، مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از محلول شستشو به ترکیب اضافه گردید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در ادامه ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه و برای ۱۵ الی ۲۰ ثانیه به‌خوبی با محلول ترکیب گردید. در نهایت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر قرائت و مقدار تستوسترون توسط منحنی استاندارد محاسبه و نتایج به‌صورت نانوگرم در میلی‌لیتر ثبت شد.

نمونه‌های پلاسما از طریق روش هضم تر با اسید کلرودریک ۰/۳ مولار (نسبت ۱ به ۲۰) هضم شده و سپس از طریق دستگاه جذب اتمی (واریانت، استرالیا) در طول موج ۲۳۱/۹ نانومتر مقادیر مربوط به عناصر آهن، روی و مس اندازه‌گیری شدند (Rimbach و همکاران، ۱۹۹۸).

میانگین داده‌های به‌دست آمده از سه انزال پایانی در آزمایش به‌عنوان نتایج نهایی مورد استفاده قرار گرفت و صفات کیفی و کمی از طریق مدل آماری طرح کاملاً تصادفی[7] به روش آنالیز واریانس و با استفاده از نرم‌افزار آماری سس[8] (نسخه ۹,۱) و رویه جی‌ال‌ام[9] و مدل آماری زیر آنالیز گردید.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + Bx_{ij} + e_{ij}$$

غلظت عناصر معدنی و تستوسترون پلاسما به‌صورت اندازه‌های تکرار شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه ترکیب‌شده[10] مطابق با مدل آماری ذیل واکاوی شد.

$$Y_{ijk}=\mu+T_i+Time_j+T_i\times Time_j+e_{ijk}$$

Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین کل متغیر مورد بررسی، T_i = اثر تیمار، Bx_{ij} = کوواریت متغیر، $Time_j$ = اثر زمان، $T_i \times Time_{ij}$ = اثر متقابل تیمار و زمان، e_{ijk} = اثر خطای آزمایش. مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ انجام شد (Duncan, 1955). داده‌ها به صورت میانگین ±خطای استاندارد میانگین[11] گزارش شدند.

نتایج و بحث

روی نقش مهمی در تولید اسپرم، زنده‌مانی و جلوگیری از آسیب‌های غشایی و حفظ یکپارچگی غشای اسپرم بازی می‌کند (Roy و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج مربوط به عملکرد تولید مثلی با تغذیه منابع مختلف روی بر شاخص‌هایی نظیر حجم انزال، غلظت اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، سلامت غشاء اسپرم و خصوصیات حرکتی اسپرم‌ها در جدول۲ و ۳ نشان داده شده است. در این پژوهش تغذیه مکمل روی سبب افزایش حجم انزال ($P = 0.001$)، غلظت اسپرم ($P = 0.004$)، زنده‌مانی ($P \leq 0.003$)، یکپارچگی

1. Curvilinear velocity
2. Straight-line velocity
3. Amplitude of lateral head displacement
4. Beat cross frequency
5. Straightness
6. Linearity

7. Completely randomized design
8. SAS
9. GLM
10. Mixed
11. Standard error of mean (SEM)

PROOF

غشای اسپرم ($P = 0.021$) و برخی از خصوصیات حرکتی اسپرم شد ($P \leq 0.05$). همچنین افزودن مکمل روی سبب بهبود ناهنجاری کل اسپرم ($P = 0.002$)، کاهش تعداد اسپرم با سر غیرطبیعی ($P = 0.001$) و کاهش اسپرم با دم غیرطبیعی ($P = 0.001$) شد. تفاوت معنی‌داری میان خصوصیات کمی، کیفی و حرکتی اسپرم میان انواع مکمل‌های تغذیه شده (سولفات روی، روی-متیونین، نانوذرات روی) مشاهده نشد ($P > 0.05$).

