

αリノレン酸を豊富に含む亜麻仁油の給与が 豚精液の低温耐性に及ぼす影響

才力慎也・飯塚 悟・谷原 史倫*)・平田 真樹*)・音井 威重*)・新居雅宏

要 約

予期せぬ家畜伝染病に対するリスク管理として、豚の精液の凍結保存技術の確立が必要とされている。しかし、豚精子の耐凍能は低い。そこで、精子耐凍能の向上を目的とし、n-3系多価不飽和脂肪酸であるαリノレン酸(C18:3n3)を豊富に含む亜麻仁油を飼料に添加することで精子の脂肪酸組成を変化させ、低温保存下における精子活力の向上を試みた。加えて、精子活力と精子脂肪酸組成との関連性について検討した。

約60%のC18:3n3を含む亜麻仁油を30ml/日添加により飼料中の脂肪酸割合は基礎飼料に比べてC18:3n3の割合が9%高くなったが、精子中にC18:3n3は検出されず、他の脂肪酸組成にも変化はみられなかった。また、低温保存下における精子活力及び凍結融解後の精液性状に試験区間差はみられなかった。一方、低温保存下において精子活力と精子の脂肪酸組成組成について、C22:6n3およびn-3/n-6比に正の相関傾向を示す固体がみられ($r=0.3$ 程度)、精子中のn-3系多価不飽和脂肪酸を増加させることにより低温下の精子活力が向上することが示唆された。

目 的

近年の口蹄疫、豚コレラなど予期せぬ家畜伝染病の発生に対するリスク管理として受胎率の高い凍結精液の作製技術の確立が急務である。しかし、豚の精子は耐凍能が低く、実用的な凍結精液作製技術が確立されていない¹⁾。これまでに外因性の脂肪酸の給与により精子の脂肪酸組成を変化させ、精子の耐凍能を向上させる研究が報告されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾。そこで精子耐凍能の向上を目的とし、n-3系多価不飽和脂肪酸であるαリノレン酸(18:3n3)を豊富に含む亜麻仁油を給与し、精子の脂肪酸組成を変化させ、低温

に対する精液性状の向上を試みた。加えて、精子の脂肪酸組成と精子活力との関連性について解析した。

*)徳島大学大学院社会産業理工学研究部

材料および方法

1) 飼料成分量、試験期間、試験区分

試験期間、試験区分について表1に示した。また、基礎飼料として用いた市販種豚用飼料成分量について表2に示した。給与区は基礎飼料に亜麻仁油(株式会社ニューサイエンス)を30mL添加した。

表1 試験区分

	品種	飼料	採精期間
給与区	大ヨークシャー種:2頭(A,B*) ランドレース種:(C)	平成29年12月26日～平成30年8月3日 市販種豚用飼料に亜麻仁油30mlを添加 平成30年8月4日～平成30年11月30日 市販種豚用飼料	平成29年12月26日 ～平成30年11月30日
対照区	大ヨークシャー種:3頭(D,E,F)	平成29年12月26日～平成30年11月30日 市販種豚用飼料	
*Bについては、体調不良により4月26日以降の採精中止			

	平成29年12月26日～	～8月3日	～平成30年11月30日
給与区	市販種豚用飼料+亜麻仁油30ml		市販種豚用飼料
対照区	市販種豚用飼料		
	← 採精期間 →		

表2 市販種豚用飼料成分量 (%)

粗たん白質	14.0
粗脂肪	2.0
粗繊維	10.0
粗灰分	10.0
カルシウム	0.75
りん	0.60
TDN	72.0

2) 精液性状の評価

(1) 低温保存試験

採精は1週間に1回、用手法により採精し、モデナ液で3倍に希釈後、発泡スチロールに入れ、4℃で保存し、3週間後の精子活力を確認した。精子活力は37℃のウォーターバスで15分加温後、37℃に加温したスライドガラス上に滴下した精液を顕微鏡下で観察した。「非常に活発な前進運動(+++)」、「活発な前進運動(++)」、「緩慢な前進運動(+)」、「振り子運動(±)」、「全く運動しない(-)」の5段階に区分した。本試験では(+++)の割合を精子活力(%)として使用した。

(2) 凍結試験

低温保存試験に用いた一部の精液を凍結し、融解後の精液性状を評価した。精液の凍結は平成29年12月26日、平成30年2月2日と9日(2回に分けて採精)、平成30年2月23日に実施した。凍結保存液としてNSF溶液(Niwa and Sasaki Freezing Extender)を用いた。本試験は1次希釈液

と2次希釈液からなり、毎回の試験前に新鮮なものを用意した。採精した精液を0.25mlの凍結精液用ストローに注入し、液体窒素蒸気中で10分間冷却した後に、液体窒素中に投入して凍結保存した。凍結精液は38℃で融解し、豚媒精液で10倍希釈し精液1 mLを融解直後と3時間38℃で保持した後に次の手法により精液性状を評価した。

① 精子運動性の評価

試験にあたり、位相差顕微鏡のステージ上に加温板(37℃)を設置し、サンプルは、MAKLER COUNTING CHAMBERに5μLの精液サンプルを滴下して鏡検した。精子の運動性はコンピュータ精液分析システムを用いて評価した。分析には×10位相差用BM対物レンズを使用して、デジタル画像1枚/40 msの速さで1視野当たり1秒間撮影した。1サンプル当たり3-5視野撮影して、約500個の精子を計測し、運動性として評価した。

