

Effect of organic and inorganic trace mineral supplements on Some quality parameters of Romanov ram sperm

Sayyed Mohammad Hadi Hussaini¹, Ahmad Zare Shahneh^{2*} 
Mahdi Zhandi², Kamran Rezayazdi²

¹ Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

² Department of Animal Science, faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Email: azareh@ut.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Full Paper	Background and Objectives: Sheep farming has seen significant growth in recent decades and plays an important role in improving economic and social activities in many countries. Since the number of rams in the herds is much lower than the number of ewes (approximately one ram to 30 to 50 ewes), and many ewes are getting pregnant using artificial insemination, improving and maintaining the quality of ram sperm enhances and preserves the overall fertility of the herd. It has been stated that trace minerals in most body cells act either as catalysts or as components of enzyme systems. Therefore, using these minerals in the diet can affect semen quality. Mineral supplements play an important role in proper spermatogenesis and improving sperm characteristics. Some studies have shown that organic trace minerals have higher bioavailability compared to the inorganic form and their stability is higher, which ultimately leads to greater effectiveness compared to the inorganic form. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of organic and inorganic trace mineral supplements on some quality parameters of <i>Romanov</i> ram sperm.
Article history: Received: 3/11/2024 Revised: 13/12/2024 Accepted: 25/12/2024	Materials and Methods: In the current study, 18 Romanov rams with an average weight of 57.5 ± 2.5 kg and an average age of 2.5 years were used. This study was conducted in a completely randomized design with three treatments and six replicates. Rams were randomly assigned to one of three following treatments: 1) Control, including a basal diet balanced with NRC; 2) Inorganic treatment, including the basal diet with a supplement of trace minerals in inorganic form (0.29 g of inorganic trace minerals per ram, daily, containing zinc sulfate, copper sulfate, manganese oxide, iron sulfate, sodium selenite, chromium oxide, and cobalt sulfate); and 3) Organic treatment, including the basal diet with a supplement of trace minerals based on advanced chelate compounds (0.7 g of BonzaPlex 7 per ram, daily, containing zinc, copper, manganese, iron, selenium, chromium, and cobalt) and they were fed for 90 days. Semen samples were collected from all rams on the 80th day of the experiment using an artificial vagina. After transferring the samples to the laboratory, sperm quality parameters (semen volume, sperm concentration, total motility, progressive motility, plasma
Keywords: Minerals Ram Sperm	

membrane integrity, plasma membrane functionality, and the percentage of abnormal sperm) were evaluated. Also, to examine serum catalase concentration, blood samples collected on day 80 of the experiment from the jugular vein of rams was used.

Results: The results of this study showed that semen volume, total motility, progressive motility, plasma membrane integrity and functionality as well as serum catalase were not affected by the treatments ($P>0.05$). Additionally, the findings indicated that sperm concentration in rams that received the organic trace mineral supplement was significantly higher compared to the control group ($P<0.05$), while there was no significant difference compared to the inorganic treatment ($P>0.05$). Furthermore, the data obtained from this experiment showed that the percentage of abnormal sperm in the organic treatment was significantly lower than inorganic and control groups ($P<0.05$).

Conclusion: Overall, the results of this study indicated that the organic trace mineral supplement can improve some of the quality parameters of fresh ram sperm (such as concentration and morphology).

Cite this article: Hussaini, S.M.H., Zare Shahneh, A., Zhandi, M., Rezayazdi, K. (2025). Effect of Organic and Inorganic Trace Mineral Supplements on Some Quality Parameters of Romanov Ram Sperm. *Journal of Ruminant Research*, 13(3), 91-106.



© The Author(s)



[10.22069/EJRR.2024.22941.1982](https://doi.org/10.22069/EJRR.2024.22941.1982)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثر مکمل مواد معدنی کم مصرف آلی و غیر آلی بر برخی پارامترهای کیفی اسپرم قوچ‌های رومانوف

سید محمدهادی حسینی^۱ احمد زارع شحنه^{۲*} مهدی زندی^۲، کامران رضایزدی^۲

^۱ گروه علوم دامی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

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

اطلاعات مقاله چکیده

سابقه و هدف: پرورش گوسفند در دهه‌های اخیر رشد چشم‌گیری داشته است و نقش مهمی در بهبود فعالیت‌های اقتصادی و اجتماعی بسیاری از کشورها ایفا کرده است. از آنجایی که تعداد قوچ در گله‌ها نسبت به میش بسیار کمتر است (حدوداً یک رأس قوچ به ازای ۳۰ تا ۵۰ رأس میش) و یا اینکه تعداد زیادی میش با استفاده از تلقیح مصنوعی آبستن می‌شوند، بهبود کیفیت اسپرم قوچ باعث بهبود باروری کلی گله می‌شود. بیان‌شده است که مواد معدنی کم‌مصرف در اکثر سلول‌های بدن یا به صورت کاتالیزور هستند و یا از اجزای سیستم‌های آنزیمی می‌باشند؛ بنابراین، استفاده از این مواد در جیره می‌تواند کیفیت منی را تحت تأثیر قرار دهد. مکمل‌های مواد معدنی نقشی مهم در اسپرم‌سازی مناسب و بهبود خصوصیات اسپرم دارند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که زیست‌فراهمی بالاتر مواد معدنی آلی نسبت به مواد معدنی غیر آلی منجر به اثرگذاری بهتر آن‌ها می‌شود؛ بنابراین هدف از این مطالعه مقایسه اثر مکمل مواد معدنی کم‌مصرف آلی و غیر آلی بر برخی پارامترهای کیفی اسپرم قوچ‌های رومانوف بود.

نوع مقاله:

مقاله کامل علمی - پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۵

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۱۸ رأس قوچ نژاد رومانوف با میانگین وزنی $57/5 \pm 2/5$ و میانگین سنی ۲/۵ سال استفاده شد. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار انجام شد. قوچ‌ها به‌طور تصادفی به یکی از سه تیمار (۱) شاهد، شامل جیره‌ی پایه متوازن شده با NRC (۲) تیمار غیرآلی شامل جیره‌ی پایه به همراه مکمل مواد معدنی کم‌مصرف به شکل غیر آلی (روزانه ۰/۲۹ گرم مواد معدنی غیرآلی به ازای هر رأس، حاوی سولفات روی، سولفات مس، اکسید منگنز، سولفات آهن، سلنیت سدیم، اکسید کروم و سولفات کبالت) و (۳) تیمار آلی شامل جیره‌ی پایه به همراه مکمل مواد معدنی کم‌مصرف مبتنی بر ترکیبات کلات پیشرفته (روزانه ۰/۷ گرم بنزوپلکس ۷ به ازای هر رأس، حاوی عناصر روی، مس، منگنز، آهن، سلنیوم، کروم و کبالت) اختصاص یافتند و به مدت ۹۰ روز تغذیه شدند. نمونه‌های منی در روز ۸۰ آزمایش و با استفاده از واژن مصنوعی از تمام قوچ‌ها جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، پارامترهای کیفی اسپرم (حجم منی، غلظت، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم و درصد اسپرم‌های ناهنجار) ارزیابی شدند. همچنین برای بررسی غلظت کاتالاز

