مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۱۶۰-۱۵۱)

اثر سطوح مختلف مکمل‌های آلی روی و مس بر عملکرد و برخی فراسنجه‌های خونی بره‌های مهربان

سلیمه ترکاشون[1]*، محمد مهدی طباطبایی[2]، حسن علی عربی[3]، علی اصغر بهاری[4] و داریوش علیپور[5]
۱، ۲، ۳،۵ .دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیاران، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۴. استادیار، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان-ایران
(تاریخ دریافت : ۹۰/۱/۲۳– تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۱۰)

چکیده

جهت بررسی اثر سطوح مختلف مکمل‌های آلی روی و مس بر عملکرد، وضعیت روی و مس پلاسما، فعالیت آلکالین‌فسفاتاز، سرولوپلاسمین و غلظت ویتامین A سرم از ۲۵ رأس بره نر ۶-۵ ماهه مهربان با میانگین وزن ۳/۴۷±۳۰/۶۴ کیلوگرم در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار غذایی استفاده شد. تیمارها شامل: ۱)شاهد(جیرهٔ پایه بدون افزودن مکمل‌های پروتئینات روی و پروتئینات مس) ۲)جیره پایه+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی+۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ۳)جیره پایه+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ۴)جیره پایه+۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی+۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ۵)جیره پایه+۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس بودند. هر تیمار شامل ۵ تکرار بود. افزودن مکمل روی و مس تأثیر معنی‌داری بر عملکرد نداشت،اما سبب افزایش معنی‌دار غلظت روی و مس پلاسما گردید(P=۰/۰۰۰۱)، که البته بین تیمارهای دریافت کننده مکمل اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد. فعالیت سرولوپلاسمین با وجود افزایش عددی، اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. علیرغم افزایش عددی، در فعالیت آلکالین فسفاتاز میان تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد. غلظت ویتامینA سرم بطور معنی‌داری افزایش یافت (P=۰/۰۴۱). سطوح بیشتر روی و مس به ترتیب با افزایش بیشتر غلظت روی و مس پلاسما، بیشترین غلظت ویتامینA را موجب شدند(تیمار۵).

واژه های کلیدی: پروتئینات مس، پروتئینات روی، آلکالین‌فسفاتاز، سرولوپلاسمین، ویتامینA

]مقدمه

روی و مس مواد معدنی کم مصرفی هستند که احتیاجات و اثرات متقابل آنها بویژه به صورت ترکیبات مختلف (کیلات، کمپلکس، سولفات، اکسید و ...) با یکدیگر کاملاً آشکار نیست (Hatfield et al., 2001). روی به عنوان یک ترکیب کلیدی در بیش از سیصد متالوآنزیم شناخته شده است که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها و اسید-های نوکلئیک دخالت دارند (Nagalakshmi et al., 2009)، کربونیک‌آنهیدراز، مس-روی-سوپراکسید-دیسموتاز، کربوکسی‌پپتیداز، آلکالین‌فسفاتاز (ALP) و RNA پلیمراز از جمله این متالوآنزیم‌ها هستند

* نویسنده مسئول: سلیمه ترکاشون تلفن: ۰۹۱۸۳۱۷۰۲۹۰ E-mail: Salime.Torkashvan@gmail.com

(Underwood & Suttle, 1999). بنابراین اولین نشانه کمبود روی در حیوانات نشخوارکننده شامل کاهش خوراک مصرفی، نرخ رشد و راندمان استفاده از خوراک می‌باشد (McDowell, 1992). فعالیت آلکالین فسفاتاز خون بعنوان شاخصی از وضعیت‌های روی در بدن حیوانات به کار برده شده است (Hatfield et al., 2001). روی اغلب به خاطر دخالت در سنتز پروتئین و اعمال آنزیمی در جذب، متابولیسم و انتقال مواد مغذی میکرو از جمله ویتامین A سهیم می‌باشد (Christian et al., 1998). کمبود روی می‌تواند سنتز پروتئین اتصال یابنده به رتینول[1](RBP) را در کبد مختل کند و منجر به کاهش غلظت سرمی این پروتئین شود و در نتیجه باعث کاهش انتقال ویتامینA از کبد به جریان عمومی خون می‌شود (Smith et al., 1976). مکانسیم دیگر توضیح دهنده اختلال در متابولیسم ویتامینA، با حضور کافی این ویتامین در جیره دارای کمبود روی، مربوط به کاهش فعالیت آنزیم الکل‌دهیدروژناز است که برای تبدیل فرم الکلی ویتامینA (رتینول) به فرم آلدئیدی ویتامینA (رتینال) لازم است (Underwood & Suttle, 1999). وضعیت سطح مس در بدن نیز غلظت ویتامینA را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Sharma et al., 2003). کمبود مس سبب کاهش معنی‌دار غلظت ویتامینA سرم تلیسه‌ها شده است (Sharma et al., 2004). بین غلظت ویتامینA و وضعیت مس و روی سرم حیوانات همبستگی وجود دارد (Sharma et al., 2003).

مس برای رشد و جلوگیری از طیف وسیعی از اختلالات پاتولوژیکی و بالینی در تمامی انواع حیوانات مزرعه‌ای ضروری است (Underwood & Suttle, 1999). سرولوپلاسمین یکی از متالوآنزیم‌هایی است که به واسطه‌ی مس نقشی در سیستم دفاعی میزبان دارد (Stabel et al., 1993). سرولوپلاسمین در پلاسما فعالیت فروکسیدازی دارد و سبب تسهیل انتقال آهن از طریق تشکیل Fe (III) ترانسفرین می‌گردد.

