

Investigating the effect of different sources of zinc on reproductive performance and some blood parameters in mature Murciana bucks

Hamidreza Taghian^{1*}, Kian Sadeghi²

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: 02/17/2014
Revised: 04/13/2024
Accepted: 04/16/2024

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 every day. 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 used for a 60-day experiment in a completely randomized design (CRD) 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 mg kg^{-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 in each ejaculation was carried 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 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 CRD using the Proc GLM. Blood testosterone concentrations were analyzed as repeated measures in a CRD 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). Investigating the effect of different sources of zinc on reproductive performance and some blood parameters in mature Murciana bucks. *Journal of Ruminant Research*, 12(4) 59-78.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22206.1941

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

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

حمیدرضا تقیان^{۱*}، کیان صادقی^۲

^۱ گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hamidreza.taghian@ut.ac.ir

^۲ گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: kian.sadeghi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: بز به‌عنوان حیوانی چندمنظوره برای اقتصاد و تأمین مواد غذایی برای جوامع شهری و روستایی حائز اهمیت است. روی یکی از محدودکننده‌ترین مواد معدنی کم‌مصرف بوده که بایستی به‌صورت روزانه در جیره غذایی نشخوارکنندگان گنجانده شود. 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 همچنین سبب بهبود حفظ یکپارچگی غشای اسپرم می‌شوند. پژوهش‌های انجام‌شده 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 زیست‌فراهمی متفاوتی دارند و مطالعات اندکی پیرامون اثرات منابع مختلف روی بر خصوصیات تولیدمثلی بز نر وجود دارد، آزمایش حاضر به‌منظور بررسی اثر منابع مختلف روی بر عملکرد تولیدمثلی و برخی از فراسنجه‌های خون در بزهای نر بالغ مورسیا طراحی شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱/۲۸	مواد و روش‌ها: از ۴۰ رأس بز نر بالغ مورسیا (با میانگین سنی تقریباً ۱/۵ سال و میانگین وزن زنده $43 \pm 1/54$ کیلوگرم) به مدت 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 خلأ 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
واژه‌های کلیدی: بز مورسیا روی روی-متیونین سولفات روی نانوذرات روی	

واکاوی کامپیوتری به منظور ارزیابی خصوصیات حرکتی اسپرم مطابق با دستورالعمل‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پلاسمایی تستوسترون با استفاده از کیت‌های تجاری و از طریق دستگاه الیزا تعیین شدند. نمونه‌های پلاسما با اسیدکلریدریک 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 به صورت اندازه‌های تکرار شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه ترکیب‌شده 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 ($P \leq 0/05$). همچنین تفاوت معنی‌داری میان خصوصیات کمی، کیفی، حرکتی و ریخت‌شناسی اسپرم میان انواع مکمل‌های تغذیه‌شده (سولفات روی، روی-متیونین، نانوذرات روی) مشاهده نشد ($P > 0/05$). غلظت پلاسمایی روی و تستوسترون در تیمارهای تغذیه‌شده با انواع مکمل روی نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت ($P \leq 0/05$) اما میان غلظت پلاسمایی مس و آهن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: تغذیه انواع مکمل روی (آلی، غیرآلی و نانو ذرات) سبب بهبود عملکرد تولیدمثلی بزهای نر موریسیا 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 تولیدمثلی و مدیریت هزینه خوراک از سولفات روی در جیره‌های غذایی استفاده شود.

استناد: تقیان، حمیدرضا؛ صادقی، کیان. (۱۴۰۳). بررسی اثر منابع مختلف روی بر عملکرد تولیدمثلی و برخی از فراسنجه‌های خونی در بزهای نر بالغ موریسیا. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۲(۴)، ۷۸-۵۹.

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22206.1941

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



© نویسندگان.

