تأثير استخدام الـــTrehalose في تجميد السائل المنوي للكباش العواسي

حازم كسار جاسر الصعب* وعبد الكريم عبد الرضا هوبي
كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

أُجريت هذه التجربة لغرض تحسين حيوية النطف للكباش بعد التجميد وقد استخدم 4 كباش من سلالة العواسي التركي، بأعمار تتراوح ما بين 2.5 –3.0 سنة، اجري تجميع السائل المنوي (Pooling) بعد عملية الجمع وتم تخفيفه بنسبة 1: 20 بمخفف الـ(Tris) ومن ثم تقسيمه إلى جزأين الجزء الأول اضيف إليه Trehalose بنسبة 100 ملي مول/ مل والجزء الثاني استخدم كمجموعة سيطرة بعد ذلك اجريت عملية تجميد السائل المنوي المخفف بالنايتروجين السائل. أُجريت عملية الإسالة وفحص الحركة الفردية للنطف وقابليتها على البقاء لأطول مدة (1، 2، 3، 4، 5 ولغاية 6 ساعات) في درجة حرارة 37°م بعد شهر وشهرين وثلاثة أشهر من إجراء عملية التجميد، ولغرض اختبار قابلية نطف الكباش المحفوظة بالتجميد بالمخففات السابقة على الإخصاب تم استخدامها بالإخصاب الخارجي. أظهرت النتائج تأثيراً معنوياً ($P<0.05$) للمعاملة في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد إذ بلغت33.13 ± 0.91و10.63 ± 1.48% لمجموعتي المعاملة والسيطرة على التوالي. فيما لم يظهر تأثير للمعاملة على نسبة الإخصاب الخارجي للنطف بعد التجميد إذ بلغت للمجموعتين أعلاه 15.00±2.00 و16.31± 2.99% على التوالي.

The effects of Trehalose on the semen cryopreservation of Awasse ram

H. K. J. Al-Saab and A. A. Hubi
College of Agriculture\ University of Baghdad

Abstract

The purpose of this study was to determine the influence of Trehalose added to the freezing media on the semen cytological parameters post-thawing (motility, viability, fertility). The experiments were done on 32 ejaculates collected by artificial vagina from four Awassi rams aged 2.5-3 years as 2 ejaculate/ ram/ week. After collecting, the samples were pooling and diluted (1:20) in medium based on Tris in which Trehalose were added (100 mM/ml) or in medium without Trehalose (control). The diluted semen was cooled at 4Cº, placed in fine 0.25 ml French straws and then stored in liquid nitrogen, Thawing of the straws were done to evaluated the semen and to know the viability of sperm with 1-6 hours after thawing. *invitro* fertilization (*IV*F) used to evaluated the cryopreservation sperms. The results indicated that, there were a significant effect ($p<0.05$) for Trehalose (100 mM/ml) on the motility of sperms after thawing, which were 33.13±0.91 and 10.63±1.48% for treatment and control group respectively. There was no effect for the Treatments (Trehalose 100 mM/ml) on the *invitro* fertilization of sperms after thawing, which were 15±2.00 and 16.31±2.99% for both groups respectively.

المقدمة

لا يزال التجميد يمثل إجهاداً كبيراً للنطف إذ أن تجميد السائل المنوي يؤدي إلى حصول تدهور في نوعيته (1، 2). إن نطف اللبائن حساسة جداً تجاه انخفاض الحرارة ولاسيما جزء الغشاء البلازمي للنطفة إذ أن

*بحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

التجميد يؤدي إلى تغيرات في الغشاء ومنها تغير في فعالية البروتينات ومن ثم تتغير نفاذية الماء والمواد المذابة وهذا سيؤدي إلى فقد في حيوية النطف (3). وقد استخدمت المواد الحافظة لغرض المحافظة على النطف وتقليل الأضرار الناجمة عن التجميد (4)، والتي تقسم إلى مواد حافظة نافذة (Penetrating cryoprotectants). ومواد حافظة غير نافذة (Non-penetrating cryoprotectants) يكون تأثيرها خارجياً فقط، وهي مسؤولة عن توفير الحماية للنطف في أثناء التبريد السريع (5). ومن هذه المواد سكر التريهالوز Trehalose، وهو سكر ثنائي، وله عدد من الوظائف البايولوجية كمصدر للكاربون ومكون بنائي ومنظم للاوزمولارية ودخوله في تركيب الجدار الخلوي، وله دور في مقاومة الإجهاد (تغير درجات الحرارة) من خلال تفاعل التريهالوز مع البروتين وطبقة الدهون الثنائية مسببا ثباتيتها (6)، كما ذكر (7) ان له القدرة على حماية النطف من خلال تفاعله مع الفوسفوليبدات والتأثير الاوزموزي، وقد يكون له دور في مقاومة الإجهاد التاكسدي OR الذي تتعرض له النطف في أثناء التجميد، إذ لوحظ ان بعض الخلايا التي حدثت فيها طفرة أفقدتها القدرة على تصنيع التريهالوز قد فقدت القدرة على مقاومة الإجهاد التأكسدي، لكنها استعادت تلك القدرة بعد إضافة التريهالوز إليها (8)، وكذلك وجد ان له القدرة على تثبيط تكوين ROS مختبرياً *in vitro* (9) وبذلك قد يكون بالإمكان القول ان له القدرة على العمل كمضادة للأكسدة (Free radical scavenger). فقد ذكر (10) ان إضافة التريهالوز يعزز من مقدرة نظام مضادات الأكسدة الإنزيمي للنطف، ويزيد من نسب Vit. E في النطف بعد التجميد (11).

المواد وطرائق العمل

- **جمع وتخفيف السائل المنوي:** أجريت هذه التجربة للمدة من أيلول ولغاية تشرين ثاني/2011 في محطة بحوث الأغنام والماعز في منطقة عكركوف التابعة إلى الهيأة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، استعمل فيها 4 كباش عواسي تركي، بأعمار تتراوح ما بين 2.5 – 3 سنوات وبوزن 75–85 كغم، تم جمع السائل المنوي باستعمال المهبل الاصطناعي الخاص بالأغنام، بواقع 2 قذفة/ كبش/ أسبوع وتم إجراء الفحوص عليها، وتجميعها pooling، وتخفيفه بنسبة 1: 20 بمخفف (Tris) المكون من Tris (hydroxymethylamin methane) بتركيز 3.63 غم/ 100 مل و Citric acid بتركيز 1.99 غم/ 100 مل و Fructose بتركيز 0.5 غم/ 100 مل و Penicilline بتركيز 1: 100000 وحدة دولية/ 100 مل و Streptomycin بتركيز 100 ملغم/ 100 مل و20% صفار البيض.
(التركيز النهائي للنطف= 10.6 x 10^5 نطفة/ مللتر) وتقسيمه إلى جزأين الجزء الأول أضيف إليه Trehalose بنسبة 100 ملي مول/ مل لغرض تجميده.
- **طريقة تجميد السائل المنوي:** بعد جمع السائل المنوي وتخفيفه تم نقله إلى مركز التلقيح الاصطناعي/ أبو غريب التابع إلى الشركة العامة لخدمات الثروة الحيوانية، حيث تم تبريده إلى درجة 5°م وتعبئته آليا في قساطر (French straws) 0.25 مل (IMV, France) (تركيز النطف= 57.5 x 10^6 نطفة/ قسطرة) وتركه لمدة تعادل 2–2.5 ساعة عند درجة حرارة 5م°، بعدها نقل إلى حوض النايتروجين السائل وتركه لمدة 10 دقائق في بخار النايتروجين –75 م°، ثم غمره في سائل النتروجين (–196م°).
- **فحص الحركة الفردية للنطف:** تم إخراج القسطرة من حوض النتروجين السائل ووضعت مباشرة في حمام مائي بدرجة 37م° لمدة 30 ثانية (12)، وضعت قطرة منها على شريحة زجاجية بدرجة حرارة 37م وتم فحص الحركة الفردية للنطف، تم فحص الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة (0، 1، 2، 3، 4، 5، 6) ساعة بعد مرور شهر وشهرين وثلاثة أشهر من التجميد.