در این پژوهش حجم انزال، تعداد اسپرم در هر انزال، غلظت اسپرم با مصرف مکمل روی افزایش یافت که این نتایج سازگار با مطالعات انجام شده در گاوهای نر (Kumar و همکاران، ۲۰۰٦)، نژادهای مختلف بز (Rahman و همکاران، ۲۰۱٤؛ Hernández-Meléndez و همکاران، ۲۰۱۵؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸؛ Liu و همکاران، ۲۰۲۰) و قوچ (Kendall و همکاران، ۲۰۰۰؛ Abaspour Aporvari و همکاران، ۲۰۱۸) می‌باشد. هرچند در این پژوهش نوع مکمل روی تفاوت معنی‌داری میان صفات مذکور ایجاد نکرد. همسو با نتایج حاضر تغذیه نانو ذرات روی در موش‌های دیابتی سبب افزایش تعداد اسپرم و خصوصیات حرکتی شد که علت آن را مرتبط با افزایش غلظت و بیان ژن آنزیم‌های آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش غلظت مالونیل‌دی‌آلدئید دانستند (Afifi و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهشی دیگر تغذیه دو سطح ٤۰ و ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از نانوذرات روی به جیره‌پایه قوچ‌های نژاد عربی که دارای حدود ۱۸ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بود سبب افزایش حجم انزال، غلظت اسپرم، جنبایی، زنده‌مانی و سلامت غشای اسپرم شد و همچنین سبب کاهش تعداد اسپرم با ریخت‌شناسی غیرطبیعی گردید (Abaspour Aporvari و همکاران، ۲۰۱۸) ناهمسو با نتایج حاضر تغذیه سطوح بالای نانوذرات روی (۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) سبب کاهش جدی غلظت اسپرم شد اما تغذیه مقدار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم از نانوذرات روی تأثیر معنی‌داری بر غلظت اسپرم حیوانات مورد آزمایش از خود نشان نداد (Talebi و همکاران، ۲۰۱۳). از جمله عوامل مؤثر بر حجم انزال، تعداد اسپرم در هر انزال، غلظت اسپرم می‌توان به مدت زمان تغذیه مکمل روی در فصل تولید مثلی اشاره نمود (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). میانگین مدت زمان لازم برای تولید اسپرم در بز حدود ٤۷/۷ روز می‌باشد که معادل با ٤/۵ چرخه اپیتلیومی در لوله‌های اسپرم ساز (چال) محسوب می‌شود (França و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین این آزمایش به‌نحوی طراحی شد که یک چرخه کامل تولید اسپرم در بیضه‌های بز را پوشش دهد. بنابراین با توجه به نیاز بالای روی برای فرایند تولید اسپرم و رشد و توسعه و حفظ یکپارچگی لوله‌های اسپرم ساز در بیضه‌ها نسبت به سایر نیازهای مرتبط با رشد سایر اندام‌های بدن، احتمالاً همین عوامل سبب تأثیر منابع مختلف روی بر حجم انزال، غلظت اسپرم و متعاقباً تعداد اسپرم در هر انزال شده است (Saaranen و همکاران، ۱۹۸۷؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸).

مصرف مکمل روی صرف نظر از نوع آن، سبب افزایش معنی‌دار زنده‌مانی اسپرم شد ($P \leq 0.05$). نتیجه این پژوهش با نتایج سایر پژوهش‌ها در بز (Rahman و همکاران، ۲۰۱٤؛ Hernández-Meléndez و همکاران، ۲۰۱۵؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸) قوچ (Abaspour Aporvari و همکاران، ۲۰۱۸) و گاو نر (Kumar و همکاران، ۲۰۰٦) که افزایش درصد اسپرم‌های زنده را با مصرف انواع

PROOF

مکمل روی گزارش کردند، مطابقت دارد. بااین‌حال، میان انواع مکمل‌های روی تفاوت معنی‌داری بر زنده‌مانی اسپرم مشاهده نشد. احتمالاً افزایش زنده‌مانی اسپرم در تیمارهای تغذیه شده با مکمل روی مرتبط با اثر حفاظتی آن در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸) . علاوه بر این، به‌دلیل خصوصیات متالوآنزیمی روی، این عنصر در بسیاری از فعالیت‌های آنزیمی ایفای نقش نموده و همین امر سبب تأثیر بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود. روی از طریق بهبود پایداری لیزوزوم‌ها، ریبوزوم‌ها، ریبونوکلئیک اسید و دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید سبب افزایش زنده‌مانی عملکرد اسپرم می‌شود (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Bettger و همکاران، ۱۹۸۱).

در پژوهش حاضر درصد سلامت غشای اسپرم در تیمارهای تغذیه شده با انواع مکمل روی نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت ($P \leq ۰/۰۵$). همسو با نتایج حاضر، افزودن مقادیر ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم در کیلوگرم روی آلی به جیره غذایی بزها سبب بهبود سلامت غشای اسپرم و افزایش درصد یکپارچگی آکروزوم اسپرم شد (Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸). همچنین در پژوهشی دیگر استفاده از سه سطح ۲۰، ٤٠ و ٦٠ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل روی آلی سبب بهبود سلامت غشای اسپرم در بز شد (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). در پژوهشی دیگر تغذیه مکمل روی در دو نوع آلی (روی پروپیونات) و معدنی (سولفات روی) سبب بهبود سلامت غشای اسپرم در گاوهای نر شد (Kumar و همکاران، ۲۰۰٦). مقدار روی به‌طور ویژه‌ای در قسمت‌های مختلف غشای اسپرم و لیپوپروتئین‌های سلول اسپرم بالا می‌باشد که همین امر سبب حفظ پایداری غشا می‌شود؛ علاوه بر این از طریق واکنش با گروه‌های سولفودریل موجود در پروتئین‌های غشای سلولی، ساختاری پایدار را ایجاد نموده که اکسیداسیون لیپیدها را با مهار فسفولیپازها متوقف کرده و منجر به پایداری غشای اسپرم می‌گردد (Bettger و همکاران، ۱۹۸۱). ترشحات غدد ضمیمه دستگاه تولید مثلی جنس نر به‌منظور حفظ خاصیت بافری محیط و محافظت ساختارهای سلولی و تثبیت خاصیت ارتجاعی سلول‌های اسپرم، حاوی ترکیبی از پروتئین‌ها می‌باشد (Patricio و همکاران، ۲۰۱٦). بنابراین احتمالاً تغذیه مکمل روی سبب بهبود ترشحات غدد ضمیمه‌ای جنسی شده و در نتیجه سبب ارتقای پایداری ساختار اسپرم‌ها شده است (Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸).