مقدمه

بز به عنوان حیوانی چندمنظوره برای اقتصاد و تأمین مواد غذایی برای جوامع شهری و روستایی حائز اهمیت می باشد. پرورش و نگهداری این حیوان در مناطق با خاک فقیر، بارندگی کم و پوشش گیاهی فصلی نیز امکان پذیر است (Ukanwoko و همکاران، ۲۰۱۳). جمعیت روستایی ایران تا حد زیادی به پرورش بز برای گذران زندگی خود وابسته می باشند. علاوه بر اینکه گوشت و شیر بز جزو منابع پروتئینی ضروری محسوب می شوند، بهبود تولیدمثل در این حیوان سبب افزایش تعداد بزغاله های متولدشده و متعاقباً سبب بهبود اقتصادی خواهد شد.

روی یکی از محدودکننده ترین عناصر در تغذیه دامها است و از آنجا که بدن نمی تواند مقدار زیادی از آن را ذخیره کند، لذا باید به صورت روزانه در جیره غذایی دامها گنجانده شود (Suttle، ۲۰۱۰). روی نقش مهمی در تولیدمثل نشخوارکنندگان بازی می کند و برای حفظ و پیشرفت فرآیند اسپرم سازی و تنظیم جنبایی اسپرمها، رشد بیضه ها، بلوغ اسپرم و ساخت تستوسترون ضروری است (Liu و همکاران، ۲۰۲۰). رابطه بسیار قوی بین روی و اسپرم سازی وجود دارد و بخش های مختلف دستگاه تولیدمثلی حیوان نر و همچنین مایع منی آن دارای مقادیر بالایی از عنصر روی است (Liu و همکاران، ۲۰۱۵). کمبود روی باعث اختلال در عملکرد فعالیت غدد جنسی، کاهش حجم بیضه ها، ظهور نامناسب صفات جنسی ثانویه و تحلیل لوله های اسپرم ساز می شود (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 می کند (El-Masry و همکاران، ۱۹۹۴). بین غلظت پلاسمایی عنصر روی و تستوسترون پلاسمای ارتباط معنی داری وجود دارد و

پیشنهاد شده است که تأمین مقادیر کافی روی برای عملکرد اسپرم ضروری می باشد (Liu و همکاران، ۲۰۲۰).

روی برای آغاز و حفظ فرآیند تولید اسپرم در بز ضروری محسوب می شود (Rahman و همکاران، ۲۰۱۴؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸) به طوری که افزودن روی به جیره غذایی بزهای جوان سبب افزایش تولید اسپرم می شود (Underwood و Somers، ۱۹۶۹؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸؛ Liu و همکاران، ۲۰۲۰). تغذیه مکمل روی سبب کاهش تشکیل اسپرم های غیرطبیعی می شود (Roy و همکاران، ۲۰۱۳) در حالی که مصرف ناکافی روی می تواند 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 می شوند (Arthington و همکاران، ۲۰۰۲؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Rowe و همکاران، ۲۰۱۴).

تحقیقات نشان داده اند که استفاده از مکمل های آلی و یا نانو ذرات روی در مقایسه با مکمل های معدنی سبب پایداری غشای اسپرم و کاهش آسیب های اکسیداتیو در بز می شود (Roy و همکاران، ۲۰۱۳؛ Rahman و همکاران، ۲۰۱۴؛ Raju و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸) و همچنین سبب بهبود حفظ یکپارچگی غشای اسپرم می گردد (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعات انجام شده در انسان، موش صحرائی، سگ، گاو و بز نشان دادند که کیلات روی بر حفظ، پایداری، جنبایی و اتصال سر به دم اسپرماتوزوا مؤثر است (Kvist و