تصور بر این است که نقش مس در خونسازی (اریتروپوئزیس) از طریق سرولوپلاسمین انجام می‌گردد (Frieden, 1971).

1. Retinol bonding protein

اندازه‌گیری مس پلاسما به تنهایی فاقد ارزش تشخیصی می‌باشد. مکمل مس بطور معنی‌داری سبب افزایش فعالیت سرولوپلاسمین سرم بره‌های نر گردیده است (Senthilkumar et al, 2009). از آنجا که گوسفند به مسمومیت مس مزمن حساسیت دارد لذا مقدار مکمل مس بسیار مهم می‌باشد (Haywood et al., 2001). افزودن مقادیر مناسب عناصر معدنی کم‌مصرف به جیره برای حفظ سطح بهینه رشد و عملکرد حیوان ضروری است (Solaiman et al., 2006).

بدلیل افزایش زیست فراهمی منابع آلی در برابر منابع غیر آلی عناصر کم مصرف، استفاده از شکل‌های آلی این عناصر بیشتر است. هر چند گزارش‌های انتشار یافته در مورد مقایسه قابلیت دسترسی منابع آلی در برابر منابع غیر آلی بسیار متغیر بوده اند، شواهدی مبنی بر اینکه افزودن عناصر به شکل آلی به جیره برتری‌هایی دارد، وجود دارند (Harmon, 2000). جذب روی از منابع آلی آن، هنگامی که در غلظت بالایی به جیره افزوده شوند، نسبت به منابع معدنی آن، بالاتر است (Garg et al., 2008).

با توجه به مطالب یاد شده و از آنجایی که اکثر خاکهای ایران دارای کمبود روی هستند (Malakutirad, 2009)، افزودن مکمل روی به جیره ضروری است، اما بدلیل اینکه روی و مس برای متصل شدن به مکان‌های موجود در آنزیم‌ها و متالوپروتئین‌ها با هم رقابت می‌کنند (Wellington et al., 1998)، در آزمایش حاضر تلاش شد که اثر سطوح مختلف مکمل‌های آلی روی و مس بر غلظت روی و مس پلاسما و به دنبال آن فعالیت ALP، سرولوپلاسمین، غلظت ویتامینA سرم و عملکرد بره‌های نر مهربان بررسی شود.

مواد و روش ها

در یک طرح کاملاً تصادفی تعداد ۲۵ رأس بره نر ۶-۵ ماهه از توده ژنتیکی مهربان با میانگین وزن ۳/۴۷ ± ۳۰/۶۴ کیلوگرم به ۵ تیمار شامل ۵ تکرار اختصاص داده شد. بره‌ها در باکس‌های انفرادی نگهداری و بصورت جداگانه تغذیه شدند. تیمارها شامل: ۱)شاهد(که با جیرهٔ پایه حاوی ۲۷ درصد یونجه خشک، ۷۰ درصد جو و ۳ درصد کنجاله سویا تغذیه شدند)، ۲)جیره پایه+۲۰

میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک روی و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک مس، ۳)جیره پایه+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک روی و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک مس، ۴)جیره پایه+۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک روی و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک مس ، ۵)جیره پایه+۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک روی و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک مس. غلظت روی و مس موجود در اجزای جیره، جیره پایه و آب مصرفی در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱- غلظت روی و مس (میلی‌گرم در کیلوگرم) موجود در اجزای جیره، جیره پایه و آب مصرفی در آزمایش

