

اثر غلظت‌های بالای مواد معدنی کم‌مصرف آلی و غیرآلی (روی، مس و منگنز) بر پروژسترون پلازما و عملکرد تولیدمثلی در گاوهای با فحلی مکرر

وحید غلامی^۱، حمید امانلو^{۲*}، داود زحمتکش^۳ و نیما صادقی^۴

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری تغذیه دام، استاد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

۴. دکتری تخصصی دامپزشکی، شرکت کشت و دامداری فکا، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۸)

چکیده

تعداد ۲۶۳ رأس گاو برگشت به فحلی مکرر (با متوسط تعداد زایش $2/9 \pm 0/7$ و روزهای شیردهی 193 ± 58) به تیمارهای آزمایشی اختصاص یافتند. تیمارها شامل ۱- تیمار شاهد (بدون ماده معدنی سرک)، ۲- تیمار حاوی سرک ۲۲۴۴ میلی‌گرم روی (سولفات روی)، ۲۹۵/۲ میلی‌گرم مس (سولفات مس) و ۴۸۰ میلی‌گرم منگنز (سولفات منگنز)، ۳- تیمار حاوی سرک ۲۲۴۴ میلی‌گرم روی آلی (روی-گلايسين)، ۲۹۵/۲ میلی‌گرم مس آلی (مس- گلايسين) و ۴۸۰ میلی‌گرم منگنز (منگنز- گلايسين) بودند. افزودنی مواد معدنی سرک به صورت روزانه تغذیه شد. پروتکل دبل اووسینک برای تلقیح اجباری استفاده شد. غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بین تیمارها تمایل به معنی‌داری ($P=0/09$) را نشان داد و در تیمارهای سرک نسبت به شاهد بالاتر بود. غلظت پروژسترون (P4) در روز ۱۱ پس از تلقیح تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0/05$). نسبت آبستنی به تلقیح مصنوعی (P/AI) (درصد) در اولین، مجموع اولین و دومین تلقیح در تیمارهای سرک آلی (CTM) و غیرآلی (ITM) بالاتر از شاهد بود (به ترتیب برابر $P=0/1$ و $P=0/13$). با توجه به نتایج این پژوهش افزایش سطح مواد معدنی کم‌مصرف انتخابی روی، مس و منگنز بالاتر از توصیه شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001)، در گاوهای برگشت به فحلی مکرر موجب بهبود باروری گردید.

واژه‌های کلیدی: باروری، برگشت به فحلی مکرر، پروژسترون، مواد معدنی کم‌مصرف.

Effect of high dietary zinc, copper and manganese concentration and source on plasma progesterone and reproductive performance in repeat breeder cows

Vahid Gholami¹, Hamid Amanlou^{2*}, Davood Zahmatkesh³ and Nima Sadeghi⁴

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

4. DVM, PhD in FKA Animal Husbandry and Agriculture Co., Irsfahan, Iran

(Received: Jul. 7, 2020 - Accepted: Feb. 6, 2021)

ABSTRACT

We used 263 Holstein repeat breeder dairy cows (193 ± 58 DIM) based on randomized complete design. Animals in control group (no supplementation), groups 2 and 3 supplemented with 2,244 mg of zinc, 295.5 mg copper and 480 mg manganese either inorganic trace minerals (ITM) and chelated (glycinates) trace minerals (CTM) sources, respectively. Supplemental minerals were fed daily as a top dress. All cows were inseminated according to Double-Ovsynch protocol. Super oxide dismutase concentration tended to have higher in CTM and ITM treatments than in control group ($P=0.09$). Progesterone concentration at day 11 after artificial insemination was higher in CTM and ITM treatments than in control group ($P<0.05$). Cows in CTM and ITM treatments tended to have greater odds of becoming pregnant at first and cumulative (first and second service) than cows in control group ($P=0.1$ and $P=0.13$ respectively). According to the results of this study, diets supplemented above National Research Council (NRC, 2001) requirements for zinc, copper and manganese in repeat breeding cows, improved fertility.

Keywords: Fertility, progesterone, repeat breeder, trace mineral.

* Corresponding author E-mail: amanlou@znu.ac

مقدمه

عارضه برگشت به فحلی مکرر (Repeat Breeder) به‌عنوان یکی از علل کاهش باروری و مسبب ضرر اقتصادی در گله‌های گاو شیری شناخته شده است. میزان وقوع از ۱۰ تا ۲۵ درصد در گله‌های شیری گزارش شد (Bartlett *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1983). مواد معدنی بخش کوچکی از جیره‌های خوراکی هستند اما کمبود آن‌ها پیامدهای بزرگی بر سلامت و تولیدمثل حیوانات نشان داد (Goff, 2014). تنش سبب اختلال در وظایف محور هیپوتالاموس-هیپوفیز و هیپوفیز-تخمدانی شده و اثر منفی بر تولیدمثل داشت (Dobson *et al.*, 2001). عوامل بسیاری چون تولید شیر بالا، ناهنجاری‌های متابولیکی پس از زایش، توازن منفی انرژی، تعاملات اجتماعی، حمل و نقل و تنش گرمایی به‌عنوان عوامل تنش‌زا در گاوهای پر تولید امروزی شدند (Rizzo *et al.*, 2007). تنش باعث تولید بیش از حد بتا اندورفین‌ها و رادیکال‌های آزاد به‌ویژه قطعات واکنش‌دهنده اکسیژن (ROS) مثل رادیکال هیدروکسیل (OH) رادیکال سوپراکسید (O_2) و سوپراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود. تولید زیادی رادیکال‌های آزاد در سلول‌های جسم زرد می‌تواند ساخت پروژسترون را تحت تأثیر قرار دهند. همچنین رادیکال‌های آزاد با فعال کردن فسفولیپاز A2 باعث آپوپتوزیس و تحلیل جسم زرد می‌شوند. مرگ زودرس رویانی به علت مقدار ناکافی هورمون پروژسترون بین روزهای ۴ تا ۷ پس از تلقیح یکی از علل اصلی کاهش باروری در گاوهای پر تولید با برگشت به فحلی مکرر است. افزایش زود هنگام پروژسترون باعث تغییر در ترشحات اندومتریوم و تشخیص بهتر آبستنی توسط مادر (اینترفرون تاو رویانی) در روزهای پس از هفتم لقاح شد (Diskin & Morris, 2008). گاوهای پر تولید به دلیل افزایش سوخت‌وساز کبدی پروژسترون، ممکن است دچار کاهش غلظت پروژسترون و اختلال در باروری شوند (Sangsrivong *et al.*, 2002). مس و روی نقش مهمی در تنظیم پروژسترون تولیدشده توسط