واژه‌های کلیدی:

اسپرم

قوچ

مواد معدنی

سرم، از نمونه‌های خونی که در روز ۸۰ آزمایش از رگ گردنی قوچ‌ها جمع‌آوری شده بودند استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که حجم منی، جنبایی کل، جنبایی پیش‌رونده، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم و نیز کاتالاز سرم تحت تأثیر تیمارهای مورد استفاده قرار نگرفت ($P > 0/05$). همچنین یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت اسپرم در قوچ‌هایی که از مکمل مواد معدنی کم‌مصرف آلی استفاده کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$)، درحالی‌که نسبت به تیمار غیر آلی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). به‌علاوه، داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که درصد اسپرم‌های ناهنجار در تیمار آلی نسبت به تیمار غیر آلی و شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مکمل مواد معدنی کم‌مصرف به شکل آلی می‌تواند برخی از فراسنجه‌های کیفی اسپرم تازه‌ی قوچ (مانند غلظت و مورفولوژی) را بهبود بخشد.

استناد: حسینی، سید محمد هادی؛ زارع شحنه، احمد؛ ژندی، مهدی؛ رضایزدی، کامران. (۱۴۰۴). اثر مکمل مواد معدنی کم مصرف آلی و غیر آلی بر برخی پارامترهای کیفی اسپرم قوچ‌های رومانوف. پژوهش در شنخوارکنندگان، ۱۳(۳)، ۹۱-۱۰۶.



[10.22069/EJRR.2024.22941.1982](https://doi.org/10.22069/EJRR.2024.22941.1982)

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



مقدمه

پرورش گوسفند در دهه‌های اخیر رشد چشم‌گیری داشته است و نقش مهمی در بهبود فعالیت‌های اقتصادی و اجتماعی در بسیاری از کشورها ایفا کرده است. توانایی نشخوارکنندگان کوچک برای زندگی و تولید در محیط‌های نامساعد، دلیل افزایش مداوم تعداد نژادها و پراکندگی جغرافیایی آن‌ها در مقایسه با سایر گونه‌های جانوری است. اخیراً، افزایش پرورش گوسفند با توسعه و بهبود فناوری‌های تولیدمثلی حمایت شده است. کنترل و دست‌کاری تولیدمثلی یکی از مؤثرترین ابزارها برای پیشرفت ژنتیکی در این گونه است (Amiridis و Cseh، ۲۰۱۲). با این حال، در صنعت دام سبک، فناوری‌های کمک تولیدمثلی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار نگرفته است. در حالی که القای فحلی، هم‌زمان‌سازی فحلی و تلقیح مصنوعی در حال حاضر در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده می‌شود، بسیاری از تکنیک‌های دیگر مانند افزایش تخم‌ریزی، انتقال جنین، تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی، انجماد جنین و دست‌کاری جنین هنوز به‌طور گسترده مورد استفاده قرار نگرفته‌اند (Ledda و Gonzalez-Bulnes، ۲۰۱۸). از آنجایی که تعداد قوچ در گله نسبت به میش بسیار کمتر است (حدوداً یک رأس قوچ به ازای ۳۰ تا ۵۰ رأس میش) (Vipond و Greig، ۲۰۰۷) و یا اینکه تعداد زیادی میش با استفاده از تلقیح مصنوعی آبستن می‌شوند (Kukovics و همکاران، ۲۰۱۱)، بنابراین بهبود و حفظ کیفیت اسپرم قوچ باعث بهبود و حفظ کلی باروری گله و در نهایت بهبود شرایط اقتصادی گله می‌شود. بر همین اساس، مطالعات فراوانی به‌منظور حفظ و بهبود کیفیت منی انجام شده است. برای نمونه، روش‌های مختلف درون تنی مانند تغذیه‌ی مکمل مواد معدنی کم‌مصرف، اسیدهای چرب غیراشباع و همچنین افزایش محتوای

پروتئین و انرژی جیره برای بهبود کیفیت منی اجرا شده است (Kheradmand و همکاران، ۲۰۰۶؛ Ezazi و همکاران، ۲۰۱۹؛ Ghorbani و همکاران، ۲۰۲۴). بیان شده است که مواد معدنی کم‌مصرف در اکثر سلول‌های بدن یا به‌صورت کاتالیزور و یا از اجزای سیستم‌های آنزیمی (Świątkiewicz و همکاران، ۲۰۱۴) می‌باشند؛ بنابراین استفاده از این مواد در جیره می‌تواند کیفیت منی را تحت تأثیر قرار دهد (Barber و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش شده است که مکمل‌های مواد معدنی نقشی مهم در اسپرم‌سازی مناسب و بهبود خصوصیات اسپرم دارند (Omu و همکاران، ۱۹۹۸؛ Kendall و همکاران، ۲۰۰۰؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰۶). مکمل‌های معدنی از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و خواصی که سلامت غشای اسپرم را افزایش می‌دهد، مزایایی برای اسپرم داشته است (Kendall و همکاران، ۲۰۰۰؛ Arthington و همکاران، ۲۰۰۲). مطالعات نشان داده‌اند که تغذیه‌ی مکمل روی و مس آلی به بزهای نر در حال رشد بر شروع بلوغ، غلظت هورمون‌های جنسی، ویژگی‌های مایع منی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و انجماد و همچنین ظرفیت لقاح آزمایشگاهی اسپرم تأثیرگذار است (Arangasamy و همکاران، ۲۰۱۸؛ Hemalatha و همکاران، ۲۰۱۸؛ Narasimhaiah و همکاران، ۲۰۱۸). توسعه و رشد بیضه و اسپرم‌سازی نیازمند مقدار روی بیشتر نسبت به رشد بدن می‌باشند. گزارش شده است که تولید روزانه اسپرم همراه با بهبود کلی در ویژگی‌های اسپرم در پاسخ به مکمل روی افزایش می‌یابد (Underwood و Somers، ۱۹۶۹؛ Kendall و همکاران، ۲۰۰۰؛ Arthington و همکاران، ۲۰۰۲). منگنز یک فلز فعال ردوکس است که تقریباً توسط همه موجودات زنده استفاده می‌شود و برای فعال شدن آنزیم‌ها، تقریباً در هر بخش سلولی مورد نیاز