PROOF

جدول۲- اثر مکمل نمودن جیره با منابع مختلف روی بر خصوصیات منی در بزهای نر مورسیا

Table 2- Effect of dietary supplementation with different sources of zinc on sperm semen characteristics in Murciana bucks

سطح معنی‌داری P-value	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	تیمارها Treatments				فراسنجه‌ها Items
		نانوذرات روی nano-Zn	روی-متیونین Zn-Met	سولفات روی $ZnSO_4$	شاهد Control	
0.001	0.057	1.41 [a]	1.52 [a]	1.44 [a]	1.02 [b]	حجم انزال (میلی‌لیتر) Ejaculate volume (mL)
0.004	0.102	2.17 [a]	2.36 [a]	2.25 [a]	1.82 [b]	غلظت اسپرم (10^9 میلی‌لیتر) Sperm concentration (10^9/mL)
0.001	0.188	3.07 [a]	3.57 [a]	3.25 [a]	1.87 [b]	کل اسپرم تولید شده (10^9 میلی‌لیتر) Total sperm production (10^9 mL^{-1})
0.003	2.130	86.32 [a]	84.44 [a]	85.62 [a]	75.56 [b]	زنده‌مانی اسپرم (درصد) Viability (%)
0.021	3.238	87.93 [a]	84.81 [a]	83.70 [a]	73.62 [b]	سلامت غشای اسپرم (درصد) Membrane integrity (%)

۱- حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش در رابطه با ویژگی‌های حرکتی اسپرم نشان داد مصرف روی سبب بهبود جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده و سرعت در مسیر مستقیم می‌شود (جدول ۳). هرچند که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری میان ویژگی‌های حرکتی در تیمارهای تغذیه شده با انواع مکمل روی مشاهده نشد. همسو با این نتایج، مکمل نمودن روی آلی در جیره غذایی گاوهای نر آمیخته، سبب بهبود خصوصیات حرکتی اسپرم نسبت به تیمارهای تغذیه شده با روی غیرآلی بود (Kumar و همکاران، ۲۰۰٦؛ Geary و همکاران، ۲۰۱٦). در پژوهش‌های دیگری که در آن‌ها از مکمل آلی روی به مقدار ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم در کیلوگرم استفاده شده بود نیز خصوصیات حرکتی اسپرم بزها بهبود یافت (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸). جنایی اسپرم را مقدار آدنوزین‌تری‌فسفات[1] در دسترس به‌عنوان منبع انرژی تعیین می‌کند؛ بر اساس گزارش‌های موجود، روی فرایند استفاده از انرژی را با سازوکارهای مرتبط با آدنوزین‌تری‌فسفات و تنظیم آنزیم‌های سوربیتول دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز که هردو برای جنبایی اسپرم ضروری محسوب می‌شوند، تحت تأثیر قرار می‌دهد (El-Masry و همکاران، ۱۹۹٤؛ Roy و همکاران، ۲۰۱۳). یافته‌های پژوهشگران نشان داد که روی در ساختار کروماتین، انقباض کروماتین و محل اتصال سر به دم اسپرم نیز مشارکت دارد (Björndahl و همکاران، ۱۹۸۲؛ Kvist و همکاران، ۱۹۸۷). علاوه بر این، روی جنبایی اسپرم بزها را با اثر گذاری بر توسعه فلاژلوم، تنظیم می‌کند، همچنین بر اساس برهمکنش روی با بخش لیپوپروتئین اسپرم، روی در تجزیه لیپیدها که منبع کلیدی انرژی مورد نیاز برای حرکت اسپرم است، نقش دارد (Saleh و همکاران، ۱۹۹٤؛ Liu و همکاران، ۲۰۲۰).