عناصر	یونجه	جو	سویا	جیره پایه	آب
روی	۲۳/۳	۲۰/۵	۶۱	۲۲/۴۷	۰/۲
مس	۹	۸	۱۹	۸/۶	۰/۰۳۳

جیره غذایی با توجه به جداول نیازهای غذایی NRC (1985) تنظیم شد و همه نیازهای دام به جز روی تأمین شدند. برای افزودن مس و روی به جیره از پروتئینات مس (۱۰٪ مس) و پروتئینات روی (۱۵ ٪ روی) (Bioplex; Vetak company) استفاده شد. بعد از دو هفته عادت دهی با جیره پایه، آزمایش به مدت ۸۰ روز انجام شد. مواد خوراکی به صورت کاملاً مخلوط در دو نوبت صبح و عصر ساعت (۸ و ۱۶) به صورت آزاد در اختیار بره‌ها قرار می گرفت. برای افزودن مکمل‌ها به جیره، پروتئینات مس و پروتئینات روی را که به صورت پودر بودند به وزن‌های مورد نیاز، با توجه به سطوح آن در جیره وزن نموده و سپس با استفاده از آب مقطر رقیق نموده (محلول‌های رقیق شده حاوی ۱۰۰۰ mg در لیتر و ۲۰۰۰mg در لیتر مس، و ۲۰۰۰mg در لیتر و ۴۰۰۰mg در لیتر روی بودند) و از هر کدام از محلول‌های رقیق شده‌ی پروتئینات مس و پروتئینات روی مقدار ۱۰ سی سی محلول محتوی مس و روی را با کنجاله سویا در هنگام خوراک‌دهی مخلوط نموده و به گونه‌ای در اختیار دام قرار داده شد تا کاملاً آنرا مصرف نماید. به منظور جلوگیری از خرابی محلول مکمل‌ها، مکمل‌ها به‌صورت هفتگی تهیه می‌شدند و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری می‌گردیدند. در طول مرحله‌ی ۸۰ روزه دام‌ها هر دو هفته یک بار جهت بررسی تغییرات وزن، توزین شده و میزان خوراک مصرفی نیز روزانه ثبت شد. در روزهای ۲۸، ۴۰، ۶۰، ۶۵ و ۸۰ آزمایش قبل از نوبت غذایی صبح از طریق ورید وداج از تمام بره‌ها خونگیری شد. خون گرفته شده در دو لوله جداگانه یکی حاوی هپارین برای بدست آوردن پلاسما و دیگری بدون هپارین جهت بدست آوردن سرم ریخته شدند و برای جداسازی پلاسما و سرم، پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) شدند. از نمونه‌های روز ۲۸ و ۶۵ جهت اندازه‌گیری Zn و Cu پلاسما و فعالیت ALP و سرولوپلاسمین در سرم استفاده شد. نمونه‌های پلاسما و سرم تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای فوق در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و نمونه‌های مربوط به فعالیت سرولوپلاسمین تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری غلظت ویتامین **A** سرم از نمونه های تازه سرم در روزهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ آزمایش استفاده شد. نمونه‌های آب مصرفی بره ها نیز برای تعیین غلظت روی و مس، در شروع، اواسط و پایان آزمایش جمع‌آوری شدند. آلکالین فسفاتاز به وسیله روش آنزیمی با استفاده از نیتروفنیل‌فسفات به عنوان سوبسترا توسط کیت ساخت شرکت Elitech فرانسه اندازه‌گیری شد. فعالیت سرولوپلاسمین در سرم براساس روش Schosinsky et al. (1974) اندازه‌گیری شد با این تفاوت که به جای اُدیانیزیدین دی‌هیدروکلراید که در دمای اتاق پایداری مناسبی ندارد از پودر اُدیانیزیدین استفاده شد. غلظت ویتامین A سرم طبق روش و فرمول Suzuki & Katoh (1990) تعیین شد. اندازه‌گیری روی و مس پلاسما طبق روش Westerma (1982) انجام شد.

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل ۱+۲×۲ در چارچوب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال خطای آلفا برابر ۰/۰۵ انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (2003) صورت گرفت.

نتایج و بحث

اختلاف آماری معنی‌داری بین وزن اولیه بره‌ها، وزن نهایی، میانگین افزایش وزن روزانه (ADG)، میانگین خوراک مصرفی روزانه (DMI) و ضریب تبدیل غذایی مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- عملکرد بره‌ها در طول مدت تغذیه با جیره‌های آزمایش

فاکتور	میانگین وزن اولیه(کیلوگرم)	میانگین افزایش وزن روزانه (کیلوگرم در روز)	میانگین وزن نهایی(کیلوگرم)	میانگین خوراک مصرفی روزانه (کیلوگرم در روز)	ضریب تبدیل غذایی (خوراک به افزایش وزن)
۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی	۳۱/۵۵۰±۳/۵۴۶	۰/۲۲۶±۰/۰۳۹	۴۴/۴۵۰±۴/۲۰۶	۱/۴۰۱±۰/۱۱۰	۶/۲۷۶±۰/۹۴۳
۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی	۳۰/۱۵۰±۳/۸۵۱	۰/۲۵۸±۰/۰۳۵	۴۴/۸۵۰±۴/۱۹۰	۱/۳۸۵±۰/۱۱۴	۵/۴۸۹±۰/۸۷۷
SEM	۱/۲۳۴	۰/۰۱۲	۱/۳۹۲	۰/۰۳۶	۰/۳۰۰
۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس	۳۰/۸۰۰±۳/۲۵۰	۰/۲۵۲±۰/۰۴۴	۴۵/۱۰۰±۴/۲۹۹	۱/۳۶۵±۰/۱۰۴	۵/۷۳۱±۰/۸۲۶
۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس	۳۰/۹۰۰±۴/۲۳۴	۰/۲۳۲±۰/۰۳۳	۴۴/۲۰۰±۴/۰۴۹	۱/۴۲۲±۰/۱۱۲	۶/۰۳۴±۱/۱۲۶
SEM	۱/۲۳۴	۰/۰۱۲	۱/۳۹۲	۰/۰۳۶	۰/۳۰۰
تیمار۱	۲۹/۸۰۰±۲/۶۵۹	۰/۲۳۰±۰/۰۳۷	۴۲/۴۰۰±۲/۱۹۰	۱/۳۳۶±۰/۰۸۱	۶/۱۳۵±۰/۹۰۳
تیمار۲	۳۱/۱۰۰±۲/۲۴۷	۰/۲۳۵±۰/۰۵۲	۴۴/۵۰۰±۳/۵۱۷	۱/۳۴۹±۰/۰۸۱	۶/۰۷۵±۱/۰۹۰
تیمار۳	۳۲/۰۰۰±۴/۷۶۹	۰/۲۱۸±۰/۰۲۳	۴۴/۴۰۰±۵/۲۳۶	۱/۴۵۴±۰/۱۱۹	۶/۴۷۷±۰/۸۴۴
تیمار۴	۳۰/۵۰۰±۴/۳۰۱	۰/۲۷۰±۰/۰۳۰	۴۵/۷۰۰±۵/۳۲۲	۱/۳۸۱±۰/۱۳۲	۵/۳۸۷±۰/۲۲۸
تیمار۵	۲۹/۸۰۰±۳/۸۱۷	۰/۲۴۵±۰/۰۳۹	۴۴/۰۰۰±۳/۰۶۱	۱/۳۹۰±۰/۱۰۸	۵/۵۹۲±۱/۲۸۵
SEM	۱/۶۴۹	۰/۰۱۷	۱/۸۱۴	۰/۰۴۷	۰/۴۲۰
P(اثر روی)	۰/۴۳۴	۰/۰۹۵	۰/۸۴۲	۰/۷۵۳	۰/۰۸۳
P(اثر مس)	۰/۹۵۵	۰/۲۶۴	۰/۶۵۴	۰/۲۷۳	۰/۴۸۵
P(اثر روی×مس)	۰/۶۵۳	۰/۸۴۶	۰/۶۸۹	۰/۳۵۴	۰/۸۱۹
P(اثر تیمار)	۰/۸۶۰	۰/۳۳۱	۰/۷۸۵	۰/۴۷۲	۰/۳۸۸