باعث کاهش تنش اکسیداتیو شود (Onderci و همکاران، ۲۰۰۳). کبالت نقش مهمی در برخی فرایندهای بیولوژیکی ایفا می‌کند و غالباً به‌صورت ویتامین B₁₂ در بدن یافت می‌شود (Yamada, ۲۰۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که غلظت کوبالامین سمینال پلاسما به‌طور معنی‌داری با غلظت اسپرم در مردان همبستگی دارد (Boxmeer و همکاران، ۲۰۰۷). برخی مطالعات نشان داده‌اند که مواد معدنی آلی، زیست‌فراهمی بالاتری نسبت به مواد معدنی غیر آلی دارند و پایداری آن‌ها بالاتر است که در نهایت منجر به اثرگذاری بالاتری نسبت به مواد معدنی غیر آلی می‌شوند (Mattar و همکاران، ۲۰۲۲). در کنار مواد معدنی کیلاته‌ی معمولی شامل کمپلکس‌های فلز-آمینواسید، فلز-پروتئینه و فلز-پل‌ساکارید، اخیراً فناوری کیلاته‌ی پیشرفته‌ای برای تولید ترکیبات کیلاته توسعه‌یافته است که در آن از اسیدهای آلی به‌عنوان لیگاند استفاده می‌کنند (Nazaran). مکمل معدنی بنزاپلکس ۷ (Bonzaplex 7) بر اساس این فناوری تولید شده است. گزارش‌هایی از اثرات مفید مواد معدنی کمیاب کیلاته با اسیدهای آلی در طیور و گاو گزارش شده است (Mohammadi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Banadaky و همکاران، ۲۰۲۱)، اما تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از این نوع مواد معدنی کم‌مصرف آلی در قوچ گزارش نشده است؛ بنابراین هدف از این مطالعه مقایسه‌ی اثر مکمل مواد معدنی کم‌مصرف آلی و غیر آلی بر برخی پارامترهای کیفی اسپرم قوچ‌های رومانوف است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در مزرعه‌ی تجاری شرکت دام‌گستر پیشگام واقع در روستای امین آباد، شهرستان فیروزکوه، استان تهران، به مدت ۹۰ روز و از خرداد ماه تا شهریور ماه سال ۱۴۰۲ انجام شد. در این مطالعه از ۱۸ رأس قوچ

است (Culotta و همکاران، ۲۰۰۵). مگنیز به‌عنوان جزئی از آنزیم‌های مختلف در تعدیل مسیرهای متابولیکی متعددی از جمله مسیرهای رشد سیستم اسکلتی، متابولیسم انرژی، عملکرد سیستم عصبی و ایمنی و عملکرد هورمون‌های تولیدمثلی فعالیت می‌کند (Santamaria, ۲۰۰۸). مس به‌عنوان کوفاکتور فلزی برای بسیاری از آنزیم‌ها مانند دی‌آمین اکسیداز، مس-روی سوپراکسید دیسموتاز و سیتوکروم c اکسیداز فعالیت دارد که در نهایت روی پارامترهای کیفی اسپرم تأثیرگذار است (Tvrdá و همکاران، ۲۰۱۵). آهن جزء هموگلوبین و میوگلوبین است و در اکسیداسیون، کاهش و انتقال الکترون‌ها نقش دارد که برای بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی یک ارگانیسم ضروری است (Andrews, ۲۰۰۲). آهن یکی از فراوان‌ترین مواد مغذی معدنی در جانداران است و نقش مهمی در سنتز اسید نوکلئیک و پروتئین، انتقال الکترون، تنفس سلولی، تکثیر و تمایز دارد که این موارد با اسپرماتوزن و متابولیسم اسپرم مرتبط است (Wise و همکاران، ۲۰۰۳). سلنیوم در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی فعالیت می‌کند و از اجزای سلنوپروتئین‌ها است و به‌طور غیرمستقیم یا مستقیم در کاهش تنش اکسیداتیو نقش دارد. سلنیوم یکی از مهم‌ترین عناصر در فرایندهای تولیدمثلی است. کمبود سلنیوم در جیره می‌تواند منجر به کاهش تعداد اسپرم، جنبایی و ظرفیت باروری اسپرم شود. درواقع سلنیوم یکی از اجزای مهم برخی از آنزیم‌ها است و به دلیل وجود آن در حداقل ۲۵ سلنوپروتئین، دارای خواص ضد اکسیداتیو، ضدالتهابی و ضدویروسی می‌باشد (Pappas و همکاران، ۲۰۰۸). کروم برای فعالیت مناسب انسولین و متابولیسم طبیعی چربی، پروتئین و کربوهیدرات ضروری است (Chowdhury و همکاران، ۲۰۰۳). گزارش شده است که کروم می‌تواند سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد و در نتیجه

میلیون)، سلنیت سدیم (۰/۴۶۶ قسمت در میلیون)، اکسید کروم (۰/۵۱۴ قسمت در میلیون) و سولفات کبالت (۵/۹۵ قسمت در میلیون)) و (۳ تیمار آلی: جیره ی پایه به علاوه مکمل مواد معدنی کم مصرف مبتنی بر ترکیبات کلات پیشرفته (روزانه ۰/۷ گرم بنزا پلکس ۷ به ازای هر رأس، حاوی عناصر روی (۳۵/۷ قسمت در میلیون)، مس (۱۲/۶ قسمت در میلیون)، منگنز (۱۹/۶ قسمت در میلیون)، آهن (۵/۶ قسمت در میلیون)، سلنیوم (۰/۲۱ قسمت در میلیون)، کروم (۰/۳۵ قسمت در میلیون) و کبالت (۱/۱۹ قسمت در میلیون))، تولید شده در شرکت صدور احراز شرق. قوچ ها به مدت ۹۰ روز در دو نوبت صبح و عصر تغذیه شدند. ترکیبات جیره پایه در جدول ۱ نشان داده شده است.

نژاد رومانوف با میانگین وزنی $2/5 \pm 57/5$ و میانگین سنی ۲/۵ سال استفاده شد. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار انجام شد. قوچ ها در جایگاه های انفرادی با بستر پوشیده از کاه و کلس نگهداری شدند و به صورت آزاد به آب تازه دسترسی داشتند. قوچ ها به طور تصادفی به یکی از سه تیمار زیر اختصاص یافتند: (۱) تیمار شاهد: جیره ی پایه متوازن شده با NRC (۲) تیمار غیر آلی: جیره ی پایه به علاوه مکمل مواد معدنی کم مصرف به شکل غیر آلی (روزانه ۰/۲۹ گرم مواد معدنی غیر آلی به ازای هر رأس حاوی سولفات روی (۱۱۵/۱۶ قسمت در میلیون)، سولفات مس (۵۲/۵ قسمت در میلیون)، اکسید منگنز (۹۸ قسمت در میلیون)، سولفات آهن (۲۰ قسمت در