همکاران، ۱۹۸۸؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰۶؛ Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). با توجه به اینکه خاک‌های مناطق مختلف ایران دارای کمبود روی بوده و خوراک‌های دامی به‌دست‌آمده نیز دارای کمبود روی می‌باشند (Ziaean و همکاران، ۲۰۰۱)، جیره غذایی دام‌ها نیازمند مکمل روی است. همچنین از آنجاکه منابع مختلف روی زیست‌فراهمی متفاوتی دارند و مطالعات اندکی پیرامون اثرات منابع مختلف روی بر خصوصیات تولیدمثلی بز نر وجود دارد، آزمایش حاضر به منظور بررسی اثر مکمل سازی جیره با منابع مختلف روی بر خصوصیات کمی و کیفی منی، غلظت پلاسمایی تستوسترون و برخی از مواد معدنی کم‌مصرف در بزهای نر بالغ موریسیا طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مجموعه بز داری صنعتی شرکت مگسال واقع در شهرستان آبیگ قزوین و در فصل تولیدمثلی سال ۱۴۰۲ انجام شد. چهل رأس بز نر بالغ موریسیا (با میانگین سنی تقریباً ۱/۵ سال و میانگین وزن زنده $1/54 \pm 43$ کیلوگرم) که از سلامتی عمومی مناسبی برخوردار بودند در جایگاه‌های انفرادی مقید و به مدت ۶۰ روز در قالب طرح کاملاً تصادفی مورداستفاده قرار گرفتند. بزهای مورد آزمایش بر اساس میانگین وزن بدن به‌طور تصادفی در چهار تیمار آزمایشی و ۱۰ تکرار (جمعاً ۴۰ رأس)، گروه‌بندی شدند: (۱) جیره پایه (دارای ۱۹/۹۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی بدون مکمل)، (۲) جیره پایه دارای ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی، (۳) جیره پایه دارای ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم روی-متیونین، (۴) جیره پایه دارای ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات روی. جیره‌های آزمایشی و ترکیبات شیمیایی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. تمام جیره‌های آزمایشی

به نحوی متعادل شدند که ضمن یکسان بودن میزان پروتئین و انرژی، احتیاجات مواد مغذی موردنیاز بزها را مطابق توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات فراهم می‌نمودند (NRC، ۲۰۰۷). تمام جیره‌های غذایی به‌طور روزانه تهیه و به‌صورت کاملاً مخلوط‌شده در دو وعده صبح (ساعت ۸:۰۰) و عصر (ساعت ۱۶:۰۰) در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت و همچنین دسترسی آزاد به آب تازه نیز وجود داشت. در این آزمایش از سولفات روی با خلوص ۳۵ درصد بدون آب (شرکت دامیار جامع، تهران، ایران)، روی-متیونین آلی با خلوص ۵ درصد (شرکت دانش بنیان آریانا، مشهد، ایران)، نانو ذرات روی با خلوص ۹۵ درصد تهیه‌شده در آزمایشگاه تغذیه دانشگاه تهران، کرج مطابق با روش Dhoke (۲۰۲۳) استفاده شد. با توجه به توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات بزهای نر با میانگین وزن بدن ۴۰ کیلوگرم، مقدار ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک به روی نیاز دارند؛ بنابراین با توجه به مقدار روی موجود در جیره پایه و با در نظر گرفتن میزان گوارش‌پذیری، ضریب جذب (۶۰ الی ۷۰ درصد) و احتمال وجود ترکیبات آنتاگونیست (NRC، ۲۰۰۷)، مقدار ۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل روی بر اساس ماده خشک مصرفی برای هر رأس در نظر گرفته شد. مکمل‌های روی ابتدا با مقداری از جو آسیاب شده مخلوط و سپس به صورت سرک به خوراک وعده صبح اضافه می‌گردید (بر اساس ماده خشک مصرفی روزانه).