حروف مشابه درهر ستون ازهر بخش نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.
تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب جیره پایه (کنترل)، جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات می‌باشند. SEM: خطای استاندارد بین میانگین‌ها.

همچنین اثر روی و اثر مس، هر کدام به صورت مجزا، بر فراسنجه‌های عملکرد معنی‌دار نبود. با این وجود، بیشترین افزایش وزن روزانه و کمترین ضریب تبدیل غذایی متعلق به تیمار۴ بود و سطح ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس تأثیر بهتری بر ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن روزانه

نسبت به سطوح دیگر خود نشان دادند. همانند نتایج حاضر، Mandal et al. (2007) تفاوت معنی‌داری در فراسنجه‌های عملکردی گوساله‌های دریافت کننده ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به صورت سولفات روی یا پروپیونات روی با جیره پایه حاوی ۳۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی مشاهده نکردند. Luginbuhl et al. (2000) گزارش کردند که مقدار ۱۰ یا ۳۰ میلی‌گرم مس در کیلوگرم ماده خشک، در طی ۸۸ روز تأثیری بر متوسط خوراک مصرفی روزانه، متوسط افزایش وزن روزانه و راندمان مصرف خوراک بزغاله‌های از شیر گرفته شده نداشت. با توجه به حساسیت گوسفند به مقادیر مازاد مس نمی‌توان از این عنصر در سطوح زیاد به عنوان محرک رشد و بهبود دهندهٔ عملکرد بهره برد. افزودن مکمل روی و مس سبب افزایش معنی‌دار غلظت روی پلاسما شد (P=۰/۰۰۰۱). اما بین تیمارهای دریافت کننده مکمل روی و مس اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۳). اثر روی و مس بر غلظت روی پلاسما معنی‌دار نبود. غلظت روی پلاسما یا سرم در نشخوارکنندگان در دامنه ۰/۸ تا ۱/۴ میلی‌گرم در لیتر قرار دارد (Underwood & Suttle, 1999). غلظت روی پلاسما در تیمارهای مورد بررسی در مطالعه حاضر نیز در دامنه فوق قرار دارد به گونه‌ای که تیمار۱ با کمترین میانگین، نزدیک به مقدار حداقل و تیمار۴ با بیشترین میانگین، نزدیک به مقدار حداکثر است. همانند نتایج مطالعه حاضر، Ryan et al. (2002) نیز اختلاف معنی‌داری در غلظت روی پلاسما در گوسفندان شیری بالغ که ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به صورت کیلات روی (Bioplex) دریافت کردند، گزارش ندادند. همچنین Mandal et al. (2007) نیز گزارش دادند که تفاوت معنی‌داری در غلظت روی سرم گوساله‌هایی که ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به صورت پروپیونات روی با جیره پایه حاوی ۳۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی دریافت کردند، وجود نداشت. از سوی دیگر، در میش‌های دریافت کننده سطوح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به شکل سولفات و پروتئینات، مکمل مس تأثیری بر زیست‌فراهمی روی نداشته است (Eckert et al., 1999). در نتایج آزمایش حاضر نیز مکمل مس اثر معنی‌داری بر غلظت روی پلاسما نداشت. غلظت روی کبد در میش‌هایی که مکمل‌های روی و مس را با هم دریافت کردند، بیشتر از روی کبد میش‌های دریافت کننده مکمل روی بوده است (Hatfield et al., 2001). احتمالاً مصرف روی در حضور مس جذب و ابقاء روی را افزایش می‌دهد. نتایج آزمایش حاضر نیز نشان داد که اثر روی بر غلظت روی پلاسما معنی‌دار نبود اما تیمار-های دریافت کننده مکمل‌های روی و مس بطور معنی-داری غلظت روی پلاسمایشان بیشتر از تیمار شاهد بود(P<۰/۰۵).

افزودن مکمل‌های روی و مس سبب افزایش معنی‌دار غلظت مس پلاسما گردید (P=۰/۰۰۰۱). اما تیمارهای دریافت کننده مکمل روی و مس تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نداشتند. اثر روی و همچنین اثر مس، هر کدام به صورت مجزا، بر غلظت مس پلاسما معنی‌دار نبود. غلظت مس پلاسما در نشخوارکنندگان در دامنه ۰/۵۵ تا ۰/۹۵ میلی‌گرم در لیتر قرار دارد (Suttle, 1994) که البته داده‌های حاصل از مطالعه حاضر بیشتر از این دامنه بود که می‌تواند به علت حساسیت بسیار بالای گوسفند به مس باشد. همانند مطالعه حاضر که اثر روی بر غلظت مس پلاسما معنی‌دار نبود، Malcolm-Callis et al. (2000) نیز تفاوت معنی-داری در غلظت مس سرم با افزودن۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل روی به صورت منابع متفاوت (سولفات روی، روی متیونین و کمپلکس روی پلی‌ساکارید) در گوساله‌های تغذیه شده با جیره پایه حاوی ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی مشاهده نکردند.