[1]. ATP

PROOF

جدول۳- اثر مکمل نمودن جیره با منابع مختلف روی بر خصوصیات حرکتی اسپرم در بزهای نر مورسیا

Table 3- Effect of dietary supplementation with different sources of zinc on sperm velocity characteristics in Murciana bucks

سطح معنی‌داری P-value	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	تیمارها Treatments				فراسنجه‌ها Items
		نانوذرات روی nano-Zn	روی-متیونین Zn-Met	سولفات روی $ZnSO_4$	شاهد Control	
0.004	2.171	82.18 [a]	80.22 [a]	78.62 [a]	70.80 [b]	تحرک کل (درصد) Total motility (%)
0.017	2.392	57.32 [a]	59.54 [a]	58.74 [a]	49.29 [b]	حرکت پیش‌رونده (درصد) Progressive motility (%)
0.962	3.962	74.18	76.11	77.15	75.68	خطی بودن تحرک (میکرومتر در ثانیه) Linearity ($\mu m\ s^{-1}$)
0.044	3.184	78.32 [a]	79.47 [a]	78.04 [a]	67.69 [b]	سرعت در مسیر مستقیم (میکرومتر در ثانیه) Straight-line velocity ($\mu m\ s^{-1}$)
0.041	9.626	124.44 [a]	126.58 [a]	123.14 [a]	91.22 [b]	سرعت در مسیر منحنی (میکرومتر در ثانیه) Curvilinear velocity ($\mu m\ s^{-1}$)
0.031	7.237	117.48 [a]	114.72 [a]	115.58 [a]	89.73 [b]	سرعت در مسیر میانگین (میکرومتر در ثانیه) Average path velocity ($\mu m\ s^{-1}$)
0.366	0.102	2.37	2.42	2.21	2.45	تحرک عرضی سر (میکرومتر در ثانیه) Amplitude of lateral head ($\mu m\ s^{-1}$)
0.876	2.232	83.25	84.25	84.88	85.78	راستی مسیر طی شده (میکرومتر در ثانیه) Straightness ($\mu m\ s^{-1}$)
0.019	1.038	6.73 [b]	6.57 [b]	6.38 [b]	10.57 [a]	تناوب عرضی زنش (هرتز) Beat cross frequency (Hz)

۱- حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

در این پژوهش افزودن مکمل روی سبب کاهش ناهنجاری کل، ناهنجاری سر و تنه اسپرم‌ها شد ($P \leq 0.05$) اما نوع مکمل روی (غیرآلی، آلی و نانو ذرات) تأثیری بر ریخت‌شناسی اسپرم (ناهنجاری سر، تنه و دم) بزهای مورد بررسی نداشت ($P > 0.05$). ناهمسو با نتایج این پژوهش تغذیه روی-پروپیونات و سولفات روی به جیره غذایی گاوهای نر آمیخته هیچ تأثیر معنی‌داری بر ریخت‌شناسی اسپرم نداشت (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین در پژوهشی دیگر افزودن سطوح مختلفی از سولفات روی به جیره غذایی بزهای نژاد کشمیر هیچ تأثیری بر ریخت‌شناسی اسپرم نداشت (Liu و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر این، نتایج مشابهی در بره‌های نر نژاد زندی با تغذیه ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی در دو نوع آلی و غیرآلی هیچ تفاوت معنی‌داری در بهبود ناهنجاری‌های مرتبط به ریخت‌شناسی اسپرم گزارش نکردند (Mousavi Esfiokhi و همکاران، ۲۰۲۳). همسو با نتایج پژوهش حاضر، افزودن روی به جیره بزهای نژاد عربی نشان داد که افزودن نانو ذرات روی به میزان ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سبب بهبود ناهنجاری‌های مرتبط با ریخت‌شناسی می‌شود (Abaspour Aporvari و همکاران، ۲۰۱۸). همچنین اخیراً کاهش ناهنجاری‌های مرتبط با ریخت‌شناسی اسپرم با افزودن روی به رقیق کننده مایع منی نیز گزارش شده است (Abedin و همکاران، ۲۰۲۳). ریخت‌شناسی طبیعی و غیرطبیعی اسپرم کاملاً وابسته به مرحله تولید اسپرم در تشکیل اسپرم مرتبط می‌باشد که این مراحل رشد و بلوغ اسپرم توسط سلول‌های سرتولی تنظیم و کنترل می‌شوند (Pineda و همکاران، ۲۰۰۳) بااین‌حال، در شرایط کمبود روی،

PROOF

عملکرد و ساختار سلول‌های سرتولی دچار تغییراتی می‌شوند (Sun و همکاران، ۲۰۲۳). علاوه بر این سلول‌های غشای پلاسمایی اسپرم نسبت به سلول‌های بدنی حاوی مقادیر فراوانی لیپید هستند که ساختاری منحصربفرد را به اسپرم می‌دهند؛ بنابراین پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سبب متلاشی شدن ماتریکس لیپیدی شده و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی را در پی دارد (Liu و همکاران، ۲۰۲۰). از آنجایی که در این پژوهش میزان یکپارچگی غشای اسپرم بهبود یافته است، بنابراین احتمالاً همین امر سبب کاهش ناهنجاری‌های مرتبط با ریخت‌شناسی سر و تنه اسپرم در بزهای تغذیه شده با مکمل روی شده است.