جمع آوری نمونه‌ها

قبل از شروع آزمایش، عملیات وزن‌کشی انجام و بر همین اساس بزها در تیمارهای مختلف به‌صورت تصادفی گروه‌بندی شدند. نمونه‌گیری از علوفه‌ها جهت تعیین ماده خشک و تنظیم مقدار خوراک مصرفی به صورت هفتگی انجام شد. قبل از شروع

تری 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^۱، توسط یک فرد متخصص پس از رقیق‌سازی منی به نسبت ۱ به ۲۰۰ با آب مقطر از طریق میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر تعیین و غلظت‌ها بر اساس 10^9 / 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 ال‌ایکس ۴۰۰، فریمونت، ایالات متحده آمریکا) در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر 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^۲ (شامل ۰/۹ گرم فروکتوز، ۰/۴۹ گرم سدیم سترات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر با فشار اسمزی ۱۲۵ mOsm kg^{-1}) مخلوط و به مدت 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^۳ (لابومد ال‌ایکس ۴۰۰، فریمونت، ایالات متحده آمریکا) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر شمارش شد. دم اسپرم‌های با غشای سالم در

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 یک‌یک 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 ۶۰ آزمایش حدود ۳ ساعت پس از مصرف خوراک با استفاده از لوله‌های تحت خلأ حاوی ماده ضد انعقاد خون از سیاهرگ گردنی انجام شد. نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند و سپس پلاسماهای به‌دست‌آمده در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

آنالیز نمونه‌ها: آنالیز شیمیایی نمونه‌های مربوط به خوراک پس از خشک نمودن از طریق آون در دمای ۶۰ درجه سلسیوس (به مدت 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 (کجدال اتوماتیک) و چربی خام (سوکسله) انجام شد (AOAC، ۲۰۰۶). به‌منظور تعیین الیاف نامحلول در شوینده خشی 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، ۲۰۰۶).

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

در رابطه فوق NDF، الیاف نامحلول در شوینده خشی؛ CP، پروتئین خام؛ Ash، خاکستر خام؛ EE، عصار

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

به منظور ارزیابی خصوصیات حرکتی اسپرم مطابق با دستورالعمل‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت (Larsen و همکاران، ۲۰۰۰).

واکنش با این آزمایش گره می‌خورد (پدیده‌ای که در آن دم پیچ خورده یا خم می‌شد) اما دم اسپرم‌های با غشای آسیب‌دیده به صورت صاف باقی می‌ماند. از سیستم واکاوی کامپیوتری (ویدئو تست اسپرم ۲.۱)

جدول ۱- ارقام جیره و ترکیب مواد مغذی جیره پایه (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
60.0	Alfalfa hay	یونجه خشک
4.0	Wheat straw	کاه گندم
14.0	Barley grain	دانه جو
14.0	Corn grain	دانه ذرت
6.0	Soybean meal	کنجاله سویا
2.0	Wheat straw	سبوس گندم
Nutrient composition		ترکیب مواد مغذی
89.90	Dry matter (%)	ماده خشک (درصد)
81.61	Organic matter (%)	ماده آلی (درصد)
14.43	Crude protein (%)	پروتئین خام (درصد)
8.29	Ash (%)	خاکستر خام (درصد)
2.76	Ether extract (%)	عصاره اتری (درصد)
42.32	Neutral detergent fiber (%)	فیبر نامحلول در شوینده خنثی (درصد)
32.19	Non-fiber carbohydrates (%)	کربوهیدرات‌های غیر فیبری (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 (مگا کالری در کیلوگرم)

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

ناحیه مختلف هر اسلاید تصویربرداری انجام و تجزیه و تحلیل شد (حداقل ۵۰۰ اسپرم). فراسنجه‌های حرکتی مورد نظر شامل جنبایی کل^۱، جنبایی پیش‌رونده^۲، سرعت در مسیر میانگین^۳، سرعت در

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

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

در آزمایش به‌عنوان نتایج نهایی مورد استفاده قرار گرفت و صفات کیفی و کمی از طریق مدل آماری طرح کاملاً تصادفی^۷ به روش آنالیز واریانس و با استفاده از نرم‌افزار آماری سس^۸ (نسخه ۹.۱) و رویه جی‌ال‌ام^۹ و مدل آماری زیر آنالیز گردید.