همچنین تفاوت معنی‌داری در غلظت مس پلاسمای گوساله‌هایی که ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم روی به صورت سولفات روی و پروپیونات روی دریافت کردند، مشاهده نشد (Mandal et al., 2007). Eckert et al. (1999) نیز گزارش کردند که سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس (به شکل سولفات و پروتئینات) سبب افزایش مس پلاسما در میش‌ها نشد. Zhang et al. (2008) در بررسی اثر مکمل سولفات مس بر وضعیت مس پلاسما در بزهای کشمیری، افزایش مس پلاسما را در تمام تیمارهای دریافت کننده سطوح متفاوت مس گزارش کردند، اما تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها وجود نداشت. همچنین، سطوح مختلف

مکمل مس سبب افزایش مس سرم بزها شده‌است، اما اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها نشان داده نشده‌است (Solaiman et al., 2006).

جدول ۳-غلظت روی و مس پلاسما (میلی‌گرم در لیتر) و میزان فعالیت ALP، سرولوپلاسمین، و غلظت ویتامین A سرم بره‌ها

فاکتور	روی	مس	ALP (واحد بر لیتر)	سرولوپلاسمین (میلی‌گرم بر دسی-لیتر)	ویتامینA (میکروگرم بر دسی‌لیتر)
۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی	۱/۲۷۵±۰/۲۱۴	۱/۸۵۶±۰/۳۶۴	۱۷۷/۳۴۶±۵۲/۳۶۰	۹/۲۷۶±۳/۹۷۳	۱۹/۲۱۲^{b}±۹/۷۹۵
۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی	۱/۳۷۳±۰/۱۴۶	۱/۶۷۴±۰/۵۰۴	۱۹۲/۳۳۴±۵۸/۸۷۹	۸/۴۵۳±۴/۹۴۱	۲۲/۸۲۷^{a}±۱۲/۵۵۴
SEM	۰/۰۳۵	۰/۱۰۴	۱۷/۱۲۰	۱/۲۶۴	۰/۹۹۹
۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس	۱/۳۵۸±۰/۲۳۸	۱/۷۲۰±۰/۴۸۶	۱۹۰/۱۴۹±۶۲/۳۶۹	۸/۱۹۹±۴/۶۷۷	۲۰/۱۶۵±۸/۷۰۱
۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس	۱/۲۹۰±۰/۱۱۵	۱/۸۱۹±۰/۴۰۶	۱۷۹/۵۳۱±۴۸/۷۵۸	۹/۵۳۰±۴/۲۱۲	۲۱/۸۷۵±۱۳/۵۳۱
SEM	۰/۰۳۵	۰/۱۰۴	۱۷/۱۲۰	۱/۲۶۴	۰/۹۹۹
تیمار۱	۰/۹۳۳^{b}±۰/۱۴۵	۰/۷۸۶^{b}±۰/۱۷۹	۱۷۰/۵۲۵±۶۱/۸۹۶	۶/۷۳۳±۳/۴۷۹	۱۷/۶۶۱^{b}±۷/۹۹۳
تیمار۲	۱/۲۸۸^{a}±۰/۲۹۴	۱/۸۳۵^{a}±۰/۴۲۷	۱۸۲/۱۳۲±۵۲/۱۹۴	۸/۷۷۹±۴/۸۲۶	۱۷/۸۷۱^{b}±۵/۱۸۴
تیمار۳	۱/۲۶۲^{a}±۰/۱۰۰	۱/۸۹۶^{a}±۰/۳۰۸	۱۷۲/۵۵۹±۵۴/۸۸۷	۹/۷۷۴±۳/۰۷۸	۲۰/۵۵۴^{ab}±۱۲/۹۶۲
تیمار۴	۱/۴۲۸^{a}±۰/۱۵۰	۱/۶۰۵^{a}±۰/۵۳۵	۱۹۸/۱۶۷±۷۳/۱۰۸	۷/۶۲۰±۴/۷۰۶	۲۲/۴۵۹^{a}±۱۰/۸۹۴
تیمار۵	۱/۳۱۹^{a}±۰/۱۲۶	۱/۷۴۳^{a}±۰/۴۹۱	۱۸۶/۵۰۲±۴۳/۵۶۷	۹/۲۸۵±۵/۲۷۷	۲۳/۱۹۶^{a}±۱۴/۴۰۵
SEM	۰/۰۵۳	۰/۱۳۶	۲۳/۹۵۷	۱/۷۰۵	۱/۴۶۱
P(اثر روی)	۰/۰۶۹	۰/۲۰۹	۰/۵۴۵	۰/۶۵۱	۰/۰۲۱*
P(اثر مس)	۰/۱۹۵	۰/۵۰۷	۰/۶۶۷	۰/۴۶۸	۰/۲۴۴
P(اثر روی×مس)	۰/۴۱۹	۰/۸۰۰	۰/۹۶۶	۰/۸۵۴	۰/۵۰۱
P(اثر تیمار)	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۱**	۰/۹۲۵	۰/۷۱۳	۰/۰۴۱*

حروف مشابه درهر ستون ازهر بخش نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

تیمارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب جیره پایه (کنترل)، جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات، جیره حاوی ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس به صورت پروتئینات می‌باشند. SEM: خطای استاندارد بین میانگین‌ها.