سلول‌های بافت جسم زرد از طریق آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) دارند (Noda *et al.*, 2012). سوپراکسید دیسموتاز نقش مهمی در حفظ جسم زرد و ترشح پروژسترون و افزایش باروری دارد (Noda *et al.*, 2012). سوپراکسید دیسموتاز شامل سه ایزو آنزیم روی-مس دیسموتاز (Cu Zn-SOD)، منگنز دیسموتاز (Mn-SOD, SOD2) و دیسموتاز خارج سلولی (SOD3) است (Okado *et al.*, 2001). غلظت روی پایین خون در گاوهای برگشت به فحلی گزارش شد (Barui *et al.*, 2015). منگنز در ساخت کلاسترول که پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی (استروژن، پروژسترون و تستسترون) است دخیل است (Sales *et al.*, 2012). اگرچه تنظیم جیره‌های خوراکی براساس توصیه شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001) کافی به نظر می‌رسد ولی زیست‌فراهمی مواد معدنی توسط عواملی چون اثر متقابل بین مواد مغذی در شکمبه، کاهش اشتها، محدودیت فراهمی خوراک، فضای ناکافی آخور، نوع علوفه و اختلالات جذب تحت تأثیر قرار گرفت (Bicalho *et al.*, 2014). سطح ۱/۶ و ۲/۷ برابری منگنز نسبت به برآوردهای شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001) برای گاوهای شیرده و خشک توصیه شد (Weiss *et al.*, 2005). استفاده از شکل آلی^۲ روی، مس و منگنز، بهبود پاسخ‌های هر دوی سیستم ایمنی ذاتی و همورال در گاوهای شیری را به‌دنبال داشت (Nemec *et al.*, 2012). نوتروفیل‌ها در گاوهایی که کمبود مس داشتند توانایی لازم برای از بین بردن میکروب‌های مهاجم را نداشت و آسیب‌پذیری بیشتر و عفونت‌های شدیدتر از جمله ورم پستان را به‌دنبال داشت (Scaletti *et al.*, 2003). نتایج یک فراتحلیل (متاآنالیز) انجام‌شده روی بیست پژوهش معتبر نشان داد که استفاده از شکل آلی مواد معدنی کم‌مصرف در گاوهای شیری کاهش روزهای باز، تعداد تلقیح به ازای آبستنی و احتمال آبستنی بالاتر در ۱۵۰ روز اول پس از زایش را نشان داد (Rabiee *et al.*, 2010). به دلیل وظایف آنتی‌اکسیدانی، مواد معدنی کم‌مصرف قادرند در تعدیل

گاوها براساس میزان شیر تولیدی، نمره وضعیت بدنی و تعداد زایش به تیمارهای مورد نظر اختصاص یافتند. جهت تشخیص آندومتریس تحت درمانگاهی، نمونه برداری رحمی توسط نمونه‌گیری از ترشحات پشت سرویکس با استفاده از سیتوبراش و سوند مخصوص و آزمون با نوار مخصوص Multistix 10 SG, Bayer (Corporation, Elkart, IN) انجام شد. براساس تغییر رنگ ایجاد شده طبق توصیه شرکت سازنده نوار، گاوها به دو گروه سالم و دارای اندومتریس تحت درمانگاهی تقسیم شدند و تنها گاوهای سالم وارد طرح شدند. گاوها به مدت حداقل یک ماه از شروع آزمایش، برای اطمینان از تغذیه حداقل سه هفته‌ای از سرک مواد معدنی مورد نظر (Ballantine *et al.*, 2002; Bach *et al.*, 2015) استراحت تولیدمثلی داشتند و سپس تحت پروتکل دبل اوسینک^۱ قرار گرفته و تلقیح شدند. در روز ۳۲ تا ۳۵ پس از تلقیح با استفاده از سونوگرافی تشخیص آستنی انجام شد. آنالیز کامل مواد معدنی کم‌مصرف پلاسما، خوراک و ترکیبات آنتاگونیستی مؤثر بر جذب (گوگرد، آهن و مولیبدن) در شروع آزمایش و به‌صورت دوره‌ای با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Variant Spectr AA 220، استرالیا) انجام شد. نمونه خون جهت تعیین غلظت پروژسترون و بررسی وضعیت اکسیداتیو خونی ۳ ساعت پس از خوراک‌دهی صبح از محل سیاهرگ دمی توسط لوله‌های هپارین‌دار تحت خلأ در روز شروع پژوهش، پیش از تزریق GnRH و روز تزریق PGF2 α از پروتکل همزمانی و روزهای ۵ و ۱۱ پس از تلقیح اخذ شد (Carvalho *et al.*, 2014). نمونه خون اخذشده در ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلاسمای جدا شده در دمای ۲۰- ذخیره شد. نیتروژن اوره‌ای خون و ظرفیت کل آنتی-اکسیدانی پلاسما براساس دستورالعمل شرکت تجاری رنداکس ساخت انگلستان (Randox Lablitoris, Crumlin, UK) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (PERKIN-ELMER 35) تعیین شد. غلظت پروژسترون نمونه‌های پلاسما در آزمایشگاه شرکت با

تنش اکسیداتیو در جهت کاهش ناهنجاری‌های متابولیکی و سیستم ایمنی نقش داشته باشند (Spears & Weiss, 2008). مقدار و منبع مواد معدنی کم‌مصرف در تنظیم و تعدیل جنبه‌های سوخت‌وساز تنش اثر گذار بود (Yasui *et al.*, 2009). اثر آنتاگونیستی مواد خوراکی، محیط، تنش، منبع مواد معدنی و سطح مکمل‌ها در تعیین نیاز توسط شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001) مورد توجه قرار نگرفت. در این میان ترکیبات نوظهور آلی مواد معدنی کم‌مصرف باند شده با کمپلکس اسیدهای آمینه و تک اسیدآمینه (کی‌لیت‌ها) با توجه به اثر قابل توجه آن‌ها در بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی (Jerry *et al.*, 2008) بدن می‌توانند به‌عنوان یک راه‌کار تغذیه‌ای کاهنده تنش ناشی از رادیکال‌های آزاد (Rizzo *et al.*, 2007) با اثر بر میزان و غلظت هورمون‌های تولیدمثلی در دام‌های با مشکل برگشت به فحلی مکرر مورد آزمون قرار گیرند. لذا هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های بالای مواد معدنی کم‌مصرف انتخابی روی، مس و منگنز از دو منبع آلی و غیرآلی بر غلظت پروژسترون پلاسما و عملکرد تولیدمثلی در گاوهای با فحلی مکرر بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در کشت و دامداری فکا اصفهان متعلق به سازمان تأمین اجتماعی از مهرماه ۹۷ تا خرداد ماه سال ۹۸ انجام شد. ۲۶۳ رأس گاو هلشتاین (زایش دو یا بالاتر) با متوسط تعداد زایش $2/9 \pm 0/7$ و روزهای شیردهی 193 ± 58 روز به‌صورت تصادفی به تیمارهای آزمایشی اختصاص یافتند (شاهد ۸۸ رأس، تیمار حاوی سرک ترکیبات غیرآلی مواد معدنی انتخابی ۸۶ رأس و تیمار حاوی سرک ترکیبات آلی مواد معدنی انتخابی ۸۹ رأس). ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی و غلظت مواد معدنی کم‌مصرف انتخابی روی، منگنز و مس در جدول‌های ۱ و ۲ ذکر شده‌اند. گاوهای برگشت به فحلی که کمینه سه بار تلقیح شده و از لحاظ عدم ترشحات غیرطبیعی و سابقه بیماری‌های تولیدمثلی، متابولیکی و سایر بیماری‌های عفونی تأیید شدند، وارد پژوهش شدند.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده جیره‌های آزمایشی