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

غلظت عناصر معدنی و تستوسترون پلازما به‌صورت اندازه‌های تکرار شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه ترکیب شده^{۱۰} 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} = کواریت متغیر، $Time_j$ = اثر زمان، $T_i \times Time_j$ = 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 به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین^{۱۱} 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 تولیدمثلی با تغذیه منابع مختلف روی بر شاخص‌هایی نظیر حجم انزال، غلظت اسپرم، زنده‌مانی اسپرم، سلامت غشاء اسپرم و خصوصیات حرکتی اسپرم‌ها در جدول ۲ 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

مسیر منحنی^۱، سرعت در مسیر مستقیم^۲، جنبایی عرضی سر^۳، تناوب عرضی زئش^۴، راستی مسیر طی شده^۵ و خطی بودن جنبایی^۶ 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 الیزا ریدر (بی تی ۱۵۰۰) آزمایشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران تعیین شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۲۵ میکرولیتر پلازما (دو تکرار به ازای هر نمونه) به ۵۰ میکرولیتر از محلول تستوسترون-آنزیم و ۵۰ میکرولیتر از محلول تستوسترون-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 به مدت 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 پلازما از طریق روش هضم تر با اسید کلریدریک 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

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

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

Abaspour Aporvari و همکاران، ۲۰۱۸) ناهمسو با نتایج حاضر تغذیه سطوح بالای نانوذرات روی (۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) سبب کاهش جدی غلظت اسپرم شد اما تغذیه مقدار ۵ میلی گرم در کیلوگرم از نانو ذرات روی تأثیر معنی داری 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 می توان به مدت زمان تغذیه مکمل روی در فصل تولیدمثلی اشاره نمود (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). میانگین مدت زمان لازم برای تولید اسپرم در بز حدود ۴۷/۷ روز می باشد که معادل با ۴/۵ چرخه اپیتلیومی در لوله های اسپرم ساز (چال) محسوب می شود (França و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین این آزمایش به نحوی طراحی شد که یک چرخه کامل تولید اسپرم در بیضه های بز را پوشش دهد. بنابراین با توجه به نیاز بالای روی برای فرایند تولید اسپرم و رشد و توسعه و حفظ یکپارچگی لوله های اسپرم ساز در بیضه ها نسبت به سایر نیازهای مرتبط با رشد سایر اندام های 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 معنی دار زنده ماننی اسپرم شد ($P \leq 0.05$). نتیجه این پژوهش با نتایج سایر پژوهش ها در بز (Rahman و همکاران، ۲۰۱۴؛ 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، ۲۰۰۶) که افزایش درصد اسپرم های زنده را با مصرف انواع

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 معنی داری میان خصوصیات کمی، کیفی و حرکتی اسپرم میان انواع مکمل های 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، ۲۰۰۶)، نژادهای مختلف بز (Rahman و همکاران، ۲۰۱۴؛ 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) می باشد. هرچند در این پژوهش نوع مکمل روی تفاوت معنی داری میان صفات مذکور ایجاد نکرد. همسو با نتایج حاضر تغذیه نانو ذرات روی در موش های دیابتی سبب افزایش تعداد اسپرم و خصوصیات حرکتی شد که علت آن را مرتبط با افزایش غلظت و بیان ژن آنزیم های آنزیم های نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاهش غلظت مالونیل دی آلدئید دانستند (Afifi و همکاران، ۲۰۱۵). در پژوهشی دیگر تغذیه دو سطح ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم از نانوذرات روی به جیره پایه قوچ های نژاد عربی که دارای حدود ۱۸ میلی گرم در کیلوگرم روی بود سبب افزایش حجم انزال، غلظت اسپرم، جنبایی، زنده ماننی و سلامت غشای اسپرم شد و همچنین سبب کاهش تعداد اسپرم با ریخت شناسی غیرطبیعی گردید

در پژوهش حاضر درصد سلامت غشای اسپرم در تیمارهای تغذیه شده با انواع مکمل روی نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت ($P \leq 0/05$). همسو با نتایج حاضر، افزودن مقادیر ۲۰ و ۴۰ میلی گرم 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، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم 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، ۲۰۰۶).