جدول ۱- اجزای خوراک پایه بر اساس درصد ماده خشک

Table 1- Ingredients of basal feed (based on dry matter%)	
Percent درصد	Ingredients اجزا
30.0	Corn grain دانه ذرت
6.0	Soybean meal کنجاله سویا
5.0	Wheat bran سبوس گندم
0.5	Salt نمک
1.0	Bentonite بنتونیت
1.0	Sodium bicarbonate بیکربنات سدیم
1.0	Calcium carbonate کربنات کلسیم
1.5	Mineral and vitamin premix * پیش مخلوط مواد معدنی و ویتامینه
40.0	Alfalfa یونجه
14.0	Wheat straw کاه گندم
Chemical component (درصد) ترکیبات شیمیایی	
12.23	Crude protein پروتئین خام
2.28	ME (Mcal/kg) انرژی قابل متابولیسم
34.61	NDF الیاف نا محلول در شوینده خنثی
2.91	Ether Extract عصاره اتری
12.10	Ash خاکستر

* پیش مخلوط مواد معدنی و ویتامینه شامل ۱۵۰۰ قسمت در میلیون منگنز، ۱۵۰۰ قسمت در میلیون روی، ۳۰۰ قسمت در میلیون مس، ۲۰ قسمت در میلیون کبالت، ۲۰ قسمت در میلیون سلنیوم، ۳۵۰ قسمت در میلیون آهن، ۲۵۰۰۰ قسمت در میلیون منیزیم، ۷۰۰۰۰ قسمت در میلیون فسفر، ۱۰۰۰۰۰ قسمت در میلیون کلسیم و ۵۰ قسمت در میلیون ید، ۱۰۰۰ قسمت در میلیون آنتی اکسیدان، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۵۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3 و ۶۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E در هر کیلوگرم است

Mineral and vitamin premix contained (per Kg): 1500 ppm manganese, 1500 ppm zinc, 300 ppm copper, 20 ppm cobalt, 20 ppm selenium, 350 ppm iron, 25000 ppm magnesium, 70000 ppm phosphorus, 100000 ppm calcium, 50 ppm iodine, 1000 ppm antioxidant, 1000000 IU Vitamin A, 150000 IU Vitamin D3 and 6000 IU Vitamin E

جمع‌آوری نمونه‌های منی: نمونه‌های منی در روز ۸۰ آزمایش و با استفاده از واژن مصنوعی از تمام قوچ‌ها جمع‌آوری شدند و بلافاصله به آزمایشگاه موجود در مزرعه منتقل شدند و برای ارزیابی فراسنجه‌های کیفی منی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی فراسنجه‌های کیفی اسپرم

حجم منی: بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه‌های منی، حجم منی با استفاده از لوله‌های آزمایش مدرج اندازه‌گیری شد.

غلظت اسپرم: غلظت اسپرم با استفاده از دستگاه فتومتر گوسفندی و بز شرکت IMV فرانسه (Ovine Caprine Accucell photometer, IMV TECHNOLOGIES GROUP, France) اندازه‌گیری شد (Baláži و همکاران، ۲۰۲۰). برای کالیبره کردن دستگاه از روش Prathalingam و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد که به‌طور خلاصه دو نمونه انزال جمع‌آوری شد و به‌صورت سریالی رقیق شدند (۵ رقت). سپس غلظت نمونه‌ها با استفاده از روش هموسایتومتر اندازه‌گیری شدند تا یک منحنی استاندارد ساخته شود و سپس داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه با این منحنی مطابقت داده شد.

جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده: پس‌ازاینکه غلظت نمونه‌های منی اندازه‌گیری شد، نمونه‌های منی با استفاده از سرم فیزیولوژی (۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) رقیق شدند تا به غلظت نهایی $10^6 \times 200$ اسپرم در میلی‌لیتر برسد. سپس ۵ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده برداشته شد و بر روی لام که در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد بود گذاشته شد و لامل روی آن قرار داده شد. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ فاز کنتراست (Labomed, Lx 400, USA) منتقل شد و جنبایی و جنبایی پیش‌رونده نمونه‌ها به روش چشمی ارزیابی شدند (Tapeh و همکاران، ۲۰۱۷).

یکپارچگی غشای پلاسمایی: برای ارزیابی یکپارچگی غشای اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین استفاده شد. اساس این روش به این صورت می‌باشد که اسپرم‌هایی که غشای آن‌ها دارای اختلال هستند رنگ ائوزین را به خود جذب می‌کنند اما اسپرم‌های با غشای سالم رنگ را جذب نمی‌کنند. رنگ نیگروزین به‌عنوان رنگ پس‌زمینه و ایجاد اختلاف رنگ میان اسپرم و رنگ زمینه برای دید بهتر نمونه است. برای این رنگ‌آمیزی ۳ میکرولیتر از نمونه‌ی اسپرم برداشته شد و روی لام قرار داده شد. سپس رنگ ائوزین-نیگروزین به نسبت ۱ به ۱ بر روی نمونه ریخته شد. سپس نمونه و رنگ ائوزین نیگروزین به‌وسیله‌ی سمپلر به آرامی با هم مخلوط شدند. بعدازآن، به وسیله‌ی یک لام دیگر این مخلوط گسترش داده شد. بعدازاین که نمونه‌ها خشک شدند، آن‌ها را زیر میکروسکوپ قرار داده و از هر اسلاید ۲۰۰ اسپرم شمرده شد. اسپرم‌هایی که سر آن‌ها رنگ نگرفته بودند و یا فقط بخش کوچکی از گردن آن‌ها رنگ گرفته بودند به‌عنوان اسپرم‌های با غشای یکپارچه در نظر گرفته شدند (Blom, ۱۹۵۰).

عملکرد غشای پلاسمایی: از آزمون هاس (HOST) برای بررسی عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم استفاده شد. در تست هاس، اسپرم در محیطی با اسمولاریته‌ی پایین (۱۰۰ میلی‌اسمول بر کیلوگرم) قرار می‌گیرد. اسپرم‌هایی که غشای آن‌ها سالم است، با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریته‌ی پایین به‌سرعت واکنش می‌دهند و انتهای دم آن گره می‌خورد؛ اما اسپرم‌های مرده و دارای غشای آسیب‌دیده هیچ واکنشی نسبت به این محیط نشان نمی‌دهند. در این آزمایش از روش Revell و Mrode (۱۹۹۴) با کمی تغییر استفاده شد. برای انجام این آزمون ۳۰ میکرولیتر از نمونه به ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هاس اضافه شد. سپس نمونه‌های مخلوط شده به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور با دمای

که در این مدل، Y_{ij} : تکرار j و تیمار i : میانگین، T_i : اثر تیمار i : e_{ij} : اثر عوامل باقیمانده است. میانگین ها با F معنی دار توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد سنجش شدند.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به جنبایی کل، جنبایی پیش رونده، حجم، غلظت و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است. همچنین نتایج مربوط به عملکرد غشای پلاسمایی، درصد اسپرم های ناهنجار و غلظت کاتالاز سرم به ترتیب در شکل های ۱، ۲ و ۳ نمایش داده شده اند.