(براساس درصد ماده خشک)

Table 1. The ingredients of experimental treatments¹ (based on % DM)

Ingredient	Experimental treatments		
	Control	ITM	CTM
Alfalfa hay	10	10	10
Corn silage	25	25	25
Dried sugar beet pulp	2	2	2
Wheat straw	2.3	2.3	2.3
Ground, dry barley grain	25	25	25
Ground, dry corn grain	10	10	10
Cottonseed, whole with lint	3.3	3.3	3.3
Soybean meal, solvent	8.2	8.2	8.2
Extruded full-fat soybean	2	2	2
Canola meal	2.2	2.2	2.2
Meat meal	4	4	4
Fat Powder	1.5	1.5	1.5
Urea	0.5	0.5	0.5
Magnesium oxide	0.3	0.3	0.3
Calcium Carbonate	0.85	0.85	0.85
Calcium phosphate-Di	0.3	0.3	0.3
Salt	0.4	0.4	0.4
Sodium bicarbonate	1.3	1.3	1.3
Vitamin premix ²	0.25	0.25	0.25
Mineral premix ³	0.25	0.25	0.25
Bentonite	0.3	0.3	0.3
Methionine	0.05	0.05	0.05
Zinc sulfate	-	0.027	-
Manganese sulfate	-	0.005	-
Copper sulfate	-	0.004	-
Zinc-Glycinate	-	-	0.033
Manganese -Glycinate	-	-	0.007
Copper-Glycinate	-	-	0.005

۱. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (بدون افزودنی مواد معدنی کم‌مصرف)، تیمار حاوی سرک ترکیبات غیرآلی (سولفات) مواد معدنی روی، مس و منگنز، حاوی سرک ترکیبات آلی (گلايسينات) مواد معدنی روی، مس و منگنز بود.

۱. Experimental treatments were control group (no supplementation); ITM: Inorganic trace minerals (Sulfate) Zn, Mn and Cu; CTM: Chelated trace minerals (Glycinate) Zn, Mn and Cu.

۲. مکمل ویتامینه و معدنی شامل:

2,000,000 IU of vitamin A/kg, 550,000 IU of vitamin D/kg, and 4,000 IU of vitamin E/kg 220 mg of Co/kg, 11,000 mg of Cu/kg, 360 mg of I/kg, 22,500 mg of Mn/kg, 100 mg of Se/kg, 24,000 mg of Zn/kg.

جدول ۲. ترکیب شیمیایی تیمارهای آزمایشی

Table 2. The chemical composition of experimental treatments¹

Chemical composition	Experimental treatments		
	Control	ITM	CTM
NEL (Mcal/kg)	1.6	1.6	1.6
Crude protein (% DM)	16	16	16
RDP (% DM)	10.4	10.4	10.4
RUP (% DM)	5.6	5.6	5.6
NDF (% DM)	29.5	29.5	29.5
ADF (% DM)	20.3	20.3	20.3
NFC (% DM)	42.3	42.3	42.3
EE (% DM)	5.5	5.5	5.5
Ca (% DM)	0.95	0.95	0.95
P (% DM)	0.55	0.55	0.55
Mg (% DM)	0.3	0.3	0.3
S (% DM)	0.22	0.22	0.22
Zn (mg/kg)	69	154	154
Mn (mg/kg)	60	79	79
Cu (mg/kg)	16.5	39	39
DCAD	+255	+255	+255

۱. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (بدون افزودنی مواد معدنی کم‌مصرف)، تیمار حاوی سرک ترکیبات غیرآلی (سولفات) مواد معدنی روی، مس و منگنز، حاوی سرک ترکیبات آلی (گلايسينات) مواد معدنی روی، مس و منگنز بود.

۱. Experimental treatments were control group (no supplementation); ITM: Inorganic trace minerals (Sulfate) Zn, Mn and Cu ; CTM: Chelated trace minerals (Glycinate) Zn, Mn and Cu.

دستگاه الیزا (Vital Scientific NV, DIERN,)

(Netherland) و استفاده از کیت شماره EIA-1561

ساخت مؤسسه DRG کشور آلمان تعیین شد. غلظت

آنزیم‌های اسپاراتات آمینوترانسفراز^۱ و آلکالین

فسفاتاز^۲، سرولوپلاسمین و سوپراکسید دیسموتاز^۳ با

استفاده از کیت‌های رندوکس و دستگاه اتوانالایزر

مدل BT1500 تعیین شد (Rizzo *et al.*, 2007;)

داده‌های جمع‌آوری شده با (Bicalho *et al.*, 2014).

نرم‌افزار Excel مرتب‌شده و تجزیه و تحلیل داده‌ها

توسط نرم‌افزار SAS ویرایش ۹/۴ و با استفاده از رویه

Mixed انجام شد. برای اندازه‌گیری‌های مکرر از رویه

(Repeated measure) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها

با آزمون توکی انجام شد. آنالیز درصد آبستنی گاوها

تا روز ۱۸۰ شیردهی، گیرایی در اولین تلقیح و مجموع

اول و دومین تلقیح با بهره‌گیری از رگرسیون

لجستیک^۴ و با استفاده از رویه GLIMMIX انجام شد.