مکمل روی گزارش کردند، مطابقت دارد. با این حال، میان انواع مکمل های روی تفاوت معنی داری بر زنده ماننی اسپرم مشاهده نشد. احتمالاً افزایش زنده ماننی اسپرم در تیمارهای تغذیه شده با مکمل روی مرتبط با اثر حفاظتی آن در برابر آسیب های اکسیداتیو می باشد (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). علاوه بر این، به دلیل خصوصیات متالوآنزیمی روی، این عنصر در بسیاری از فعالیت های آنزیمی ایفای نقش نموده و همین امر سبب تأثیر بر متابولیسم کربوهیدرات ها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها می شود. روی از طریق بهبود پایداری لیزوزوم ها، ریبوزوم ها، ریبونوکلیک اسید و دئوکسی ریبونوکلیک اسید سبب افزایش زنده ماننی عملکرد اسپرم می شود (Arangasamy و همکاران، Bettger و همکاران، ۱۹۸۱).

جدول ۲- 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 معنی داری P-value	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM	تیمارها Treatments				فراستجه ها 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 (میلی لیتر) Ejaculate volume (mL)
0.004	0.102	2.17 ^a	2.36 ^a	2.25 ^a	1.82 ^b	غلظت اسپرم (۱۰ ^۹ میلی لیتر) 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 (۱۰ ^۹ میلی لیتر) Total sperm production (10 ⁹ mL ⁻¹)
0.003	2.130	86.32 ^a	84.44 ^a	85.62 ^a	75.56 ^b	زنده ماننی 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 (%)

^{a-b}حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی دار در سطح خطای ۵ درصد می باشد.

^{a-b}Similar letters in each row indicate no significant difference at the 5% error level

سولفودرین موجود در پروتئین های غشای سلولی، ساختاری پایدار را ایجاد نموده که اکسیداسیون لیپیدها را با مهار فسفولیپازها متوقف کرده و منجر به پایداری غشای اسپرم می گردد (Bettger و همکاران، ۱۹۸۱).

مقدار روی به طور ویژه ای در قسمت های مختلف غشای اسپرم و لیپوپروتئین های سلول اسپرم بالا می باشد که همین امر سبب حفظ پایداری غشا می شود؛ علاوه بر این از طریق واکنش با گروه های

ترشحات غدد ضمیمه دستگاه تولیدمثلی جنس نر به منظور حفظ خاصیت بافبری محیط و محافظت ساختارهای سلولی و تثبیت خاصیت ارتجاعی سلول‌های اسپرم، حاوی ترکیبی از پروتئین‌ها می‌باشد (Patricio و همکاران، ۲۰۱۶)؛ 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).

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، ۲۰۰۶؛ Geary و همکاران، ۲۰۱۶). در پژوهش‌های دیگری که در آن‌ها از مکمل آلی روی به مقدار ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم استفاده شده بود نیز خصوصیات حرکتی اسپرم بزاها بهبود یافت (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸). جنبایی اسپرم را مقدار آدنوزین تری فسفات در دسترس به عنوان منبع انرژی تعیین می‌کند؛ بر اساس گزارش‌های موجود، روی فرایند استفاده از انرژی را با

سازوکارهای مرتبط با آدنوزین تری فسفات و تنظیم آنزیم‌های سوریتول دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز که هر دو برای جنبایی اسپرم ضروری محسوب می‌شوند، تحت تأثیر قرار می‌دهد (El-Masry و همکاران، ۱۹۹۴؛ 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 بزاها را با اثرگذاری بر توسعه فلاژلوم، تنظیم می‌کند، همچنین بر اساس برهمکنش روی با بخش لیوپروتئین اسپرم، روی در تجزیه لیپیدها که منبع کلیدی انرژی مورد نیاز برای حرکت اسپرم است، نقش دارد (Saleh و همکاران، ۱۹۹۴؛ Liu و همکاران، ۲۰۲۰).