* معنی‌دار (P<۰/۰۵)

** بسیار معنی‌دار (P<۰/۰۵)

با وجود نبودن تفاوت آماری معنی‌دار بین تیمارها از لحاظ ALP ، در بین تیمارهای دریافت کننده مکمل افزایش عددی دیده شد، به گونه‌ای که تیمار۴ از لحاظ عددی بیشترین میانگین را به خود اختصاص داد. اثر روی و مس نیز بر این فراسنجه معنی‌دار نبود. Nagalakshmi et al. (2009) دامنه فعالیت ALP را در بره‌های در حال رشدی که مکمل روی دریافت کردند، ۱۳۸/۳ تا ۱۶۸/۸ واحد در لیتر گزارش کردند که داده-های حاصل از مطالعه حاضر تا حدودی میزان بالاتر از این مقدار را نشان داد که احتمالاً به دلیل پائین‌تر بودن

سن بره‌های استفاده شده در مطالعه حاضر است. از آنجایی که ALP شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت روی در بدن است (Hatfield et al., 2001) در پژوهش حاضر نیز مشاهده می شود که تیمارهای دارای بیشترین سطح دریافت روی (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، از لحاظ عددی بیشترین میزان فعالیت ALP و غلظت روی پلاسما را نیز نشان می دهند و نتایج مربوط به میزان فعالیت ALP کاملاً منطبق بر نتایج متعلق به غلظت روی پلاسما در تیمارهاست. فعالیت بیشتر آلکالین فسفاتاز در موش‌های صحرائی دریافت کننده روی کافی نسبت به آنهایی که با کمبود روی مواجه بودند، گزارش شده است (Wan et al., 1993; Kraus et al., 1997). همانند نتایج پژوهش حاضر، Anna et al. (1992) ، بیان داشتند که افزودن روی به جیره پایه فعالیت ALP سرم بره‌ها را به واسطه افزایش غلظت روی پلاسما افزایش داد. همچنین، Hatfield et al. (2001) در بررسی اثر مخلوطی از مکمل‌های پروتئینات روی و پروتئینات مس (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر میش-تارقی، تفاوت معنی‌داری بین میش‌های دریافت کننده مکمل و گروه شاهد، از لحاظ فعالیت ALP مشاهده نکردند. باافزودن روی به صورت سولفات‌روی یا روی-پروتئینات (با سطوح ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم)، به جیره پایه حاوی ۲۹ میلی‌گرم در کیلوگرم روی، فعالیت ALP سرم بره‌ها افزایش معنی‌داری نشان داده است (Nagalakshmi et al., 2009). به احتمال زیاد معنی‌دار نشدن نتایج پژوهش حاضر بدلیل وجود مکمل مس است و همانگونه که ملاحظه می شود سطح ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس تأثیر بهتری نسبت به سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، بر ALP دارد.

اگرچه افزودن مکمل روی و مس سبب افزایش عددی فعالیت سرولوپلاسمین سرم گردید، اما بین تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. بین سطوح مختلف روی و مس نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد که بره‌هایی که مکمل‌های حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس را دریافت کردند افزایش عددی فعالیت سرولوپلاسمین بیشتری را نسبت به تیمارهایی که سطح ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس را دریافت کردند داشتند. Nazifi et al. (2005) میزان فعالیت سرولوپلاسمین سرم گوسفند دنبه‌دار ایرانی را ۴/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر گزارش کردند، داده-های پژوهش حاضر نیز در این دامنه قرار دارد. در پلاسما ۹۰-۷۰٪ مس در ارتباط با سرولوپلاسمین است (Nazifi et al., 2005). از اینرو فعالیت سرولوپلاسمین همبستگی نزدیکی با مس سرم در گوسفند(r=۰/۹۲) (Blakley & Hamilton, 1985) دارد. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که نتایج مربوط به فعالیت سرولوپلاسمین سرم با نتایج مربوط به غلظت مس پلاسما منطبق است به طوری که تیمار۳ (حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی+۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس) که از لحاظ عددی بالاترین غلظت مس پلاسما را دارا بود، بیشترین میزان سرولوپلاسمین را نیز به خود اختصاص داد. در نتایج حاضر مشاهده شد تیمارهایی که روی بیشتری دریافت کرده بودند غلظت مس پلاسما و فعالیت سرولوپلاسمین پایین‌تری نسبت به دیگر تیمار های دریافت کننده مکمل داشتند. این یافته‌ها با گزارش های Whanger & Weswig (1970) و نیز Saylor & Leach (1980) همخوانی دارد. کاهش در فعالیت سرولوپلاسمین بوسیله افزودن مکمل روی می‌تواند بوسیله ممانعت روی از مس برای سنتز مولکول آپوسرولوپلاسمین، یا اتصال روی به سرولوپلاسمین به جای مس، موجب شده باشد (Whanger & Weswig, 1970).