مدل آماری اندازه‌گیری‌های مکرر به‌صورت زیر است:

$$Y_{ijkl} =$$

$$\mu + T_i + P_j + B_k + C(T_i) + (T \times P)_{ij} + (T \times B)_{ik} + \beta(x_{ij} - \bar{X}) + e_{ijkl}$$

$$= Y_{ijkl} \text{ مقدار هر مشاهده}$$

$$\mu = \text{میانگین}$$

$$= T_i \text{ اثر تیمار}$$

$$= P_j \text{ اثر دوره (دوره نمونه‌گیری)}$$

$$= B_k \text{ اثر بلوک (دوره شیردهی)}$$

$$= C(T_i) \text{ اثر تصادفی گاو در تیمار (عامل تصادفی)}$$

$$= (T \times P)_{ij} \text{ اثر متقابل تیمار و دوره}$$

$$= (T \times B)_{ik} \text{ اثر متقابل تیمار و بلوک}$$

$$= \beta(x_{ij} - \bar{X}) \text{ اثر کوواریت (داده‌های شروع آزمایش)}$$

$$= e_{ijkl} \text{ اثر باقیمانده}$$

سطح معنی‌داری با $P < 0.05$ و تمایل به

معنی‌داری در صفات غیرتولیدمثلی با $P < 0.1$ و در

صفات تولیدمثلی $P < 0.15$ در نظر گرفته شدند

(Ayres *et al.*, 2013).

1. Aspartate aminotransferase

2. Alkaline phosphatase

3. Superoxide dismutase

4. Logistic regression

نتایج و بحث

(Faulkner *et al.*, 2017a). مشاهده نشد که در توافق با نتایج این پژوهش بود. غلظت منگنز پلاسما در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به ترتیب ۱۵/۵۰، ۱۵/۳۰ و ۱۶/۴ نانوگرم در میلی لیتر بود (جدول ۳)، که بین تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P=0/22$). غلظت روی، مس و منگنز جیره پایه در این پژوهش به ترتیب برابر ۶۹، ۶۰ و ۱۶/۵ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک بود و در تیمارهای سرک به ۱۵۴، ۷۹ و ۳۹ میلی گرم در کیلوگرم رسید (Faulkner *et al.*, 2017a; Weiss, 2017). در پژوهشی غلظت‌های ۸۶، ۸۱ و ۲۲ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک از روی، منگنز و مس از دو منبع سولفات و هیدروکسی کلراید با دو منبع علوفه و فراورده‌های جانبی مورد آزمون از نظر اثر بر میکروبیوم شکمبه‌ای، روده‌ای و عملکردی قرار گرفت. نتایج نشان داد، منبع مواد معدنی کم مصرف و نوع فیبر می‌تواند قابلیت دسترسی منگنز و مس را تحت تأثیر قرار دهد که بایستی در تنظیم جیره مورد توجه قرار گیرد (Faulkner *et al.*, 2017b). غلظت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز پلاسما در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به ترتیب ۱۲۱/۱، ۱۲۴/۲ و ۱۲۸/۸ واحد در لیتر بود (جدول ۳).

غلظت روی، مس و منگنز دو برابر مقادیر توصیه شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001) و طبق توصیه‌های جدید پژوهش‌گران تنظیم و تغذیه شد (Faulkner *et al.*, 2017a; Weiss, 2017). غلظت روی پلاسما در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به ترتیب ۱/۵۷، ۱/۶۴ و ۱/۷۲ میکروگرم در میلی لیتر بود (جدول ۳)، که بین تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P=0/80$). تغذیه اضافی مقدار ۸۰۰ میلی گرم روی در مدت ۶ هفته پایانی دوره آبستنی در گاوهای خشک (با غلظت پایه‌ای ۱۰۲ میلی گرم در کیلوگرم روی) با کاهش فاصله روزهای تا اولین فحلی و نوبت تلقیح همراه بود (Miller *et al.*, 1989). غلظت مس پلاسمایی تیمارهای ۱ تا ۳ به ترتیب ۱/۰۶، ۱/۱۰ و ۱/۱۵ میکروگرم در میلی لیتر بود (جدول ۳). که بین تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P=0/69$). که به احتمال نشان داد که سطح روی و کلسیم جیره غذایی تغذیه شده این پژوهش مشکلی در سوخت‌وساز مس ایجاد نکرده است. در چند پژوهش انجام شده تفاوتی در غلظت پلاسمایی مس خون با استفاده از کی‌لیت‌های آلی مواد معدنی در مقایسه با غیرآلی (سولفات) (Kinal *et al.*, 2005) و منابع سولفات با هیدروکسی کلراید

جدول ۳. اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت روی، منگنز و مس پلاسما، سروپلاسمین، آلکالین فسفاتاز، سوپراکسید دیسموتاز، نیتروژن اوره‌ای شیر و شمار سلول‌های بدنی

Table 3. The effects of experimental treatments on plasma Zn, Mn and Cu concentrations, Ceruloplasmin, ALP, AST, SOD, MUN and SCC.

Items	Experimental treatments				
	Control	ITM	CTM	SEM ^a	P-value
Zn, Plasma, (µg/ml)	1.57	1.64	1.72	0.14	0.8
Cu, Plasma, (µg/ml)	1.06	1.10	1.15	0.05	0.69
Mn, Plasma, (ng/ml)	15.5	15.3	16.4	2.07	0.22
Ceruloplasmin, (mg/L)	204.8	210.5	215	10	0.6
Superoxide dismutase (U/L)	121.1	124.1	127.8	3.05	0.09
Total antioxidant capacity (U/L)	1.71	1.82	1.88	0.08	0.12
Alkaline phosphatase (U/L)	122	115.9	105.9	8.8	0.18
Aspartate aminotransferase (U/L)	96.8	93.2	85.9	6	0.19
SCC, 10 ³ /mL	377.5 ^a	313.5 ^{ab}	172.9 ^b	59.5	0.04
MUN, mg/dl	14.82	14.25	14.7	0.43	0.40

تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (بدون افزودنی مواد معدنی کم مصرف)، تیمار حاوی سرک ترکیبات غیرآلی (سولفات) مواد معدنی روی، مس و منگنز، حاوی سرک ترکیبات آلی (گلیسینات) مواد معدنی روی، مس و منگنز بود.

a و b: در هر سطر اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می‌دهد.

*: خطای استاندارد میانگین‌ها.

Experimental treatments were control group (no supplementation); ITM: Inorganic trace minerals (Sulfate) Zn, Mn and Cu; CTM: Chelated trace minerals (Glycinate) Zn, Mn and Cu.

a, b) There was a significant difference between treatments in each row ($P \leq 0.05$).

*: Standard error of means.