جدول٤- اثر مکمل نمودن جیره با منابع مختلف روی بر ریخت‌شناسی اسپرم در بزهای نر مورسیا

Table 4- Effect of dietary supplementation with different sources of zinc on morphological characteristics of sperm in Murciana bucks

سطح معنی‌داری P-value	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	تیمارها Treatments				فراسنجه‌ها Items
		نانوذرات روی nano-Zn	روی-متیونین Zn-Met	سولفات روی $ZnSO_4$	شاهد Control	
0.002	0.215	9.52 b	8.60 b	9.44 b	11.74 a	ناهنجاری کل (درصد) Total abnormality (%)
0.001	0.259	2.33 b	1.95 b	2.15 b	3.14 a	ناهنجاری سر (درصد) Abnormal head (%)
0.757	0.266	3.42	2.98	3.37	4.55	ناهنجاری تنه (درصد) Abnormal mid-piece (%)
0.001	0.145	3.77 b	3.67 b	3.92 b	4.05 a	ناهنجاری دم (درصد) Abnormal tail (%)

۱- حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

نتایج مربوط به غلظت پلاسمایی تستوسترون و عناصر کم‌مصرف آهن، روی و مس در تیمارهای مختلف در جدول ۵ ارائه شده است. غلظت پلاسمایی روی در تیمارهای تغذیه شده با انواع مکمل روی افزایش یافت که همسو با این نتایج، افزودن روی-متیونین و اکسید روی به جیره‌غذایی بزهای آنقوره سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی در همه تیمارهای آزمایشی تغذیه شده با سطوح مختلف عنصر روی شد (Puchala و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین در پژوهشی دیگر افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی به جیره‌غذایی گاوهای نر آمیخته، سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی پس از ٦۰ روز شد (Kumar و همکاران، ۲۰۱٤). علاوه بر این در پژوهشی دیگر پس افزودن مکمل روی غیرآلی به جیره غذایی بزهای نوبین پس از ٤۵ روز سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی شد (Hernández-Meléndez و همکاران، ۲۰۱۵). در دو مطالعه دیگر همسو با نتیجه این پژوهش، افزودن سولفات روی به مقدار ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره غذایی بزهای کشمیر سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی شد (Liu و همکاران، ۲۰۱۵؛ Liu و همکاران، ۲۰۲۰). در پژوهشی دیگر که تغذیه ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی آلی تأثیری بر غلظت پلاسمای روی نداشت اما در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر ٤۰ و ٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی آلی، پس از گذشت ٦۰ روز میزان غلظت روی در پلاسما افزایش یافت اما در روز ۲٤۰ آزمایش غلظت پلاسمایی روی در همه تیمارهای یکسان گزارش گردید (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). غلظت

PROOF

سرمی یا پلاسمایی روی به‌عنوان شاخص وضعیت روی در بدن محسوب می‌شود به‌طوری که مطابق با تحقیقات انجام شده در این خصوص، معمولاً غلظت روی در خون به افزودن مکمل روی (به‌ویژه در حیواناتی که دچار کمبود حاشیه‌ای یا شدید روی هستند) پاسخ مثبت می‌دهد (Suttle، ۲۰۱۰؛ Wieringa و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین با توجه به غلظت پلاسمایی روی در بزهای مورد آزمایش که نشانگر کمبود حاشیه‌ای این عنصر در تیمار شاهد می‌باشد، افزودن مکمل روی به جیره‌ها سبب افزایش غلظت پلاسمایی این عنصر به ویژه در تیمارهای تغذیه شده با روی-متیونین شده است که علت آن‌را می‌توان با بیشتر بودن زیست‌فراهمی آن نسبت به نوع غیرآلی این عنصر مرتبط دانست.

همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، غلظت پلاسمایی تستوسترون در بزهای تغذیه شده با انواع مکمل روی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P \leq 0.05$). نتایج این پژوهش با سایر مطالعات پیشین انجام شده در گاو نر و انواع نژاد بز سازگاری دارد (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۵؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Mousavi Esfiokhi و همکاران، ۲۰۲۳). غلظت تستوسترون در میان انواع نژادهای بز بین ۰/۵ الی ۷/۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Venkata Krishnaiah و همکاران، ۲۰۱۹؛ Mousavi Esfiokhi و همکاران، ۲۰۲۳). تحقیقات قبلی نشان داد که سطح تستوسترون در پاسخ به مکمل روی وابسته به دز بوده و به تدریج در طول زمان افزایش می‌یابد (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). مدت زمان تغذیه روی و سطح غلظت روی در جیره پایه از مهم‌ترین عوامل موثر بر غلظت تستوسترون در خون محسوب می‌شوند زیرا تغذیه مواد معدنی کم‌مصرف به ویژه روی با افزایش تدریجی هورمون تستوسترون مرتبط است (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، احتمالاً مقدار روی در جیره پایه (۱۹/۹۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) برای سنتر مقادیر کافی تستوسترون در تیمار شاهد ناکافی بوده است. همچنین به‌نظر می‌رسد تغذیه مکمل روی به مدت ۳۰ روز برای تأثیر بر تولید و ترشح مقادیر کافی از تستوسترون مناسب بوده است.