افزودن مکمل روی و مس سبب افزایش معنی‌دار غلظت ویتامینA سرم شد (P=۰/۰۴۱). بیشترین میانگین را تیمار دریافت کننده ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی + ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس (تیمار۵) به خود اختصاص داد. تیمار۵ تفاوت معنی‌داری با تیمارهای ۴ و ۳ نشان نداد اما در مقابل با تیمارهای ۲ و ۱ تفاوت معنی‌دار داشت. تیمار۳ نیز با تیمارهای ۴ و ۲ تفاوت معنی‌دار نداشت. Afshari et al. (2008) غلظت ویتامینA سرم را در بره‌های نر قزل ۳/۱ ± ۳۸/۹ میکروگرم در دسی‌لیتر گزارش کردند که داده‌های حاصل از نتایج این پژوهش تا حدودی پایین‌تر است که می‌تواند بدلیل کمتر بودن سن بره‌ها باشد. در بین تیمارهای دریافت کننده مکمل، تیماری که کمترین سطح روی (۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و کمترین سطح

مس (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) را دریافت کرده بود، کمترین میانگین غلظت ویتامینA را دارا بود. بین سطوح مختلف روی نیز با P=۰/۰۲۱ تفاوت معنی‌دار ملاحظه شد، به گونه‌ای که سطح ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی سبب افزایش بیشتر غلظت ویتامینA نسبت به سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی شد. اگرچه بین سطوح مس تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد، اما از لحاظ عددی سطح ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس تأثیر بیشتری بر غلظت ویتامینA داشت. نتیجه فوق با نتایج Sharma et al. (2003, 2004) همخوانی دارد. نتایج نشان می‌دهد که سطوح بالاتر روی (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و مس (۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به ترتیب بیشترین غلظت روی و مس پلاسما را حاصل کردند و سبب افزایش غلظت ویتامینA سرم بره‌های نر مهربان شدند. اثرات روی به صورت کوفاکتور بر چندین آنزیم در ارتباط با ذخیره و متابولیسم ویتامینA شناخته شده است (MacDonald, 2000). همچنین، کمبود روی می‌تواند سنتز پروتئین اتصال یابنده به رتینول (RBP) را در کبد مختل کند و منجر به کاهش غلظت سرمی این پروتئین شود و در نهایت سبب اختلال در جذب، متابولیسم و انتقال ویتامینA گردد (Smith et al., 1976). بنابراین افزایش غلظت ویتامینA سرم در بره های دریافت کننده مکمل روی و مس ممکن است به دلیل افزایش سنتز پروتئین اتصال یابنده با رتینول (RBP) و آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ویتامینA باشد.

نتیجه گیری کلی

افزودن مکمل‌های آلی روی و مس تأثیر معنی‌داری بر فراسنجه‌های مربوط به عملکرد نداشت اما سبب افزایش معنی‌دار غلظت‌های روی و مس پلاسمای بره-های نر مهربان شد، اما نسبت‌های بین سطوح روی و مس در هر یک از تیمارهای حاوی مکمل روی و مس، سبب اختلاف معنی‌دار مقدار پلاسمائی این عناصر بین بره‌های دریافت کننده مکمل نشد. تیمار۴ که حاوی بیشترین سطح روی (۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی) و کمترین سطح مس (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس) بود، بهبود فعالیت ALP را نشان داد. تیمار۳ (حاوی ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی) که از لحاظ عددی بالاترین غلظت مس پلاسما و کمترین غلظت روی پلاسما را دارا بود ، بیشترین میزان سرولوپلاسمین را به خود اختصاص داد. سطوح بیشتر روی و مس (به ترتیب ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) با افزایش بیشتر غلظت روی و مس پلاسما، بیشترین غلظت ویتامینA سرم را موجب شدند.

REFERENCES

1. Afshari, G. h., Hasanpoor, A., Hagpanah, H. and Amoughli-Tabriz, B. (2008). Seasonal Variation of Vitamin A and Beta-Carotene Levels in Ghezel Sheep. Turk. *Journal of Veterinary Animal Science* 32(2), 127-129.
2. Anna, F. Miller E. R. and Ku P. K. (1992). Effect of elevated dietary zinc on growth performance of weaning swine. *Michigan State Univercity Report Swine Research* 520, 128–132.
3. Blakley, B. R. and Hamilton, D. L. (1985). Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Canada Journal Comparative Media* 49, 405-408.
4. Christian, P. and West, Jr, Keith (1998). Interactions between zinc and vitamin A. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 435s-41s.
5. Eckert, G. E., Greene, L. W., Carstens, G. E. and Ramsey, W. S. (1999). Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *Journal of Animal Science* 77, 244-249.
6. Frieden, E. (1971). Caeruloplasmin, a link between copper and iron metabolism. *Advances in Chemistry Series* 100, 292–321.
7. Garg, A. K., and Vishal Mudgal, R. S. (2008). Effect of organic zinc supplementation on growth,nutrient utilization and mineral profile in lambs. *Animal Feed Science and Technology* 144, 82–96.
8. Harmon, R. J. (2000). When are chelated minerals justified. *Kentucky Ruminant Nutrition* 47-54.
9. Hatfield, P. G., Swenson C. K., Kott R. W., Ansotegui R. P., Roth N. J. and Robinson B. L. (2001). Zinc and copper status in ewes supplemented with sulfate- and amino acid-complexed forms of zinc and copper. *Journal of Animal Sciences* 79, 261–266.