برابر ۱۲۲، ۱۱۵/۹ و ۱۰۵/۹ واحد در لیتر بود (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P=0/18$). هم‌چنین غلظت آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب برابر ۹۶/۸، ۹۳/۲ و ۸۵/۹ واحد در لیتر بود (جدول ۳). تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. عملکرد بهتر کبدی در استفاده از کمپلکس آمینواسیدها می‌تواند به‌واسطه درجات پایین‌تری از تنش اکسیداتیو و التهاب کبدی باشد که فرایند متابولیسمی مثل گلوکونئوز را بالا برده و در نهایت باعث افزایش گلوکز پلاسما شد (Overton & Yasui, 2014). با افزایش روی در خون، میزان فعالیت ALP افزایش و با کمبود روی، فعالیت ALP کاهش یافت (Suttle, 2010). میانگین شمار سلول‌های بدنی شیر (جدول ۳) در هر میلی‌لیتر در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب ۳۷۷/۵، ۳۱۳/۵ و ۱۷۲/۹ هزار در هر میلی‌لیتر بود. تجزیه واریانس داده‌ها معنی‌داری را در بین تیمارها نشان داد ($P=0/04$) و در تیمارهای سرک پایین‌تر بود. نتایج مثبت این کاهش در بهبود آبستنی مشاهده شد (جدول ۴). ورم پستان درمانگاهی و تحت درمانگاهی در اوایل شیردهی باعث تولید اندوتوکسین و واسطه‌های التهابی، افزایش غلظت پروستاگلاندین‌ها و به‌ویژه $PGF2\alpha$ و مواد التهاب‌زا شده و تحلیل جسم زرد، تغییر و اختلال در چرخه فحلی، سقط‌جنین، اثر منفی بر زنده‌مانی رویان ناشی از بالا بودن تعداد سلول‌های بدنی (Moore et al., 2005)، طولانی‌شدن فاز فولیکولار و تأخیر در از سرگیری چرخه فحلی در پس از زایش شدند (Huszenicza et al., 2005). استفاده از پروتئینات- روی در مقایسه با اکسید روی کاهش بروز عفونت‌های داخل پستانی و شمار سلول‌های بدنی در گاوهای شیرده را به‌دنبال داشت (Spine, 1993)، که با پژوهش حاضر همسو است. استدلال بر این است که پروتئینات- روی با افزایش ساخت کراتین در مجاری پستانی می‌تواند در بهبود مقاومت به عفونت‌های پستانی مؤثر باشد. افزایش

تجزیه واریانس داده‌ها تمایل به معنی‌داری را در بین تیمارها نشان داد ($P=0/09$)، که با برخی پژوهش‌ها همسو بود (Faulkner et al., 2017a). رادیکال‌های آزاد (ROS) تولید شده در شرایط تنش، اثر مخربی بر ترشح پروژسترون تولید شده توسط سلول‌های جسم زرد داشتند (Rizzo et al., 2007). تولید شیر بالا خود ممکن است یکی از عوامل تنش‌زا در گاوهای شیری باشد (Rizzo et al., 2007). زیست‌فراهمی بالاتر مواد معدنی آلی و سطوح بالاتر برخی مواد معدنی کم‌مصرف (روی، مس و منگنز) به احتمال اثر مثبتی بر چندین واکنش بیولوژیکی شناخته‌شده‌ای که نیازمند مواد معدنی کم‌مصرف هستند، دارد (NRC, 2001). غلظت سرولوپلاسمین در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب برابر ۲۰۴/۸، ۲۱۰/۵ و ۲۱۵ میلی‌گرم در لیتر بود (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P=0/06$). سنجش مس از طریق آنزیم‌های فعال، پروتئین سرولوپلاسمین و غلظت خونی مس به عنوان شاخص‌های تعیین وضعیت مس پیشنهاد شده‌اند (Weiss, 2017).

غلظت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب برابر ۱/۷۱، ۱/۸۲ و ۱/۸۸ واحد در لیتر بود (جدول ۳). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P=0/12$). اما از لحاظ عددی در تیمارهای سرک بالاتر بود. زیست‌فراهمی بالاتر مواد معدنی آلی کم‌مصرف شاید محرک بهتری برای عملکرد کبدی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی آن به‌ویژه در دوره انتقال باشد (Spears & Weiss, 2008). تغییر در میکروبیوم شکمبه‌ای و روده‌ای می‌تواند پیامدهای قابل توجهی برای هضم و عملکرد سیستم ایمنی داشته باشد در این میان نقش منبع مواد معدنی کم‌مصرف در تغییر جمعیت باکتریایی، بایستی مورد توجه گیرد (Faulkner et al., 2017b). غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب

پروژسترون در زمان تزریق $PGF2\alpha$ به ترتیب برابر ۴/۳۱، ۴/۵ و ۵/۲۵ نانوگرم در میلی لیتر بود (جدول ۴) که تفاوت معنی داری را از لحاظ آماری نشان نداد. اما از نظر عددی در تیمارهای حاوی سرک بالاتر بود. تأخیر در افزایش پروژسترون در اوایل فاز لوتئال (غلظت پروژسترون در روزهای ۴ و ۵ بعد از تلقیح مصنوعی) در گاوهای پرتولید باعث کاهش قابلیت آبستن شدن شد (Wathes *et al.*, 2003). در این موارد مادر حضور جنین را تشخیص می دهد اما به دلیل تأخیر در بلوغ جنین (به دلیل کاهش غلظت پروژسترون در اولین ۷ روز پس از لقاح) جنین قادر به ادامه آبستنی نیست. همبستگی مثبتی بین غلظت پروژسترون در ۷ روز اول پس از تلقیح و آبستنی گزارش شد (Law *et al.*, 2009)، که این فرضیه را تقویت می کند. افزایش زود هنگام پروژسترون در روزهای ۴ تا ۷ پس از لقاح، باعث افزایش شانس آبستنی به واسطه تغییر در ترشحات اندومتریم (هیستوتروف)، تحریک توسعه رویانی و تشکیل رویان بزرگ تر می شود. وجود رویان بزرگ تر به شناسایی بهتر آبستنی توسط مادر (اینترفرون تاو رویانی) در روزهای پس از روز هفتم کمک می کند (Diskin & Morris, 2008).

میزان روی تا ۶۳ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک، باعث کاهش سلول های بدنی شیر و کاهش غلظت آمیلوئید A یا پروتئین فاز حاد شد و تولید شیر را افزایش داد (Cope *et al.*, 2009). نقش پروژسترون در آبستنی مسلم و انکار ناپذیر است (Noda *et al.*, 2012; Sangsritavong *et al.*, 2002). تیمارهای حاوی سرک (آلی و غیرآلی) ترکیبات مواد معدنی کم مصرف دارای بالاترین غلظت پروژسترون در روزهای پیش و پس از تلقیح نسبت به شاهد بودند که این میزان در روز ۱۱ پس از تلقیح قابل ملاحظه و معنی دار بود ($P=0/04$). غلظت های بالاتر پروژسترون در زمان توسعه فولیکولی، باعث کاهش پالس های متناوب LH شد که به احتمال با بهبود در قابلیت فولیکول غالب، کیفیت اووسیت های بارور شده و کیفیت شرایط محیطی رحم همراه شد (Pursley & Martins, 2012). کاهش درصد تعداد گاوهای با غلظت پایین پروژسترون (کمتر از ۰/۵ نانوگرم در میلی لیتر) و غلظت بالا (بیشتر از ۳ نانوگرم در میلی لیتر) در زمان تزریق $PGF2\alpha$ از پروتکل در تیمارهای حاوی سرک نسبت به گروه شاهد در این پژوهش مشاهده شد، که با بهبود باروری آنها نیز همراه بود. در پژوهش حاضر غلظت