PROOF

جدول۵- اثر مکمل نمودن جیره با منابع مختلف روی بر غلظت پلاسمایی تستوسترون برخی از مواد معدنی کم‌مصرف در بزهای نر مورسیا

Table 5- Effect of dietary supplementation with different sources of zinc on plasma testosterone and some trace mineral concentrations in Murciana bucks

تیمارها Treatments	فراسنجه‌ها Items			
	تستوسترون (نانوگرم در میلی‌لیتر) Testosterone (ng mL^{-1})	روی (میلی‌گرم در کیلوگرم) Zn (mg kg^{-1})	مس (میلی‌گرم در کیلوگرم) Cu (mg kg^{-1})	آهن (میلی‌گرم در کیلوگرم) Fe (mg kg^{-1})
شاهد Control	4.83 [b]	0.94 [b]	1.12	1.08
سولفات روی $ZnSO_4$	6.07 [a]	1.32 [a]	1.05	1.12
روی-متیونین Zn-Met	6.32 [a]	1.35 [a]	1.04	1.09
نانو ذرات روی nano-Zn	5.89 [a]	1.30 [a]	1.12	1.12
میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	0.151	0.029	0.043	0.065
روز Day				
30	5.70	1.22	1.03	1.11
60	5.85	1.23	1.02	1.09
میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	0.107	0.021	0.030	0.046
سطح معنی‌داری P-value				
تیمار Treatment	0.001	0.001	0.518	0.972
روز Day	0.319	0.651	0.849	0.779
تیمار × روز Treatment × Day	0.992	0.736	0.893	0.931

۱- حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

در شرایط کمبود حاشیه‌ای روی در دام‌ها، انواع مکمل روی از گوارش‌پذیری و قابلیت جذب بالایی برخوردار می‌باشند که همین امر اثرات مثبت انواع مکمل‌های روی را در پی دارد (ساتل، ۲۰۱۰)؛ اما هنگامی که کمبود حاشیه‌ای روی در حیوان به دلیل وجود ترکیبات آنتاگونیست رخ می‌دهد، احتمالاً نوع مکمل روی اثر بخشی متفاوتی خواهد داشت.

نتیجه‌گیری کلی

خصوصیات کمی (حجم انزال، غلظت اسپرم، تعداد اسپرم) و کیفی (زنده‌مانی، جنبایی، یکپارگی آکروزوم و ریخت‌شناسی) اسپرم در بزهای نر مورسیا با تغذیه انواع مکمل روی شامل آلی، غیرآلی و نانو ذرات بهبود یافت که به نظر می‌رسد افزودن مکمل روی صرف نظر از نوع آن در جیره غذایی، سبب افزایش عملکرد تولید مثلی بزهای نر و نیز منجر به افزایش بازدهی اقتصادی گله شود.

PROOF

منابع

Abaspour Aporvari, M. H., Mamoei, M., Tabatabaei Vakili, S., Zareei, M., & Dadashpour Davachi, N. (2018). The Effect of Oral Administration of Zinc Oxide Nanoparticles on Quantitative and Qualitative Properties of Arabic Ram Sperm and Some Antioxidant Parameters of Seminal Plasma in the Non-Breeding Season. *Arch Razi Inst*, 73(2), 121-129. https://doi.org/10.22092/ari.2018.120225.1187

Abedin, S. N., Baruah, A., Baruah, K. K., Bora, A., Dutta, D. J., Kadirvel, G., Deori, S. (2023). Zinc oxide and selenium nanoparticles can improve semen quality and heat shock protein expression in cryopreserved goat (Capra hircus) spermatozoa. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 80, 127296. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2023.127296

Afifi, M., Almaghrabi, O. A., & Kadasa, N. M. (2015). Ameliorative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Antioxidants and Sperm Characteristics in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testes. *BioMed Research International*, 2015, 153573. https://doi.org/10.1153573/2015/155

AOAC. (2006). Official Methods of Analysis (18 ed.). Association of Official Analytical Chemists .