نتایج این مطالعه نشان داد که جنبایی کل، جنبایی پیش رونده، حجم، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم تحت تأثیر تیمارهای مورد استفاده قرار نگرفت ($P > 0.05$) که با نتایج Page و همکاران (۲۰۲۰) که اثر مکمل روی آلی و غیر آلی را بر برخی پارامترهای کیفی اسپرم قوچ های در حال رشد بررسی کرده بودند مطابقت داشت، در حالی که نسبت به نتایج مطالعه ی Arangasamy و همکاران (۲۰۱۸)، Krishnaiah و همکاران (۲۰۱۹) و Srivastava و همکاران (۲۰۲۳) متفاوت بود. همچنین، غلظت کاتالاز سرم نیز تحت تأثیر تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش قرار نگرفت ($P > 0.05$) که با نتیجه ی تحقیقات Moazeni Zadeh و همکاران (۲۰۲۳) که به بررسی اثر مکمل سازی شکل گلیسینات برخی از عناصر کم مصرف بر وضعیت آنتی اکسیدانی و التهابی گوساله های شیرخوار پرداخته بودند مطابقت داشت، در حالی که با نتایج Asadi و همکاران (۲۰۲۴) که نشان دادند مکمل آلی عنصر منگنز سبب بهبود کاتالاز سرم میش ها و بره های شیرخوار می شود مطابقت نداشت.

۳۷ درجه قرار گرفت. پس از گذشت این زمان ۵ میکرولیتر از نمونه ی انکوبه شده بر روی لام قرار داده شد و سپس با میکروسکوپ فازکتر است مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت از هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم های سالم و آسیب دیده محاسبه شد.

مورفولوژی اسپرم: با استفاده از رنگ آمیزی اتوزین-نیگروزین، اسپرم های ناهنجار (دارای آسیب های سر و دم) اندازه گیری شدند (Tapeh و همکاران، ۲۰۱۷).

خون گیری و بررسی غلظت کاتالاز سرم: برای بررسی غلظت کاتالاز، از سرم نمونه های خونی که در روز ۸۰ آزمایش و با استفاده از لوله های تحت خدا بدون ماده ضد انعقادی از رگ گردنی قوچ ها جمع آوری شده بودند استفاده شد. برای جداسازی سرم، نمونه های خون در $1000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و سپس مایع رویی در لوله های ۲ میلی لیتری جداسازی و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد شدند. پس از ذوب کردن نمونه ها، غلظت آنزیم کاتالاز سرم، با استفاده از کیت های تجاری شرکت نوند سلامت و دستگاه میکروپلیت ریدر اتومات EON-BIOTEK, America اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

نرمال بودن داده ها با استفاده از رویه univariate آزمون شاپیرو ویلک بررسی شدند و پس از اطمینان از نرمال بودن عوامل باقی مانده، تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از رویه ی GLM و آزمون چند دامنه ای دانکن، نرم افزار SAS 9.1 (2001, Institute Inc., Cary, NC, USA) انجام شد. داده های غیر تکرار شونده در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شد:

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

جدول ۲- اثر مکمل‌های معدنی کم‌مصرف آلی و غیر آلی بر برخی فراسنجه‌های کیفی اسپرم تازه‌ی قوچ (LS mean $\pm$ SEM)
Table 2. Effect of organic and inorganic trace mineral supplements on some quality parameters of fresh sperm of ram

P-value	SEM	تیمارها			فراسنجه‌ها
		آلی Organic trace mineral	غیرآلی Inorganic trace mineral	شاهد Control	
0.73	0.66	88.80	89.60	88	جنبایی کل (%) Total motility
0.71	0.71	83.40	84.60	82.83	جنبایی پیش‌رونده (%) Progressive motility
0.44	0.04	0.98	1.16	1.00	حجم منی (mL) Semen volume
0.04	0.12	4.60 ^a	4.26 ^{ab}	3.62 ^b	غلظت اسپرم ($\times 10^9$) Sperm concentration
0.29	1.23	93.81	90.16	87.72	یکپارچگی غشای پلاسمایی (%) Plasma membrane integrity

a-b حروف بالانویس غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

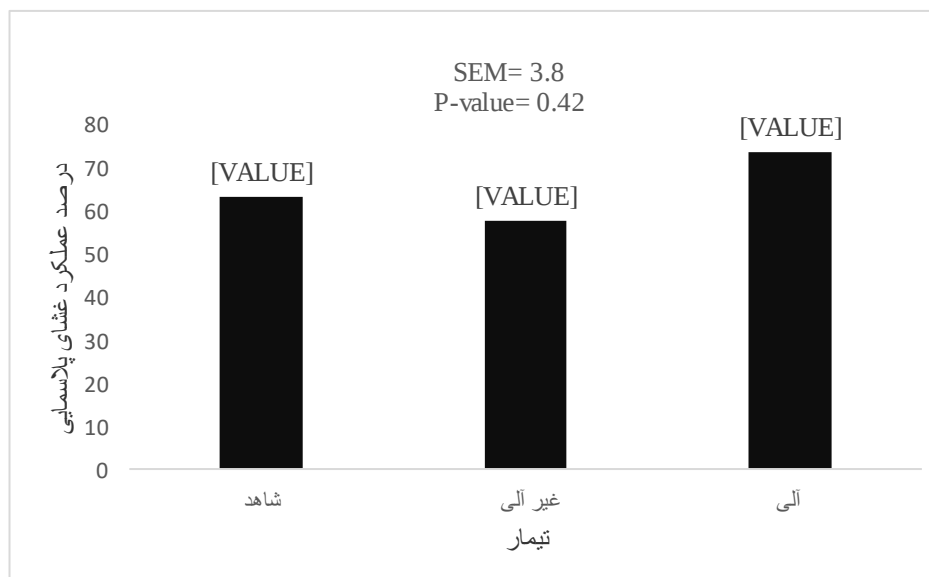
a-b Non-identical superscript letters in each row indicate significant differences ($P < 0.05$)