جدول ۴. اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد تولیدمثلی، شانس آبستنی و غلظت پروژسترون در گاوهای تغذیه شده با منابع متفاوت مواد معدنی کم مصرف

Table 4. The effect of experimental treatments on progesterone concentration, odds ratio and reproductive performance of dairy cows as affected by type of trace mineral supplementation

Items	Experimental treatments				P- value
	Control	ITM	CTM	SEM [*]	
Total no. cows	88	86	89		
Conception rate at 1st service (%)	22.7 (20)	33.7 (29)	37 (33)	0.05	0.1
Odds ratio (95% CI)	Reference	-	2 (1.04-3.87)	-	0.04
	Reference	1.16 (0.62-2.15)	-	-	0.65
Cumulative conception rate at 1st and 2nd service (%)	29.5 (26)	40.7 (35)	43.8 (39)	0.06	0.13
Odds ratio (95% CI)	Reference	-	1.86 (1-3.46)	-	0.05
	Reference	1.63 (0.87-3.06)	-	-	0.12
Pregnancy loss between 32 and 60 d after AI, % (no. not pregnant at 60 d/ no. pregnant at 32 d)	11.2 (3/27)	8.4 (3/36)	4.9 (2/41)	0.04	0.6
Progesterone (ng/ml)					
At 5 day after artificial insemination	0.86	0.95	1.20	0.19	0.14
At 11 day after artificial insemination	3.28 ^b	3.47 ^{ab}	4.2 ^a	0.28	0.04

تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (بدون افزودنی مواد معدنی کم مصرف)، تیمار حاوی ترکیبات غیرآلی (سولفات) Zn، Mn و Cu، مس و منگنز، حاوی سرک ترکیبات آلی (گلايسينات) مواد معدنی روی، مس و منگنز بود.

a و b: در هر سطر اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می دهد.

*: خطای استاندارد میانگین ها.

Experimental treatments were control group (no supplementation); ITM: Inorganic trace minerals (Sulfate) Zn, Mn and Cu; CTM: Chelated trace minerals (Glycinate) Zn, Mn and Cu.

a, b: There was a significant difference between treatments in each row ($P \leq 0.05$).

*: Standard error of means.

تیمارهای حاوی روی، مس و منگنز از منابع غیرآلی (سولفات) در مقابل جایگزینی ۳۶۰ میلی‌گرم روی، ۲۰۰ میلی‌گرم منگنز و ۱۲۵ میلی‌گرم مس از منابع آلی مشاهده شد (Ballantine *et al.*, 2002). در پژوهشی (Nocek *et al.*, 2006) تغذیه ترکیبی مواد معدنی آلی و غیرآلی (C/I) (در سطح ۱۰۰ درصد مقدار موردنیاز توصیه‌شده روی و مس و ۹/۱ و ۳/۳ برابر کبالت و منگنز توسط (NRC, 2001)، ۱۰۰ درصد آلی یا ۱۰۰ درصد ترکیب غیرآلی شوری تحقیقات ملی (NRC, 2001) و یا ترکیب آلی معادل ۷۵ درصد مقدار موردنیاز توصیه‌شده توسط شوری تحقیقات ملی (NRC, 2001) انجام شد. این پژوهش‌گران ۷۰/۶ درصد آبستنی (گاوه‌های دوره دوم شیردهی) در تیمار ترکیبی (C/I) مواد معدنی آلی (Complexed trace minerals) و غیرآلی (Sulfate) و میانگین ۶۱ درصد گاو آبستن (در ۱۵۰ روز شیردهی) در سایر تیمارها گزارش کردند. نکته مهم آن پژوهش این بود که در تیمار ترکیبی مواد معدنی آلی و غیرآلی (C/I)، سطح کبالت ۹/۱ و منگنز ۳/۳ برابر توصیه شوری تحقیقات ملی (NRC, 2001) بود. این پژوهش‌گران بهبود در باروری را به غلظت بالاتر منگنز خون ربط دادند، زیرا منگنز در ساخت کلاسترول که پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی (استروژن، پروژسترون و تستسترون) است، دخیل است و همچنین جسم زرد حاوی مقادیر بالایی منگنز است. سطح مکمل منگنز جیره توانست بر غلظت آن اثر گذار باشد (Sales *et al.*, 2012). این پژوهش‌گران جایگزینی ۷۵ درصد مواد معدنی با منبع آلی به جای ۱۰۰ درصد از منابع غیرآلی (سولفات) طبق مقدار موردنیاز توصیه‌شده شوری تحقیقات ملی (NRC, 2001) را بدون هیچ‌گونه کاهشی در عملکرد گزارش کردند. کمبود مس نیز با تاخیر در بلوغ و کاهش میزان باروری و مرگ رویانی در بزها همراه بود (Nix, 2002). استفاده روی، مس و منگنز با منبع آلی (Chelate) در ۱۵ گله و تعداد ۲۸۸۰ رأس گاو تغذیه شده به مدت حداقل ۱ ماه، با شانس آبستنی بالاتر در اولین و تمایل به آبستنی بالاتر در تلقیح دوم در تیمار کی‌لیت نسبت به تیمار شاهد همراه بود (Bach *et al.*, 2015). مجموع آبستنی در