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) بزه‌های 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 بزه‌های نژاد کشمیر هیچ تأثیری بر ریخت‌شناسی اسپرم نداشت (Liu و همکاران، ۲۰۲۰).

جدول ۳- 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

معنی داری	میانگین انحراف معیار	تیمارها				فراسنجه‌ها Items
		Treatments				
P- value	SEM	نانوذرات روی nano-Zn	روی-متوئین Zn-Met	سولفات روی ZnSO ₄	شاهد Control	
0.004	2.171	82.18 ^a	80.22 ^a	78.62 ^a	70.80 ^b	تحرك كل (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 تحرك (میکرومتر در ثانیه) Linearity ($\mu\text{m s}^{-1}$)
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 ($\mu\text{m s}^{-1}$)
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 ($\mu\text{m s}^{-1}$)
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 ($\mu\text{m s}^{-1}$)
0.366	0.102	2.37	2.42	2.21	2.45	تحرك عرضی سر (میکرومتر در ثانیه) Amplitude of lateral head ($\mu\text{m s}^{-1}$)
0.876	2.232	83.25	84.25	84.88	85.78	راستی مسیر طی شده (میکرومتر در ثانیه) Straightness ($\mu\text{m s}^{-1}$)
0.019	1.038	6.73 ^b	6.57 ^b	6.38 ^b	10.57 ^a	تناوب عرضی زنش (هرتز) Beat cross frequency (Hz)

^{a-b} حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

^{a-b} Similar letters in each row indicate no significant difference at the 5% error level

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) با این حال، در شرایط کمبود روی، 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 منحصربه‌فرد 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

علاوه بر این، نتایج مشابهی در بره‌های نر نژاد زندگی 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 رقیق‌کننده مایع منی نیز گزارش شده است (Abedin و همکاران، ۲۰۲۳). ریخت‌شناسی طبیعی و غیرطبیعی اسپرم کاملاً

کاهش ناهنجاری‌های مرتبط با ریخت‌شناسی سر و تنه اسپرم در بزهای تغذیه‌شده با مکمل روی شده است.

جدول ۴- 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	
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 (%)

^{a-b}حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

^{a-b}Similar letters in each row indicate no significant difference at the 5% error level

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 پلاسمایی روی نداشت اما در تیمارهای تغذیه‌شده با مقادیر ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی آلی، پس از گذشت ۶۰ روز میزان غلظت روی در پلازما افزایش یافت اما در روز ۲۴۰ آزمایش غلظت پلاسمایی روی در همه تیمارهای یکسان گزارش گردید (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸). غلظت سرمی یا پلاسمایی روی به‌عنوان شاخص وضعیت روی در بدن محسوب می‌شود به‌طوری‌که مطابق با تحقیقات انجام‌شده 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

نتایج مربوط به غلظت پلاسمایی تستوسترون و عناصر کم‌مصرف آهن، روی و مس در تیمارهای مختلف در جدول ۵ ارائه‌شده است. غلظت پلاسمایی روی در تیمارهای تغذیه‌شده با انواع مکمل روی افزایش یافت که همسو با این نتایج، افزودن روی-متیونین و اکسید روی به جیره غذایی بزهای آنقوره سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی در همه تیمارهای آزمایشی تغذیه‌شده با سطوح مختلف عنصر روی شد (Puchala و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین در پژوهشی دیگر افزودن ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات روی به جیره غذایی گاوهای نر آمیخته، سبب افزایش غلظت پلاسمایی روی پس از ۶۰ روز شد (Kumar و همکاران، ۲۰۱۴). علاوه بر این در پژوهشی دیگر پس افزودن مکمل روی غیرآلی به جیره غذایی بزهای نوبین پس از ۴۵ 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

Mousavi؛ ۲۰۱۸ و همکاران، Arangasamy؛ ۲۰۱۵ و 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، Venkata Krishnaiah؛ ۲۰۱۸ و همکاران، 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).