(۱۹۸۱). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که روی، مکانیسم ترشحی غدد ضمیمه (پروستات، بولبویورترال و کوپر) را تنظیم می‌کند که حجم اصلی (۶۰ تا ۷۰٪) پلاسمای منی را تشکیل می‌دهند (Mann و همکاران، ۱۹۸۱). لازم به ذکر است که آنتی‌اکسیدان‌ها نیز نقشی مهم در جنبایی اسپرم دارند (Kumar و همکاران، ۲۰۰۶)؛ بنابراین، از آنجایی که روی و مس فاکتورهای مشترک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، مکمل‌های معدنی می‌توانند باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پلاسمای منی و خون شوند که در نهایت می‌تواند باعث بهبود جنبایی اسپرم، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم گردد (Krishnaiah و همکاران، ۲۰۱۹). قوچ‌های استفاده‌شده در مطالعه‌ی حاضر قوچ‌های برتر و با کیفیت بالابودند که برای تولید اسپرم به‌صورت تجاری مورداستفاده قرار می‌گرفتند و در شرایطی بسیار مناسب و بدون تنش نگهداری می‌شدند. از آنجایی که اسپرم این قوچ‌ها نیز بلافاصله بعد از انزال مورد ارزیابی قرار گرفتند، تحت تنش خاصی مانند

Arangasamy و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که استفاده از مکمل روی و مس آلی در جیره‌ی بزها می‌تواند باعث بهبود حجم منی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم شود. همچنین Srivastava و همکاران (۲۰۲۳) بیان کردند که استفاده از مکمل معدنی تولیدشده به روش نوین، باعث بهبود حجم منی، جنبایی، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی در گاوهای دو رگ شده است. Arangasamy و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که مکانیسم احتمالی در حفظ بهتر اسپرم در گروه تغذیه‌شده با مکمل روی ممکن است از طریق عملکرد تثبیت‌کنندگی غشا همراه با نقش محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو باشد. گزارش شده است که روی، در چندین واکنش آنزیمی دخیل است و به دلیل خواص متالوآنزیمی، ارتباط نزدیکی با متابولیسم کربوهیدرات، لیپید، اسید نوکلئیک و پروتئین دارد. روی، لیزوزوم‌ها، ریبوزوم‌ها، RNA و DNA را تثبیت می‌کند که ممکن است زنده‌مانی اسپرم و ظرفیت عملکردی آن‌ها را افزایش دهد (O'Dell و Bettger،

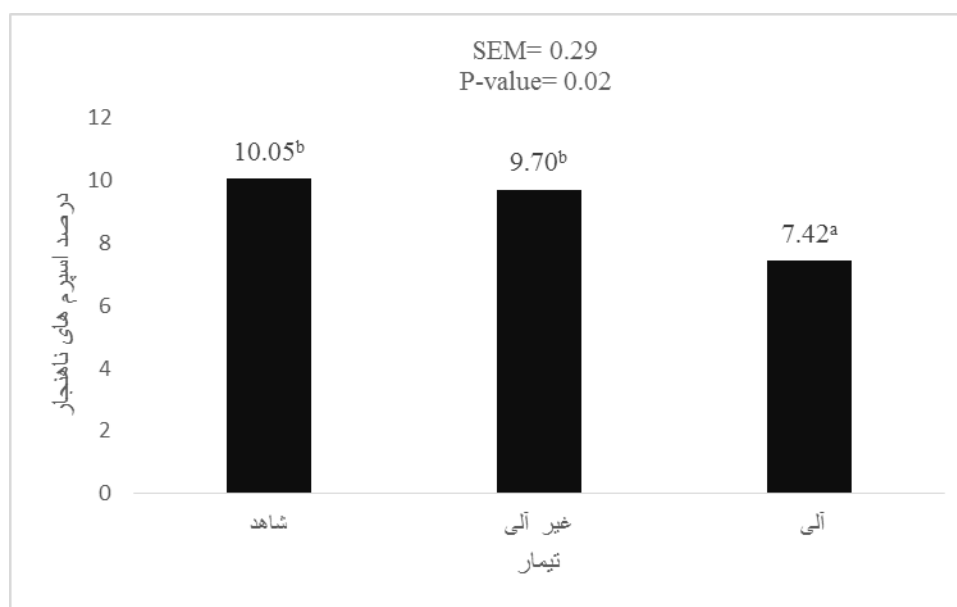
احتمالی برای عدم مطابقت نتایج این مطالعه با نتایج دیگر مطالعات می تواند گونه های مختلف استفاده شده در مطالعات و یا سن متفاوت دامها در زمان انجام آزمایش باشد.

سرد سازی و یا نگهداری طولانی مدت و در نتیجه در معرض گونه های اکسیژنی فعال فزاینده قرار نگرفتند که این عوامل ممکن است دلیلی بر عدم تأثیر تیمارهای آزمایشی بر جنبایی، یکپارچگی و عملکرد غشای پلاسمایی در این مطالعه باشد. از دیگر دلایل



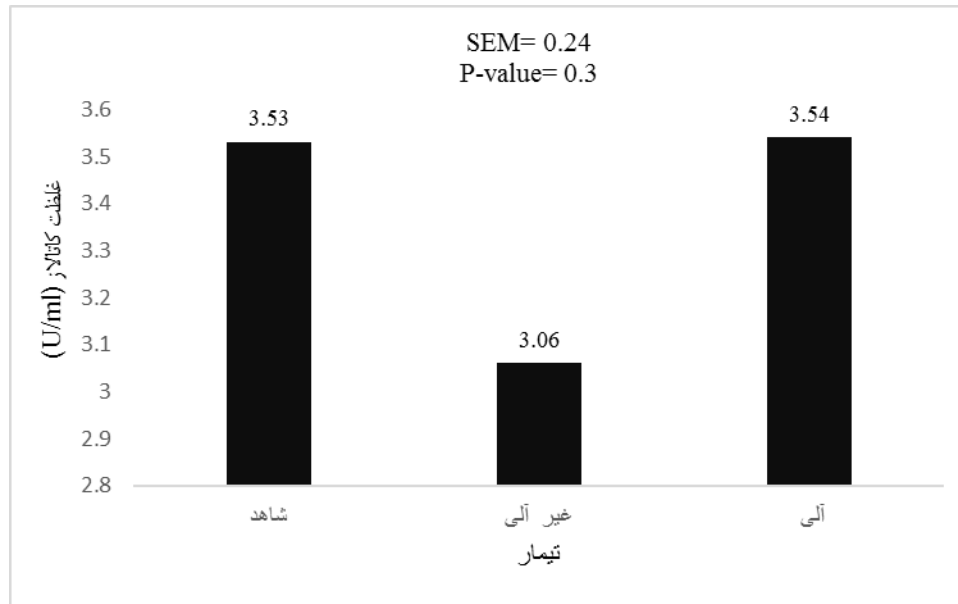
شکل ۱- اثر مکمل های معدنی کم مصرف آلی و غیر آلی بر عملکرد غشای پلاسمایی اسپرم قوچ (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 1. Effect of organic and inorganic trace mineral supplements on plasma membrane functionality of ram sperm (LS mean $\pm$ SEM)



شکل ۲- اثر مکمل های معدنی کم مصرف آلی و غیر آلی بر مورفولوژی اسپرم قوچ (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 1. Effect of organic and inorganic trace mineral supplements on morphology of ram sperm (LS mean $\pm$ SEM)