گاوه‌های با غلظت پروژسترون کم‌تر از ۱ نانوگرم در میلی‌لیتر در روز ۵ پس از جفت‌گیری دارای درصد آبستنی کم‌تر از ۱۰ درصد بودند (Starbuck *et al.*, 2001) که با نتایج پژوهش حاضر همسو است. جایگزینی بخشی یکسانی از مواد معدنی کم‌مصرف موردنیاز غیرآلی (روی، مس، منگنز و کبالت) با منابع آلی (Zn-methionine, Mn-methionine, Cu-lysine & Co-glucoheptanate) از دوره خشکی تا زمان شروع دوره تولیدمثلی اثری روی غلظت پروژسترون نداشت نکته حائز اهمیت در آن پژوهش (Hackbart *et al.*, 2010) تمایل به جسم زرد کوچک‌تر (۱۶/۷ در مقابل ۱۹/۱ میلی‌متر) در تیمار مواد معدنی آلی نسبت به شاهد بود اما اوج غلظت پروژسترون (۵/۰۱ در مقابل ۴/۸۷ نانوگرم در میلی‌لیتر) بین تیمارها را تحت تأثیر قرار نداد که نشان داد که شاید سهم عوامل دیگری در کنار اندازه جسم زرد در مقدار پروژسترون تولیدی باید دیده شود. مس و روی تولید پروژسترون را با کنترل فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های لوتئال تنظیم می‌کنند. روی نقش مستقیمی در سازمان‌دهی مجدد فولیکول‌های تخمدانی و متعاقب آن تولید هورمون پروژسترون از جسم زرد دارد (Kendall *et al.*, 2006). بیشتر پژوهش‌های اخیر انجام شده با غلظت‌های بالاتر از توصیه‌شده توسط شوری تحقیقات ملی (NRC, 2001) از منابع مختلف روی، منگنز و مس با رویکرد تولیدی و اثر بر قابلیت هضم انجام شده ولی بحث تولیدمثل مدنظر قرار نگرفته است (Daniel *et al.*, 2017a; Faulkner *et al.*, 2020). گیرایی در اولین تلقیح مصنوعی (P/AI)^۱ در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به‌ترتیب برابر ۲۲/۷ (۲۰ از ۸۸)، ۳۳/۷ (۲۹ از ۸۶) و ۳۷ (۳۳ از ۸۹) درصد بود و این صفت در بین تیمارها تمایل به معنی‌داری را نشان داد و در تیمارهای سرک نسبت به شاهد بالاتر بود. میانگین باروری کل گاوه‌های مورد بررسی در اولین تلقیح ۳۱/۲۸ درصد بود. میزان ۴۲/۷ و ۵۴/۸ درصد آبستنی تا روز ۱۵۰ شیردهی در

معدنی غیرآلی بود که تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/68$). احتمال آبستنی در گاوهای تغذیه‌شده با جیره سرک آلی ۱/۹ برابر ($Odds\ ratio=1/86$) گروه شاهد بود که معنی‌دار بود ($P=0/05$). دلایل این بهبود در بحث پروژسترون و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز انجام شد. ابعاد زیادی از مکانیسم‌های مؤثر مسئول بهبود پتانسیل باروری در زمان استفاده از مواد معدنی کم‌مصرف هنوز ناشناخته باقی‌مانده است (Bach *et al.*, 2015).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد افزایش زود هنگام پروژسترون در ۱۰ روز اول پس از لقاح با بهبود آبستنی به تلقیح (P/AI) در گاوهای برگشت به فحلی مکرر در شرایط این پژوهش همراه بود. افزودن مواد معدنی کم‌مصرف روی، مس و منگنز به صورت سرک، بالاتر از توصیه‌های شورای تحقیقات ملی (NRC, 2001) از دو منبع آلی و غیرآلی باعث بهبود باروری در گاوهای برگشت به فحلی شد.

اولین و دومین تلقیح در تیمارهای پژوهشی شاهد، سرک مواد معدنی سولفات و سرک مواد معدنی آلی به ترتیب برابر ۲۹/۵ (۲۶ از ۸۸)، ۴۰/۷ (۳۵ از ۸۶) و ۴۳/۸ (۳۹ از ۸۹) درصد بود ($P=0/12$) (جدول ۴). این صفت در بین تیمارها تمایل به معنی‌داری را نشان داد و در تیمارهای سرک نسبت به شاهد بالاتر بود. میانگین باروری کل گاوهای مورد بررسی در مجموع اولین و دومین سرویس تلقیح ۳۸ درصد بود. از آنجایی که داده‌های ناپیوسته (آبستن شدن و یا آبستن نشدن) دارای توزیع Binomial هستند آزمون Chi-Square و مقایسه میانگین دو به دو بین تیمارها انجام شد. در مجموع درصد آبستنی متعاقب اولین و دومین تلقیح (جدول ۴) نشان داد که احتمال آبستنی در گاوهای تغذیه‌شده با سرک مواد معدنی غیرآلی ۱/۶ برابر ($Odds\ ratio=1/63$) گروه شاهد بود که تمایل به معنی‌داری را نشان داد ($P=0/12$). احتمال آبستنی در گاوهای تغذیه‌شده با سرک مواد معدنی آلی ۱/۲ برابر ($Odds\ ratio=1/16$) گاوهای سرک مواد

REFERENCES

1. Ayres, H., Ferreira, R.M., Cunha A.P., Araújo, R.R. & Wiltbank, M.C. (2013). Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology*, 79, 159-164.
2. Bach, A., Pinto, A.B. & Blanch, M. (2015). Association between chelated trace mineral supplementation and milk yield, reproductive performance, and lameness in dairy cattle. *Livestock Science*, 182, 69-75.
3. Ballantine, H. T., Socha, M. T., Tomlinson, D. J., Johnson, A. B., Fielding, A. S., Shearer, J. K. & van Amstel, S. R. (2002). Effects of feeding complexed zinc, manganese, copper and cobalt to late gestation and lactating dairy cows on claw integrity, reproduction and lactation performance. *The Professional Animal Scientist*, 18, 211-218.
4. Bartlett, P.C., Kirk, J.H. & Mather, E.C. (1986). Repeated insemination in Michigan Holstein Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology*, 26, 309-322.
5. Barui, A., Batabyal, S., Ghosh, S., Saha, D. & Chattopadhyay, S. (2015). Plasma mineral profiles and hormonal activities of normal cycling and repeat breeding crossbred cows: a comparative study. *Veterinary World*, 8, 42-45.
6. Bicalho, M. L., Lima, F. S., Ganda, E. K., Foditsch, C., Meira, E. B., Machado, V. S., Teixeira, A. G., Oikonomou, G., Gilbert, R.O. & Bicalho, R. C. (2014). Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97, 4281-4295.
7. Carvalho, P. D., Guenther, J. N., Fuenzalida, M.J., M. C., Amundson., Wiltbank. M. C. & Fricke, P. M. (2014). Presynchronization using a modified Ovsynch protocol or a single GnRH injection 7 d before an Ovsynch-56 protocol for submission of lactating dairy cows for first timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*, 97, 1-11.
8. Cope, C.M., Mackenzie, A.M., Wilde, D. & Sinclair, L.A. (2009). Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *Journal of Dairy Science*, 92, 2128-2135.
9. Daniel, J. B., Kvidera, S. K. & Martín-Tereso, J. (2020). Total-tract digestibility and milk productivity of dairy cows as affected by trace mineral sources. *Journal of Dairy Science*, 103, 2020-18754.
10. Diskin, M.G. & Morris, D.G. (2008). Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 260-267.