- **الإخصاب الخارجي:** أجريت في مختبرات معهد بحوث الأجنة وعلاج العقم التابع إلى جامعة النهرين في الكاظمية، للمدة من 1 آذار –15 مايس لإجراء عملية الإخصاب الخارجي (*IVF*). حيث تم جمع المبايض من المجزرة ووضعها في عبوة زجاجية تحتوي محلول ملحي فسلجي ومضادات حيوية (penicillin وبتركيز 100 وحدة دولية/ مل وStreptomycin بتركيز 0.1 مليغرام/ مل) ونقلها إلى المختبر بدرجة حرارة 30–37م°خلال 1–1.5 ساعة، وبعد نقلها إلى المختبر تم غسلها 3 مرات بالمحلول الفسلجي المدعم بالمضادات الحيوية (13). تم جمع البويضات بطريقة Oocytes aspiratioin، وتم استبعاد البويضات التالفة. تم وضع كل 5–7 بويضات في صحن مختبري صغير خاص بالإخصاب الخارجي (Falconcom. U.S.A) يحتوي 0.5 مل من الوسط الزرعي (تم استعمال الوسط الزرعي RPMI-1640) وتغطيتها بطبقة من زيت البارافين (Paraffin oil) ووضعها في حاضنة Co_2 (CO_2 5% ودرجة حرارة 38.5م° ورطوبة نسبية 95% ولمدة 24 ساعة). تم اعتماد طريقة السباحة إلى الأعلى لتنشيط النطف (Sperm activation) بعد الإسالة لغرض الإخصاب (14). تم اخذ كل 5 بويضات ناضجة في 0.5 مل من الوسط الزرعي في الصحن المختبري وأضيف لها النطف بواقع 5 × 10^4 نطفة/ بويضة وتغطيتها بطبقة من زيت البارافين السائل ووضعها في حاضنةCo_2.