شکل ۳- اثر مکمل‌های معدنی کم‌مصرف آلی و غیر آلی بر غلظت کاتالاز سرم (LS mean $\pm$ SEM)

Figure 3- Effect of organic and inorganic trace mineral supplements on serum concentration of Catalase (LS mean $\pm$ SEM)

Chia و همکاران، ۲۰۰۰؛ Croxford و همکاران، ۲۰۱۱). علاوه بر موارد ذکرشده، روی، عملکردی تنظیمی در سنتز هورمون‌های استروئیدی به‌عنوان یک مرحله‌ی حیاتی برای اسپرماتوزن طبیعی دارد (Kothari و Chaudhari، ۲۰۱۶). Yunsang و Wanxi (۲۰۱۱) بیان کرده‌اند که روی نه تنها در رشد آناتومیکی و عملکرد طبیعی اندام‌های تناسلی جنس نر نقش دارد، بلکه با مشارکت فعال در بلوغ اسپرم و حفظ ژرمینال اپیتلیوم، اسپرماتوزن را افزایش می‌دهد. سلنیوم ممکن است به طور ویژه‌ای برای اسپرماتوزن طبیعی و مورفولوژی اسپرم ضروری باشد. کمبود سلنیوم در موش‌ها می‌تواند اسپرم‌زایی را مهار کند (Wu و همکاران، ۱۹۷۳). سلنوپروتئین فسفولیپید هیدروپراکسید گلوتاتیون پراکسیداز (PHGPx) یک پروتئین ساختاری بخش میانی اسپرم است که برای رشد و عملکرد طبیعی اسپرم موردنیاز است. کمبود سلنیوم منجر به بیان ضعیف PHGPx در میتوکندری بخش میانی می‌شود که با تعداد کم اسپرم و جنبایی ضعیف همراه است (Parillo و همکاران، ۲۰۱۴).

نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان دادند که غلظت اسپرم در قوچ‌هایی که از مکمل مواد معدنی کم‌مصرف آلی استفاده کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$)، درحالی‌که نسبت به تیمار غیر آلی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). همچنین یافته‌های این آزمایش نشان داد که درصد اسپرم‌های ناهنجار در تیمار آلی نسبت به تیمار غیر آلی و تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). این یافته‌ها با نتایج Narasimhaiah و همکاران (۲۰۱۸) و Khalil و همکاران (۲۰۱۴) که اثر مثبت مکمل مواد معدنی کم‌مصرف آلی را بر غلظت اسپرم بز و خروس گزارش کرده بودند مطابقت داشت. مطالعات نشان داده‌اند که نیاز روی برای رشد و توسعه‌ی بیضه و همچنین اسپرم‌سازی، بیشتر از نیاز برای رشد بدن است (Somers و Underwood، ۱۹۶۹). همچنین روی، یک عامل اصلی برای تکثیر و بسته‌بندی DNA، رونویسی DNA، سنتز پروتئین، تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز است که بخش‌های اصلی تولید اسپرم هستند.

برای نتیجه‌گیری مطمئن‌تر مطالعات بیشتری موردنیاز است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در قالب طرح تحقیقاتی با شماره ۷۱۰۸۰۱۱/۶/۶۲ انجام شد. نویسندگان این مقاله از شرکت دام‌گستر پیشگام که امکانات انجام این طرح را فراهم نمودند و همچنین دکتر محمدحسین موذنی‌زاده که در انجام این طرح همکاری نمودند تشکر می‌نمایند.

علاوه بر این، کمبود سلنیوم و بیان محدود PHGPx باعث ناپایداری مکانیکی و در نتیجه ناهنجاری‌های مورفولوژیکی قطعه میانی اسپرم و از دست دادن تاژک می‌شود (Ursini و همکاران، ۱۹۹۹)؛ بنابراین ممکن است بهبود غلظت اسپرم و کاهش درصد اسپرم‌های ناهنجار در مطالعه‌ی حاضر ناشی از افزایش سطح و در دسترس بودن مواد معدنی کم‌مصرف در جیره‌ی قوچ‌ها باشد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مکمل مواد معدنی کم‌مصرف به شکل آلی می‌تواند برخی از فراسنجه‌های کیفی اسپرم تازه‌ی قوچ (مانند غلظت و مورفولوژی) را بهبود بخشد و البته

References

- Amiridis, G. S., & Cseh, S. (2012). Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 152-161
- Andrews, N. C. (2002). *Metal transporters and disease*. Current Opinion in Chemical Biology, 6(2), 181-186.
- Arangasamy, A., Krishnaiah, M. V., 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
- Arthington, J. D., Corah, L. R., & Hill, D. A. (2002). The effects of dietary zinc concentration and source on yearling bull growth and fertility. *The Professional Animal Scientist*, 18(3), 282-285.
- Asadi, M., Toghdory, A., Ghoorchi, T., & Hatami, M. (2024). The effect of maternal organic manganese supplementation on performance, immunological status, blood biochemical and antioxidant status of Afshari ewes and their newborn lambs in transition period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108(2): 493-499.
- Baláži, A., Vašíček, J., Svoradová, A., Macháč, M., Jurčík, R., Huba, J., ... & Chrenek, P. (2020). Comparison of three different methods for the analysis of ram sperm concentration. *Slovak Journal of Animal Science*, 53(02): 53-58.
- Banadaky, M. D., Rajaei-Sharifabadi, H., Hafizi, M., Hashemi, S. A., Kalanaky, S., Fakharzadeh, S., ... & Nazaran, M. H. (2021). Lactation responses of Holstein dairy cows to supplementation with a combination of trace minerals produced using the advanced chelate compounds technology. *Tropical Animal Health and Production*, 53: 1-9.
- Barber, S. J., Parker, H. M., & McDaniel, C. D. (2005). Broiler breeder semen quality as affected by trace minerals *in vitro*. *Poultry Science*, 84(1), 100-105.
- 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.
- Blom, E. (1950). A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*, 1: 176-177
- Boxmeer, J. C., Smit, M., Weber, R. F., Lindemans, J., Romijn, J. C., Eijkemans, M. J., & Steegers-Theunissen, R. P. (2007). Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. *Journal of Andrology*, 28(4): 521-527.