11. Dobson, H., Tebble, J.E., Smith, R.F. & Ward, W.R. (2001). Is stress really that important? *Theriogenology*, 55, 65-73.
12. Faulkner, M. J., St-Pierre, N. R & Weiss, W. P. (2017a). Effect of source of trace minerals in either forage- or by-product-based diets fed to dairy cows: 2. Apparent absorption and retention of minerals. *Journal of Dairy Science*, 100, 5368-5377.
13. Faulkner, M. J., Wenner, B. A., Solden L. M. & Weiss, W. P. (2017b). Source of supplemental dietary copper, zinc, and manganese affects fecal microbial relative abundance in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 1037-1044.
14. Goff, J.P. (2014). Calcium and magnesium disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30, 359-381.
15. Hackbart, K. S., Ferreira, R. M., Dietsche, A. A., Socha, M. T., Shaver, R. D., Wiltbank, M. C. & Fricke, P. M. (2010). Effect of dietary organic zinc, manganese, copper, and cobalt supplementation on milk production, follicular growth, embryo quality, and tissue mineral concentrations in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 88, 3856-3870.
16. Huszenicza, G. F., Janosi, S. & Peters A. R. (2005). Effects of clinical mastitis on ovarian function in postpartum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 199-204.
17. Spears, J. W. & Weiss, W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows, *Veterinary Journal*, 176, 70-76.
18. Kendall, N. R., Marsters, P., Guo, L., Scaramuzzi, R. J. & Campbell, B. K. (2006). Effect of copper and thiomolybdates on bovine theca cell differentiation in vitro. *Journal Endocrinology*, 189, 455-463.
19. Kinal, S., Korniewicz, A., Jamroz, D., Zieminski, R. & Slupezynska, M. (2005). Dietary effects of zinc, copper and manganese chelates and sulphates on dairy cows. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 3, 168-172.
20. Law, R.A., Young, F., Patterson, D., Kilpatrick, D., Wylie, A. & Mayne, C. (2009). Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. *Journal of Dairy Science*, 92, 1001-1012.
21. Miller, W. J., Amos, H. E., Gentry, R. P., Blackmon, D. M., Durrance, R. M., Crowe, C.T., Fielding, A. S. & Neathery, M. W. (1989). Long-term feeding of high zinc sulfate diets to lactating and gestating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1499-508.
22. Moore, D. A., Overton, M. W., Chebel, R. C., Truscott, M. L. & BonDurant, H. (2005). Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *Journal of The American Veterinary Medical Association*, 226, 1112-1118.
23. Nemeč, L. M., Richards, J. D., Atwell, C. A., Diaz, D. E., Zanton, G. I. & Gressley, T. F. (2012). Immune responses in lactating Holstein cows supplemented with Cu, Mn, and Zn as sulfates or methionine hydroxyanalogue chelates. *Journal of Dairy Science*, 95, 4568-4577.
24. Nix, J. (2002). Trace minerals important for goat reproduction. *Sweetlix Livestock Supplement System*. www.sweetlix.com/media.
25. Nocek, J. E., Socha, M. T. & Tomlinson, D. J. (2006). The effect of trace mineral fortification level and source on performance of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, 2679-2693.
26. Noda, Y., Ota, K., Shirasawa, T., Takahiko. & Shimizu, T. (2012). Copper/Zinc Superoxide Dismutase Insufficiency Impairs Progesterone Secretion and Fertility in Female Mice. *Biology of Reproduction*, 86(16), 1-8.
27. NRC. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
28. Okado-Matsumoto, A. & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 38388-38393.
29. Overton, T. R. & Yasui, T. (2014). Practical applications of trace minerals for dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 92, 416-426.
30. Pursley, J. R. & Martins, J. P. (2012). Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, 267-71.
31. Rabiee, A. R., Lean, I. J., Stevenson, M. A. & Socha, M. T. (2010). Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93, 4239-4251.
32. Rizzo, A., Minoia, G., Trisolini, C., Manca, R. & Sciorsci, R. L. (2007). Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. *Animal Reproduction Science*, 100, 257-263.
33. Sales, J.N., Pereira, S., Bicalho, R.V.V. & Baruselli, P.S. (2011). Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (Bos indicus × Bos taurus) synchronized for timed embryo transfer. *Livestock Science*, 142, 59-62.
34. Sangsritavong, S., Combs, D.K., Sartori, R., Armentano, L. & Wiltbank, M.C. (2002). High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and 17 β-estradiol in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 2831-2842.

35. Scaletti, R. W., Trammell, D. S., Smith, B. A. & Harmon, R. J. (2003). Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86, 1240-1249.
36. Sharma, N.C., Luktuke, S.N. & Gupta, S.K. (1983). Incidence of repeat breeding in crossbred cows. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 3, 110-112.
37. Spain, J. 1993. Tissue integrity: a key defense against mastitis infection: the role of zinc proteinates and a theory for mode of action. In: Lyons, T.P. (Ed.), *Biotechnology in the Feed Industry*. In: *Proceedings of the 9th Annual Symposium*. Alltech Technical Publication, Nicholasville, KY, USA, pp. 53-58.
38. Spears, J. W. & Weiss, W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Veterinary Journal*, 176, 70-76.
39. Starbuck, G. R., Darwash, A. O., Mann, G. E. & Lamming, G. E. (2001). The detection and treatment of post insemination progesterone inefficiency in dairy cows. Pages 447-450 in *Fertility in the High- Producing Dairy Cow*. M. G. Diskin, ed. Occasional Publications No. 26, Br. Soc. *Anim. Sci.*, Edinburgh, UK.
40. Suttle, N. (2010). *Mineral nutrition of livestock*. (4th Ed.). Midlothian Eh 26.
41. Wathes, D. C., Taylor, V. J., Cheng, Z. & Mann, G. E. (2003). Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 61, 219-237.
42. Weiss, W. P. & Socha, M. T. (2005). Dietary Manganese for Dry and Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 2517-2523.
43. Weiss, W. P. (2005). Antioxidants nutrients, cow health and milk quality. Pages 11-18 in *Dairy Cattle Nutrition Workshop*, Department of *Dairy and Animal Sciences*, Penn State, Happy Valley, PA.
44. Weiss, W. P. (2017). Recommendations for Trace Minerals for Dairy Cows. In: *Proceeding of 29th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, 5-7 Feb., Florida University, pp. 89-101.
45. Weiss, W.P. & Spears, J.W. (2006). Vitamin and trace mineral effects on immune function of ruminants. In: Sejrsen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (Eds.), *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers, Utrecht, The Netherlands. pp. 473-496.
46. Yasui, T., Ehrhardt, R. M., Bowman, G. R., M., Vazquez-Anon, J. D., Richards, C. A., Atwell, Wineman, T. D. & Overton, T. R. (2009). Effects of trace mineral amount and source on aspects of oxidative status and immune function in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92 (E. Suppl. 1), 725. (Abstr).