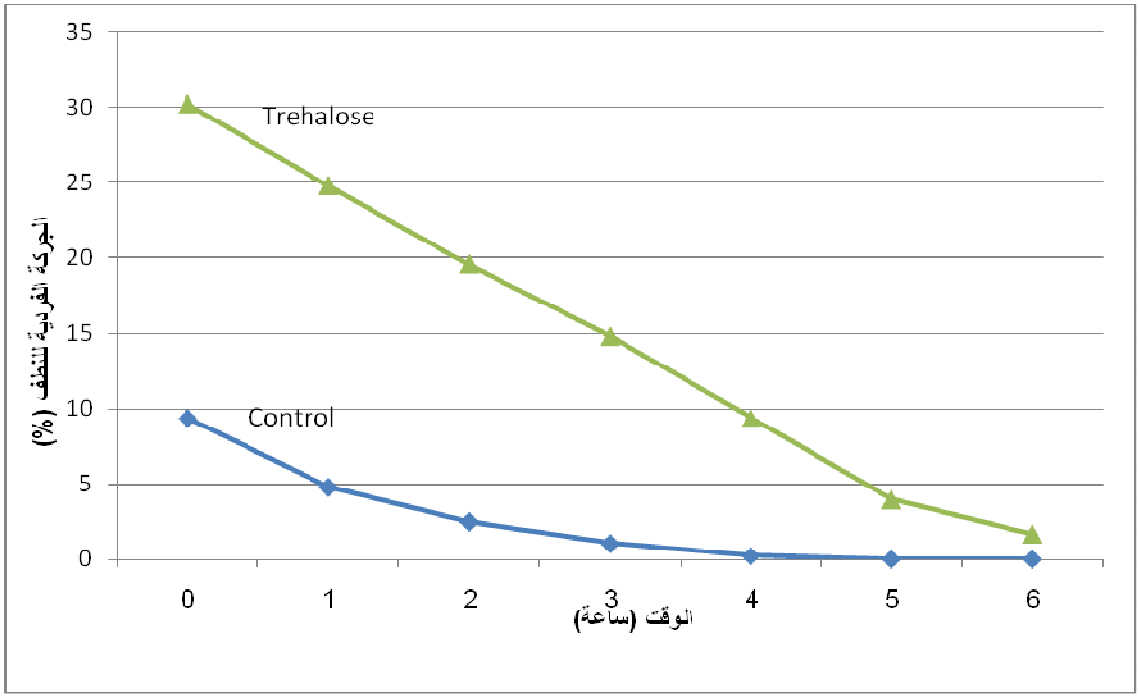
النتائج

- **تأثير إضافة Trehalose في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد:** أظهرت النتائج تأثيراً معنوياً ($P<0.05$) لإضافة Trehalose إلى مخفف السائل المنوي للكباش في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد إذ بلغت 33.13 ± 0.91، 10.63 ± 1.48% بعد مرور شهر واحد و30.00 ± 1.34، 9.38 ± 1.48% بعد شهرين و27.50 ± 1.89، 8.125 ± 0.91% بعد ثلاث أشهر من تجميد السائل المنوي لمجموعة المعاملة والسيطرة على التوالي (جدول 1).
- **تأثير إضافة Trehalose في مقاومة النطف:** كان لإضافة Trehalose إلى مخفف السائل المنوي للكباش تأثير معنوي ($P<0.05$) في مقاومة النطف عند حضنها لمدة 6 ساعات بدرجة حرارة 37م°، إذ نلاحظ انه حافظ على استمرار النطف بالحركة طول مدة الحضن وبفعالية اكبر لمجموعة المعاملة مقارنتا بمجموعة السيطرة (الشكل 1)، فقد بلغ معدل الحركة الفردية للنطف للأشهر الثلاثة بعد التجميد وبعد 4 ساعات من الحضن 9.38 ± 1.18، 0.21± 0.21% للمجموعتين أعلاه على التوالي (جدول 1).
- **تأثير إضافة Trehalose في نسبة الإخصاب الخارجي (*IVF*):** إن نسب الإخصاب الخارجي للنطف المسالة بعد التجميد لم تتأثر بإضافة Trehalose إذ بلغت 14.38 ± 2.44، 16.31± 2.99% لمجموعة المعاملة ومجموعة السيطرة على التوالي.

جدول (1) تأثير إضافة Trehalose إلى مخفف السائل المنوي للكباش في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد

مدة التجميد	نوع المعاملة	الحركة الفردية للنطف (%) بعد الإسالة بـــ(ساعة)						
		0	1	2	3	4	5	6
شهر	معاملة	^{bc}0.91±33.13	^{bc}0.94±27.50	^{bc}1.88±21.88	^{b}2.06±18.75	^{b}1.88±13.13	^{bc}1.88± 6.88	^{c}1.88±3.13
	سيطرة	^{f}1.48±10.63	^{f}1.13±5.63	^{f}1.34±2.50	^{f}0.82±1.25	^{e}0.63± 0.63	^{d}0.00± 0.00	^{c}0.00± 0.00
شهرين	معاملة	^{b}1.34±30.00	^{b}1.48±24.38	^{b}1.13±19.38	^{b}1.57± 13.75	^{b}1.57± 8.75	^{bc}0.91± 3.13	^{b}0.91± 1.88
	سيطرة	^{d}1.48±9.38	^{d}1.89±5.00	^{d}1.32±3.13	^{d}1.25±1.25	^{e}0.00± 0.00	^{c}0.00± 0.00	^{b}0.00±0.00
ثلاث أشهر	معاملة	^{c}1.89±27.50	^{c}2.50±22.50	^{c}2.50±17.50	^{b}2.82±11.88	2.06± 6.25	^{c}0.91± 1.88	^{c}0.00± 0.00
	سيطرة	^{f}0.91±8.125	^{g}1.25±3.75	^{f}0.91±1.88	^{c}0.63±0.63	^{d}0.00± 0.00	^{c}0.00± 0.00	^{c}0.00± 0.00
المعدل	معاملة	^{c}0.93±30.21	^{c}1.06±24.79	^{c}1.12±19.58	^{c}1.36±14.79	^{c}1.18±9.38	^{c}0.85± 3.96	^{c}0.72± 1.67
	سيطرة	^{e}0.76±9.38	^{g}0.82±4.79	^{f}0.68±2.50	^{e}0.52±1.04	^{e}0.21±0.21	^{e}0.00± 0.00	^{c}0.00± 0.00

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها ($P < 0.05$).



الشكل (1) تأثير إضافة Trehalose في مقاومة النطف للحضن بعد التجميد والإسالة (معدل الأشهر الثلاثة)