غلظت پلاسمایی این عنصر به ویژه در تیمارهای تغذیه شده با روی-متیونین شده است که علت آن را 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،

جدول ۵- 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

فراسنجه‌ها Items				
آهن (میلی‌گرم در کیلوگرم) Fe (mg kg ⁻¹)	مس (میلی‌گرم در کیلوگرم) Cu (mg kg ⁻¹)	روی (میلی‌گرم در کیلوگرم) Zn (mg kg ⁻¹)	تستوسترون (نانوگرم در میلی‌لیتر) Testosterone (ng mL ⁻¹)	تیمارها Treatments
1.08	1.12	0.94 ^b	4.83 ^b	شاهد Control
1.12	1.05	1.32 ^a	6.07 ^a	سولفات روی ZnSO ₄
1.09	1.04	1.35 ^a	6.32 ^a	روی-متیونین Zn-Met
1.12	1.12	1.30 ^a	5.89 ^a	نانو ذرات روی nano-Zn
0.065	0.043	0.029	0.151	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM
روز				
Day				
1.11	1.03	1.22	5.70	30
1.09	1.02	1.23	5.85	60
0.046	0.030	0.021	0.107	میانگین انحراف معیار استاندارد SEM
سطح معنی‌داری				
P-value				
0.972	0.518	0.001	0.001	تیمار Treatment
0.779	0.849	0.651	0.319	روز Day
0.931	0.893	0.736	0.992	تیمار × روز Treatment × Day

^{a-b}حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۵ درصد می‌باشد.

^{a-b}Similar letters in each row indicate no significant difference at the 5% error level

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 اثربخشی متفاوتی خواهد داشت.

نتیجه‌گیری کلی

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

مدت‌زمان تغذیه روی و سطح غلظت روی در جیره پایه از مهم‌ترین عوامل مؤثر 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 به‌دست‌آمده از این پژوهش، احتمالاً مقدار روی در جیره پایه (۱۹/۹۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) برای سنتز مقادیر کافی تستوسترون در تیمار شاهد ناکافی بوده است. همچنین به نظر می‌رسد تغذیه مکمل روی به مدت ۳۰ روز برای تأثیر بر تولید و ترشح مقادیر کافی از تستوسترون مناسب بوده است. در شرایط کمبود حاشیه‌ای روی در دام‌ها، انواع مکمل روی از گوارش‌پذیری و قابلیت جذب بالایی برخوردار می‌باشند که همین امر اثرات مثبت انواع

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. *Archives of Razi Institute*, 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 Fertility. Contribution 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](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](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/S0378-4320\(00\)00120-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(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. *Reproduction Nutrition Development*, 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. *Human Reproduction*, 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. *Biological Trace Element Research* 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. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 11342. <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/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/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/10.1016/j.acup.2015.10.001>
- Pineda, M., & Dooley, M. (2003). Veterinary endocrinology and reproduction. Ed, 3, 218-223 .
- Puchala, R., Sahl, 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. *Reproduction in Domestic Animals*, 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. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 1690-1694
- 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/10.1016/S0278-6918-00117\(97\)5](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/10.15232/S1081-30085\(15\)7446-0](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](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., Lailou, A., & Berger, J. (2015) Determination of zinc status in humans: which indicator should we use? *Nutrients*, 7(5), 3252-3263. <https://doi.org/10.3390/nu7053252>
- Ziaeiian, 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. Olf, V. Römhild, 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