Arangasamy, A., Venkata Krishnaiah, M., Manohar, N., Selvaraju, S., Guvvala, P. R., Soren, N. M., Ravindra, J. P. (2018). Advancement of puberty and enhancement of seminal characteristics by supplementation of trace minerals to bucks. *Theriogenology*, 110, 182-191. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.008

Arthington, J. D., Corah, L. R., & Hill, D. A .(2002) .The Effects of Dietary Zinc Concentration and Source on Yearling Bull Growth and Fertility11Contribution no. R-08583 from the Florida Agriculture Experiment Station. *The Professional Animal Scientist*, 18(3), 282-285. https://doi.org/https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31534-5

Bettger, W. J., & O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, 28(13), 1425-1438. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90374-X

Björndahl, L., & Kvist, U. (1982). Importance of zinc for human sperm head-tail connection. *Acta Physiol Scand*, 116(1), 51-55. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1982.tb10598.x

Dhoke, S. K. (2023). Synthesis of nano-ZnO by chemical method and its characterization. Results in Chemistry, 5, 100771.

Duncan, D. B. (1955). Multiple Range and Multiple F Tests. Biometrics, 11(1), 1-42 . https://doi.org/10.2307/3001478

El-Masry, K., Nasr, A., & Kamal, T. (1994). Influences of season and dietary supplementation with selenium and vitamin E or zinc on some blood constituents and semen quality of New Zealand White rabbit males. *World Rabbit Science*, 2 (3).

França, L. R., Becker-Silva, S. C., & Chiarini-Garcia, H. (1999). The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (Capra hircus). *Tissue and Cell*, 31(3), 274-280. https://doi.org/https://doi.org/10.1054/tice.1999.0044

Garg ,A. K., Mudgal, V., & Dass, R. S. (2008). Effect of organic zinc supplementation on growth, nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 144(1), 82-96. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.10.003

Geary, T. W., Kelly, W. L., Spickard, D. S., Larson, C. K., Grings, E. E., & Ansotegui, R. P. (2016). Effect of supplemental trace mineral level and form on peripubertal bulls. *Animal Reproduction Science*, 168, 1-9. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.018

Hernández-Meléndez, J., Salem, A. Z., Sánchez-Dávila, F., Rojo, R., Limas, A. G., López-Aguirre, D., & Vázquez-Armijo, J. F. (2015). Effect of copper and zinc supplementation on growth, blood serum copper and zinc levels, scrotal circumference and semen quality in growing male Boer× Nubian bucks. *Journal of Life Science*, 12, 108-112 .

Kendall, N. R., McMullen, S., Green, A., & Rodway, R. G. (2000). The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, 62(4), 277-283. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-

PROOF

4320(00)00120-2
Kumar, N., Verma, R. P., Singh, L. P., Varshney, V. P., & Dass, R. S. (2006). Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (Bos indicus x Bos taurus) bulls. *Reprod Nutr Dev*, 46(6), 663-675. https://doi.org/10.1051/rnd:2006041
Kumar, P., Yadav, B., & Yadav ,S. (2014). Effect of zinc and selenium supplementation on semen quality of Barbari bucks. *Indian Journal of Animal Research*, 48(4), 366-369. https://doi.org/10.5958/0976-0555.2014.00457.9
Kvist, U., Björndahl, L., & Kjellberg, S. (1987). Sperm nuclear zinc, chromatin stability, and male fertility. *Scanning Microsc*, 1(3), 1241-1247 .
Kvist, U., Kjellberg, S., Björndahl, L., Hammar, M., & Roomans, G. M. (1988). Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile men and men in barren unions. *Scand Journal Urol Nephrol*, 22(1), 1-6. https://doi.org/10.1080/00365599.1988.11690374
Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H., . . . Giwercman, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod*, 15(7), 1562-1567. https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562
Liu, H., Sun, Y., Zhao, J., Dong, W., & Yang, G. (2020). Effect of Zinc Supplementation on Semen Quality, Sperm Antioxidant Ability, and Seminal and Blood Plasma Mineral Profiles in Cashmere Goats. *Biol Trace Elem Res*, 196(2), 438-445. https://doi.org/10.1007/s12011-019-01933-x
Liu, H. Y., Sun, M. H., Yang, G. Q., Jia, C. L., Zhang, M., Zhu, Y. J & ,.Zhang, Y. (2015). Influence of different dietary zinc levels on cashmere growth, plasma testosterone level and zinc status in male Liaoning Cashmere goats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 99(5), 880-886. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpn.12292
Mekasha, Y., Tegegne, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2007). Effect of Supplementation with Agro-industrial By-products and Khat (Catha edulis) leftovers on testicular growth and sperm production in Ogaden bucks. *Journal of Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 54(3), 147-155. https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00876.x
Mousavi Esfiokhi, S. H., Norouzian, M. A., & Najafi, A. (2023). Effect of different sources of dietary zinc on sperm quality and oxidative parameters. *Front Vet Science*, 10, 11342 .٤٤ https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1134244
Narasimhaiah, M., Arunachalam, A., Sellappan, S., Mayasula, V., Guvvala, P., Ghosh, S., . . . Kumar, H. (2018). Organic zinc and copper supplementation on antioxidant protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), 644-654. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/rda.13154
NRC. (2007). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. *The National Academies Press*. https://doi.org/doi:10.17226/11654
Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. L. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research*, 112(1), 128-135. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.014
Patricio, A., Cruz, D. F., Silva, J. V., Padrão, A., Correia, B. R., Korrodi-Gregório, L., . . . Fardilha, M. (2016). Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells. *Acta Urológica Portuguesa*, 33(1), 6-15. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acup.2015.10.001
Pineda, M., & Dooley, M. (2003). Veterinary endocrinology and reproduction. Ed, 3, 218-223 .
Puchala, R., Sahlu, T., & Davis, J. (1999). Effects of zinc-methionine on performance of Angora goats. *Small Ruminant Research*, 33(1), 1-8 .
Rahman, H. U., Qureshi, M. S., & Khan, R. U. (2014). Influence of dietary zinc on semen traits and seminal plasma antioxidant enzymes and trace minerals of beetal bucks. *Reprod Domest Anim*, 49(6) ,1004-1007 .https://doi.org/10.1111/rda.12422
Raje, K., Ojha, S., Mishra, A., Munde, V., Chandrakanta, Rawat, & Chaudhary, S. K. (2018). Impact of supplementation of mineral nano particles on growth performance and health status of animals: A review .