- Chia, S. E., Ong, C. N., Chua, L. H., Ho, L. M., & Tay, S. K. (2000). Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *Journal of Andrology*, 21(1): 53-57.
- Chowdhury, S., Pandit, K., Roychowdury, P., & Bhattacharya, B. (2003). Role of chromium in human metabolism, with special reference to type 2 diabetes. *JAPI*, 51: 701-705.
- Croxford, T. P., McCormick, N. H., & Kelleher, S. L. (2011). Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. *The Journal of Nutrition*, 141(3): 359-365.
- Culotta, V. C., Yang, M., & Hall, M. D. (2005). Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(7): 1159-1165.
- Ezazi, H., Abdi-Benemar, H., Taghizadeh, A., Khalili, B., Seifdavati, J., Jafaroghli, M., & Salem, A. Z. (2019). The influence of dietary sunflower oil, rich in n6 polyunsaturated fatty acids, in combination with vitamin C on ram semen parameters, sperm lipids and fertility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8): 3803-3810.
- Ghorbani, A., Moeini, M. M., Souri, M., Hajarian, H., & Kachuee, R. (2024). Effect of dietary zinc, selenium and their combination on antioxidant parameters in serum and Semen of Sanjabi mature rams. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 8:100118.
- Hemalatha, K., Arangasamy, A., Selvaraju, S., Krishnaiah, M. V., Rani, G. P., Mishra, A., & Ravindra, J. P. (2018). Effect of dietary supplementation of organic zinc and copper on *in vitro* semen fertility in goat. *Small Ruminant Research*, 161: 68-72.
- Khalil, H. M., Abdallah, A. G., El-Sahn, A. A., El-Saadany, A., & El-Salam, A. (2014). Effect of supplementing organic trace minerals (zinc, manganese, iron, copper and selenium) on semen quality, reproductive performance and immune response of Gimmizah cocks. *Egyptian Poultry Science Journal*, 34(4).
- 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.
- Kheradmand, A., Babaei, H., & Ali Batavani, R. (2006). Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. *Veterinarski Arhiv*, 76(4): 333-341.
- Kothari, R. P., & Chaudhari, A. R. (2016). Zinc levels in seminal fluid in infertile males and its relation with serum free testosterone. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(5), CC05.
- Krishnaiah, M. V., 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.
- Kukovics, S., Gyoker, E., Németh, T., & Gergátz, E. (2011). Artificial insemination of sheep—possibilities, realities and techniques at the farm level. *Artificial Insemination in Farm Animals*.
- 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* $\times$ *Bos taurus*) bulls. *Reproduction Nutrition Development*, 46(6): 663-675.
- Ledda, S., & Gonzalez-Bulnes, A. (2018). ET-technologies in small ruminants. *Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies*, 135-166.
- Mann, T., Lutwak-Mann, C., Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (1981). Secretory function of the prostate, seminal vesicle, Cowper's gland and other accessory organs of reproduction. *Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology. Biochemistry and Investigative Andrology*, 171-193.
- Mattar, G., Haddarah, A., Haddad, J., Pujola, M., & Sepulcre, F. (2022). New approaches, bioavailability and the use of chelates as a promising method for food fortification. *Food Chemistry*, 373: 131394.
- Moazeni Zadeh, M. H., Towhidi, A., Zhandi, M., & Rezayazdi, K. (2023). Effects of supplementation of some trace minerals on growth performance, biochemical, enzymatic,

- antioxidant, hormonal and hematological parameters in Holstein suckling calves. *Journal of Ruminant Research*, 11(2):75-92. (In Persian).
- Mohammadi, V., Ghazanfari, S., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., & Nazaran, M. H. (2015). Comparative effects of zinc-nano complexes, zinc-sulphate and zinc-methionine on performance in broiler chickens. *British Poultry Science*, 56(4): 486-493.
- Narasimhaiah, M., Arunachalam, A., Sellappan, S., Mayasula, V. K., Guvvala, P. R., Ghosh, S. K., & 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.
- Nazaran, M.H. (no date) 'Chelate compounds. Google Patents; 2012. Publication number: US20120100372 A1, Publication type: Application, Application number: US 12/910,799'.
- Omu, A. E., Dashti, H., & Al-Othman, S. (1998). Treatment of asthenozoospermia with zinc sulphate: andrological, immunological and obstetric outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 79(2):179-184.
- Onderci, M., Sahin, N., Sahin, K., & Kilic, N. (2003). Antioxidant properties of chromium and zinc: *in vivo* effects on digestibility, lipid peroxidation, antioxidant vitamins, and some minerals under a low ambient temperature. *Biological Trace Element Research*, 92: 139-149.
- Page, C. M., Van Emon, M. L., Murphy, T. W., Larson, C. K., Berardinelli, J. G., McGregor, I. R., ... & Stewart, W. C. (2020). Effects of zinc source and dietary concentration on serum zinc concentrations, growth performance, wool and reproductive characteristics in developing rams. *Animal*, 14(3): 520-528.
- Pappas, A. C., Zoidis, E., Surai, P. F., & Zervas, G. (2008). Selenoproteins and maternal nutrition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology*, 151(4): 361-372.
- Parillo, F., Sylla, L., Palombi, C., Monaci, M., & Stradaoli, G. (2014). Immunocytochemical localisation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull's spermatogenic cells. *Italian Journal of Animal Science*, 13(3): 3483.
- Prathalingam, N. S., Holt, W. W., Revell, S. G., Jones, S., & Watson, P. F. (2006). The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 27(2): 257-262.
- Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2): 77-86.
- 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.
- Santamaria, A. B. (2008). Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4): 484-500.
- Srivastava, R., Nair, P. M., Dewry, R., Kulkarni, N., Mani, V., Bhakat, M., & Mondal, G. (2023). Semen characteristics, nutrient utilization and immuno-endocrine status in response to dietary supplementation of a novel trace mineral mixture in crossbred bulls. *Journal of Trace Elements and Minerals*, 5: 100088.
- Świątkiewicz, S., Arczewska-Włosek, A., & Jozefiak, D. (2014). The efficacy of organic minerals in poultry nutrition: review and implications of recent studies. *World's Poultry Science Journal*, 70(3): 475-486.
- Tapeh, R. S., Zhandi, M., Zaghari, M., & Akhlaghi, A. (2017). Effects of guanidinoacetic acid diet supplementation on semen quality and fertility of broiler breeder roosters. *Theriogenology*, 89: 178-182.
- Tvrda, E., Peer, R., Sikka, S. C., & Agarwal, A. (2015). Iron and copper in male reproduction: a double-edged sword. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32: 3-16.
- 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. *Australian Journal of Agricultural Research*, 20(5): 889-897.

- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., & Flohé, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 285(5432): 1393-1396.
- Vipond, J., & Greig, A. (2007). *Management and Care of Rams*. Diseases of Sheep, 61.
- Wise, T., Lunstra, D. D., Rohrer, G. A., & Ford, J. J. (2003). Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. *Journal of Animal Science*, 81(2): 503-511.
- Wu, S. H., Oldfield, J. E., Whanger, P. D., & Weswig, P. H. (1973). Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. *Biology of Reproduction*, 8(5): 625-629.
- Yamada, K. (2013). Cobalt: its role in health and disease. Interrelations between essential metal ions and human diseases, *Met Ions Life Sci*, 13:295-320.
- Yunsang, C., & Wanxi, Y. (2011). Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, DOI: 10.4236/abb.2011.24029