10. Haywood, S., Muller, T., Muller, W., Heinz-Erian, R., Tanner, M. S. and Ross, G. (2001). Copper-associated liver disease in North Ronaldsay sheep; a possible animal model for non-Wilsoniam hepatic copper toxicosis of infancy and childhood. *Journal of Pathology* 195, 264–269.
11. Kraus, A., Roth, H. and Kirchgessner M. (1997). Supplementation with vitamin C, vitamin E, or beta carotene influences osmotic fragility and oxidative damage of erythrocytes of zinc-deficient rats. *Journal of Nutrition* 127, 1290−1296.
12. Luginbuhl, J. M., Poore, M. H., Spears, J. W. and Brown, T. T. (2000). Effect of dietary copper level on performance and copper status of growing meat goats. *Sheep Goat Research Journal* 16, 65-71.
13. MacDonald, R. S. (2000). The role of zinc in growth and cell proliferation. *Journal of Nutrition* 130,1500–1508.
14. McDowell, L. R. (1992). Minerals in Animal and Human Nutrition. *Academic Press, New York, NY, USA*, p. 272.
15. Mandal, G. P., Dass, R. S., Isore, D. P., Garg, A. K. and Ram, G. C. (2007). Effect of zinc supplementation from two sources on growth, nutrient utilization and immune response in male crossbred cattle (Bos indicus×Bos taurus) bulls. *Animal Feed Science Technolog*y 138,1–12.
16. Malakutirad, M. J. (2009). over looking the zinc deficiency in Iranian arable lands. *Research Information and Development of Iran*. (In Farsi)
17. Malcolm-Callis, K. J., Duff, G. C., Gunter, S. A., Kegley, E. B. and Vermeire, D. A. (2000). Effects of supplemental zinc concentration and source on performance, carcass characteristics, and serum values in finishing beef steers. *Journal of Animal Science* 78:2801-2808.
18. Nagalakshmi, D., Dhanalakshmi, K. and Himabindu, D. (2009). Effect of dose and source of supplemental zinc on immune response and oxidative enzymes in lambs. *Veterinary Research Communications* 33, 631–644.
19. Nazifi, S., Rowghani, E. and Nikoosefat, Z. (2005). Studies on the relationship between haemoglobin, copper, ceruloplasmin, iron, and superoxide dismutase activity in blood of Iranian fat-tailed sheep. *Comparative Clinical Pathology* 14,114-117.
20. NRC. (1985). Nutrient Requirements of Sheep, 5th edn. *National Academy of Sciences*, Washington, DC.
21. Ryan, J. P., Kearns, P. and Quinn, T. (2002). Bioavailability of dietary copper and zinc in adultTexel Sheep: a comparative study of the effects of sulfate and bioplex supplementation. *Irish Veterinary Journal* 55, 221–224.
22. SAS. (2004) "SAS® 9.1 SQL Procedure User's Guide; Statistics". *Statistical Analysis System Institute Inc*., Cary, NC. USA.
23. Saylor, W. W. and Leach, R. M. Jr. (1980). Intracellular distribution of copper and zinc in sheep: effect of age and dietary levels of the metals. *Journal of nutrition* 110, 448-459.
24. Schosinsky, K. H., Lehmann, H. P. and Beeler, M. F. (1974). Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry* 20/12,1556-1563.
25. Senthilkumar, P., Nagalakshmi, D., Ramana Reddy, Y. and Sudhakar, K. (2009). Effect of different level and source of copper supplementation on immune response and copper dependent enzyme activity in lambs. *Trophy Animal Health Production* 41, 645-653.
26. Sharma, M. C., Joshi, C., Pathak, N. N. and Kaur, H., (2004). Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Research in Veterinary Science*. 79, 113–123.
27. Sharma, M. C., Raju, S., Joshi, C., Kaur, H. and Varshney, V. P. (2003). Studies on serum micromineral, hormone and vitamin profile and its effect on production and therapeutic management of buffaloes in Haryana state of India. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 16 (4), 519–528.
28. Smith, J. C., Brown, J. R., McDaniel, E. D. and Chan, E. G. (1976). Alterations in vitamin A metabolism during zinc deficiency and food and growth restriction. *Journal of Nutrition* 106, 569–74.
29. Solaiman, S. G., Shoemaker, C. E. and D'Andrea, G. H. (2006). The effect of high dietary Cu on health, growth performance, and Cu status in young goats. *Small Ruminant Research*. 66, 85-91.
30. Stabel, J. R., Spears, J. W. and Brown, T. T. (1993). Effect of Copper Deficiency on Tissue, Blood Characteristics, and Immune Function of Calves Challenged withInfectious Bovine Rhinotrachekis Virus and Pasteurellahemolytica. *Journal of Animal Sciences* 71,1247-1255.
31. Suttle, N. F. (1994). Meeting the copper requirements of ruminants. In: Garnsworthy, P.C. and Cole, D.J.A. (eds) *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 173–188.
32. Suzuki, J. I. and Katoh, N. (1990). A simple and cheap methods for measuring serum vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Japanese Journal of Veterinary Science* 52,1281-1283.
33. Underwood, E. J. and Suttle, N. F. (1999). The mineral nutrition of livestock. *CAB international, Wallingford, U.K.*

34. Wan, D. Y., Cerklewski, F. L. and Leklem, J. E. (1993). Increased plasma pyridoxal-5′-phosphate when alkaline phosphatase activity is reduced in moderately zinc-deficient rats. *Biological Trace Element Research* 39, 203−210.
35. Wellington, B. K., Paterson J. A., Swenson C. K., Ansotegui R. P., Hatfield P. G. and Johnson, A. B. (1998). The influence of supplemental copper and zinc on beef heifer performance and changes in liver copper. *Proceedings, Western Section American Society of Animal Science* 49, 323−326.
36. Westterma, L. R. and Constabel, F. (1982). Plant tissue culture metbods 2deev. Ed. Sasatoon: *National Research Council of Canada*, Prairie Regional Laboratory.
37. Whanger, P. D. and Weswig, P. H. (1970). Effect of some copper antagonists on induction ceruloplasmin in the rat. *Journal of nutrition* 100, 341-348.
38. Zhang, W., Wang, R., Kleemann, D. O., Lu, D., Zhu, X., Zhang, C. and Jia, Z. (2008). Effects of dietary copper on nutrient digestibility, growth performance and plasma copper status in cashmere goats. *Small Ruminant Research*. 74,188-193.