PROOF

Rimbach, G., Walter, A., Most, E., & Pallauf, J. (1998). Effect of microbial phytase on zinc bioavailability and cadmium and lead accumulation in growing rats. *Food and Chemical Toxicology*, 36(1), 7-12. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0278-6918-00117(97)5

Rowe, M. P., Powell, J. G., Kegley, E. B., Lester, T. D., & Rorie, R. W. (2014). Effect of supplemental tracemineral source on bull semen quality. *The Professional Animal Scientist*, 30(1), 68-73. https://doi.org/https://doi.org/10.15232/S1081-30085(15)7446-0

Roy, B., Baghel, R. P. S., Mohanty, T. K., & Mondal, G. (2013). Zinc and Male Reproduction in Domestic Animals: A Review. *Indian journal of animal nutrition*, 30, 339-350 .

Saaranen, M., Suistomaa, U., Kantola, M., Saarikoski, S., & Vanha-Perttula, T. (1987). Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: comparison with semen parameters and fertility. *Human Reproduction*, 2(6), 475-479. http/doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136573

Saleh, S., Ibrahim, A., & Yousri, R .(1994). The effect of dietary zinc, season and breed on semen quality and body weight in goats. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. 25 (2) 5-12.

Sun, B., Ma, J., Te, L., Zuo, X., Liu, J., Li, Y., Wang, S. (2023). Zinc-Deficient Diet Causes Imbalance in Zinc Homeostasis and Impaired Autophagy and Impairs Semen Quality in Mice. *Biol Trace Elem Res*, 201(5), 2396-2406. https://doi.org/10.1007/s12011-022-03324-1

Suttle, N. F. (2010). Mineral Nutrition of Livestock. CABI. https://books.google.com/books?id=SRcEZVPbVRQC

Swanson, E. W., & Bearden, H .J. (1951). An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 10(4), 981-987. https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x

Talebi, A. R., Khorsandi, L., & Moridian, M. (2013). The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(9), 1203-1209. https://doi.org/10.1007/s10815-013-0078-y

Ukanwoko, A. I., Ironkwe, M. O., & Nmecha, C. (2013). Growth Performance and Hematological Characteristics of West African Dwarf Goats Fed Oil Palm Leaf Meal Cassava Peel Based Diets. *Journal of Animal Production Advances*, 3, 1-5 .

Underwood, E. J., & Somers, M. (1969). Studies of zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development ,and spermatogenesis in young rams. *Crop and Pasture Science*, 20, 889-897 .

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal Of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Venkata Krishnaiah, M., Arangasamy, A., Selvaraju, S., Guvvala, P. R., & Ramesh, K. (2019). Organic Zn and Cu interaction impact on sexual behaviour, semen characteristics, hormones and spermatozoal gene expression in bucks (Capra hircus). *Theriogenology*, 130, 130-139. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.026

Wieringa, F. T., Dijkhuizen, M. A., Fiorentino, M., Laillou, A., & Berger, J. (201 .(٥ Determination of zinc status in humans: which indicator should we use? *Nutrients*, 7(5), 3252-3263. https://doi.org/10.3390/nu7053252

Ziaeian, A. H., & Malakouti, M. J. (2001). Effects of Fe, Mn, Zn and Cu fertilization on the yield and grain quality of wheat in the calcareous soils of Iran. In W. J. Horst, M. K. Schenk, A. Bürkert, N. Claassen, H. Flessa, W. B. Frommer, H. Goldbach, H. W. Olfs, V. Römheld, B. Sattelmacher, U. Schmidhalter, S. Schubert, N. v. Wirén, & L. Wittenmayer (Eds.), Plant Nutrition: Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research (pp. 840-841). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-47624-X_409

PROOF