المناقشة

ان التحسن الذي حصل عند إضافة Trehalose إلى مخفف السائل المنوي للكباش في الحركة الفردية للنطف بعد التجميد قد يعود إلى مقدرته بالمحافظة على حيويتها (15)، وان فعل Trehalose في حفظ النطف قد يعزى إلى قابليته المضادة للأكسدة (10)، ودعمه لعملية خروج الماء من داخل النطف في أثناء عملية التجميد وتقليل حدوث التبلور داخلها، من خلال تأثيره في الممرات الموجودة بالغشاء البلازمي (16)، ويزيد من نسب Vit.E في النطف بعد التجميد (11)، وقد سجل (17) ارتفاعا في نسب أنزيمات Catalase (CAT) و Glutathione peroxidase (GSH-Px) في نطف الثيران بعد التجميد عند إضافة التريهالوز إلى المخفف بتركيز (100 ملي مول)، كما ان للتريهالوز دوراً في عملية تنظيم وزيادة سيولة الأغشية البلازمية للنطف وكبح أو تثبيط عملية تحول الدهون فيها من الحالة السائلة إلى الصلبة من خلال تفاعله مع الفوسفوليبد فيها عند فقدان الماء خلال عملية تجميد السائل المنوي (18)، كما ذكر (19) ان له دوراً تآزرياً مع الكليسرول في منع تكون البلورات الثلجية داخل النطف عند التجميد. فيما لم يجد (20) لاستعماله مع الكليسرول في مخففات تجميد السائل المنوي للكباش فائدة إضافية، وهذا مالا يتفق مع ما وجدناه في هذه الدراسة. ان نتائج استخدام Trehalose في حفظ الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة (36.04±1.38 و 9.583±0.47%) لمجموعتي المعاملة والسيطرة كانت اقل مما حصل عليه (21) من تفوق المخفف الذي يحتوي Trehalose 62.5 mM على السيطرة (40.0±8.5، 16.4±9.3%) في الكباش، وما وجده (22) من تفوق المخفف الذي يحتوي 100 mM Trehalose معنويا في حفظ الحركة الفردية لنطف الكباش بعد الإسالة على مجموعة السيطرة (67.5±3.2، 53.5±4.7%)، وما وجده (17) من تأثير المخفف الذي يحتوي Trehalose 100 mM مقارنة بمجموعة السيطرة (46.61±1.62، 36.88 ± 1.53%)، و(20) الذي وجد ان المخفف الذي يحتوي 100 ملي مول Trehalose قد حسن من حفظ الحركة الفردية لنطف الكباش بعد الإسالة مقارنة بالسيطرة (49.2±2.7، 23.7±2.7)، وما وجده (23) من تأثير مخفف Trehalose 100mM في الماعز مقارنة بالسيطرة

(52.36±0.60،35.45±0.69%)، وقد جاءت هذه النتائج أعلى مما وجده (15) من تأثير معنوي Trehalose بتركيز 0.075 مول على الحركة الفردية للنطف بعد الإسالة مقارنة بمجموعة السيطرة (21.9±3.6، 14.0±2.4%). كما ان Trehalose دور في المحافظة على الأغشية البلازمية إذ ذكر (21) ان إضافة التريهالوز بتركيز 62.5 ملي مول إلى مخفف السائل المنوي للكباش كان له تأثير معنوي في تحسين حركة وسلامة الأغشية البلازمية للنطف بعد التجميد والإسالة إذ بلغت 16.4±9.3 و26.7±7.9% مقارنة مع مجموعة السيطرة البالغة 3.5±3.5 و16.5±7.2% على التوالي، كذلك فقد سجل (23) تفوقاً للمخففات التي أضيف إليها التريهالوز وبتراكيز مختلفة (50، 75، 100 ملي مول) في حركة نطف الماعز بعد التجميد والتي كانت 43.54±0.72 و50.36±0.5 و52.36±0.60 و35.45±0.69%، فيما كانت 45.72±0.94 و49.32±0.81 و54.54±0.70 و35.65±0.74% لصفة سلامة الأغشية البلازمية للنطف المحفوظة بالمخففات بالتراكيز اعلاه ومجموعة السيطرة على التوالي. كما ذكر (22) ان استعمال التريهالوز بتركيز (50، 100، 150 ملي مول) في مخفف السائل المنوي للكباش قد حسن من صفة حركة وسلامة أغشية النطف بعد التجميد، وان أفضل تركيز والذي أعطى فروقاً معنوية عن مجموعة السيطرة هو 100 ملي مول إذ بلغت 62.5±3.3 و68.0±2.9 و72.0±3.7 و28.5±4.2% للتركيز أعلاه مع مجموعة السيطرة على التوالي لحركة النطف، فيما كانت نتائج سلامة الأغشية 61.4±3.1 و66.1±2.8 و68.2±3.9 و26.9±3.8% على التوالي. أما (17) فقد لاحظ باستعمال تراكيز مختلفة من التريهالوز في مخففات السائل المنوي للثيران ان أفضلها كان تركيز100 ملي مول إذ بلغت حركة النطف 46.61±1.62 و36.88±1.53%، فيما كانت سلامة الاكروسوم 64.78±1.35 و53.40±1.85 لمجموعة المعاملة والسيطرة على التوالي. فيما ذكر (15) ان أفضل تركيز للتريهالوز في مخفف السائل المنوي للكباش هو75 ملي مول إذ بلغت حركة النطف 21.9±3.6 و14.0±2.4% لمجموعة المعاملة والسيطرة على التوالي.

المصادر

1. Andrabi, S. M. H 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. Int. J. Agri. and Biol., 9: 367-369.
2. Mahfouz, R.; Sharma, R.; Thiyagarajan, A.; Kale, V.; Gupta, S.; Sabanegh, E. & Agarwal, A. 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. Fertil. Steril., doi:10.1016/j. fertnstert .12.030.
3. Bailey, J. L.; Morrie, A. & Cormier. 2003. Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. Canadian J. Anim. Sci., 83:393-401.
4. Manafi, M. 2011. Artificial Insemination in Farm Animals. Published by In Tech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
5. Muldrew, K.; Acker, J. P.; Elliott, A. W. & McGann, L. E. 2004. The Water to Ice Transition: Implications for Living Cells. In Life in the Frozen State. Edited by Fuller BJ, Lane N, Benson EE: CRC Press LLC.
6. Auton, M. & Bolen, D. W. 2007. Application of the transfer model to understand how naturally occurring osmolytes affect protein stability. Methods Enzymol., 428:397-418.
7. Liu, Z.; Foote, R. H. & Brockett, C. C. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. Cryobiol., 37: 219-230.

8. Benaroudj, N.; Lee, D. H. & Goldberg, A. L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. J. Biol. Chem., 276:24261-24267.
9. Chen, Q. & Haddad, G. G. 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. J. Exp. Biol., 207:3125-3129.
10. Aisen, E.; Quintana, M.; Medina, V.; Morello, H. & Venturino, A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. Cryobiol., 50: 239-249.
11. Bucak, M. N.; Ateşşahin, A.; Varışlı, O.; Yüce, A.; Tekin, N. & Akçay, A. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology, 67:1060-1067.
12. Bacinoglu, S. & Kemal, A. K. 2007. The effects of thawing time, post thawed thermal applications and resistance test on semen characteristics in bulls. J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ., 33 (2): 12-22.
13. Rezk, W. A. K. 2009. Studies on In Vitro Fertilization in Camels (Camelus dromedaries) Faculty of Agriculture Animal Production Department Mansoura University (PhD thesis).
14. DeSmedt, V.; Crozed, N.; Ahmed-Ali, M.; Martino, A. & Cogine, Y. 1992. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. Theriogenology, 37:1049-1060.
15. Yamashiro, H.; John, R. W.; Edward, O.; Satoshi, S.; Stefan, M.; Eimei, S.; Edward, O. R. & Mwai, O. 2011. A case study on cryopreservation of African sheep semen for the Red Maasai, Dorper breeds and their crosses. Afr. J. Agric. Res., 6(4): 844-848.
16. Nicolajsen, H. & Hvidt, A. 1994. Phase behavior of the system trehalose–NaCl–water. Cryobiol., 31: 199-205.
17. Hu, J. H.; Zan, L. S.; Zhao, X. L.; Li, Q. W.; Jiang, Z. L.; Li, Y. K. & Li, X. 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. J Anim. Sci., 88:1657-1662.
18. Fernandez-Santos, M. R.; Martinez-Pastor, F.; Garcia-Macias, V.; Esteso, M. C.; Soler, A. J.; de Paz, P.; Anel, L. & Garde, J. J. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert acomplex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa. Theriogenology, 67:738-753.
19. Aisen, E. G.; Medina, V. H. & Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology, 57: 1801-1088.
20. Tonieto, R. A.; Goularte, K. L.; Gastal, G. D. A.; Schiavon, R. S.; Deschamps, J. C. & Lucia, Jr. T. 2010. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Short communication. Small Rum. Res., 93: 206-209.
21. Soylu, M. K.; Nur, Z.; Ustuner, B.; Dogan, I.; Sagirkaya, H.; Gunay, U. & Aki, K. 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolarity on post-thawed ram semen. Bull Vet. Inst. Pulawy, 51: 241-246.
22. Uysal, O. & Bucak, M. N. 2009. The role of different trehalose concentrations and cooling rates in freezing of ram semen Ankara Üniv Vet. Fak Derg, 56:99-103.
23. Khalili, B.; Farshad, A.; Zamiri, M. J.; Rashidi, A. & Fazeli, P. 2009. Effects of Sucrose and Trehalose on the Freezability of Markhoz Goat Spermatozoa. Asian-Aust. J. Anim. Sci., (22)12: 1614- 1619.