② 精子生存性の評価

LIVE/DEAD sperm viability kitを用い、精子の生存率を評価した。リン酸緩衝液45μLと精液サンプル5μLを緩徐に混合して希釈攪拌し、5分間インキュベートした。次にSYBR-14を3μL

加え攪拌, 38°Cで10分間インキュベートして一次染色を行った後, propidium iodideを加えて攪拌, 5分間インキュベートして二次染色を行った。染色したサンプルを10 μ L スライドガラスにとり, カバーガラスをかけて鏡検した。精子生存性は, 480 nm 波長励起フィルターの蛍光顕微鏡で観察し, 1視野あたり100以上の精子をカウント, その中でSYBR-14陽性で緑色に見えるものを生存, PI陽性で赤色に見えるものを死滅として判定した。なお, 精子は3視野観察し, その平均値で生存性を評価した。

③精子細胞膜の評価

精子細胞膜の評価をHypoosmotic swelling test (HOST) により行った。Hypoosmotic mediumとして, 0.0735gクエン酸2水和物と0.135gフルクトースに純水を加えて10 mL にメスアップし, 浸透圧を測定して150 mOsm/kg に調整したものを用いた。Hypoosmotic medium 90 μ L に, 精液サンプル10 μ L を加えて混和, 38 °C で10分間インキュベートした。その後よくピペティングして10 μ L をスライドガラスに取り鏡検し, 尾部が膨化, カールした精子を陽性(細胞膜の正常なもの, 尾部に変化がなく真直ぐなままの精子を陰性(細胞膜の膜透過性が異常なもの)として判定した。標本全体を鏡検して精子数の合計が100以上になるようカウントし, これを3回繰り返す, その平均値で評価した。

④精子先体の評価

先体の正常性を, fluorescein isothiocyanate-PNA(FITC-PNA-PI; SIGMA) による染色性で評価した。精液サンプルをピペティングした後, スライドガラスに塗沫, 風乾させ, 100 % エタノールに10分間室温で浸漬後, 固定した。固定, 風乾後, DPBS[-] で希釈後のFITC-PNA (100 μ g/mL) を30 μ L 塗布して10分間38 °Cのインキュベーター内に静置して一次染色した。取

り出した後, PIを5 μ L 塗布して更に10分間37 °Cのインキュベーター内に静置して二次染色した。その後DPBS[-] で洗い, FITCフィルターの蛍光顕微鏡で鏡検した。精子の頭部がFITC-PNA陽性で緑色に染色されているものを陽性(先体保持), 赤色に染色されていないものを陰性(先体消失)として判定した。精子数が100以上になるようカウントし, これを3視野以上繰り返す, その平均値で評価した。

3) 脂肪酸組成

精子の脂肪酸組成の分析は採精後, -30°Cの冷凍庫の中で保存した後, 次のとおり実施した。脂肪酸の分析は新居ら⁹⁾の報告をもとにBligh-Dyer法により脂質を抽出した後, ガスクロマトグラフィー用試料を調整した。すなわち, 7mL程度の精液を遠心分離し, 上層を除去し, クロロホルム:メタノール=1:2混液3mLを加え30分間放置し, さらにクロロホルム:水=1:1.8混液2.8 mLを加えて10分間放置し, 遠心分離後, 最下層を採取し, 窒素ガスで濃縮後0.5NNaOHメタノールでけん化処理した後三フッ化ホウ素メタノール液でメチルエステル化した。そして, 飽和食塩水, ヘキサンを加え, ヘキサン部をガスクロマトグラフィー(島津製作所GC-2014)に注入し, リテンションタイムにより脂肪酸を同定し, 全脂肪酸を合計し, それぞれの割合を百分率により示した。種豚用基礎飼料および亜麻仁油はクロロホルム-メタノール混液改良抽出法により脂質を抽出した後, 上記と同様の方法で脂肪酸分析を行った。ガスクロマトグラフィーの定量条件は表3のとおりである。

表3 ガスクロマトグラフィーの定量条件

Model	GC-2014(Shimadzu)
Sample	1 μm
Colum	Superuknowax-10 fused silica capillary column 30m 0.32mmID 1.0 μm film
Temperature	Det.:280°C Inj.:260°C Colum initial temp.1min at 200°C 40min at 230°C Rate:4°C/min 10min at 240°C Rate:4°C/min
Carrier gas:He Flow rate:1.5min/min Linear Velocity:33.3cm/Sec Make up gas:N ₂ Split ratio:20:1	

結 果

1) 飼料中の脂肪酸組成

飼料中の脂肪酸組成を表4に示した。亜麻仁油にはC18:3n-3(αリノレン酸)が59.88%含まれていた。基礎飼料中の多価不飽和脂肪酸n-6(n-6PUFA)/n-3(n-3PUFA)は13.25であり、亜麻仁油添加飼料は2.73であった。

表4 供試飼料の脂肪酸組成 (%)

項目	亜麻仁油	基礎飼料	亜麻仁油 基礎飼料
C12:0	Trace	0.04	0.03
C14:0	Trace	0.43	Trace
C14:1	Trace	0.08	0.07
C15:0	Trace	0.07	0.08
C16:0	4.98	15.24	14.07
C16:1	Trace	0.76	0.71
C17:0	Trace	0.15	0.17
C17:1	Trace	0.13	0.13
C18:0	3.51	3.82	4.17
C18:1n9	15.43	35.43	35.02
C18:2n6	16.03	37.88	32.24
C18:3n3	59.88	2.68	11.68
C20:0	Trace	0.29	0.26
C20:1n9	Trace	0.49	0.48
C20:2n6	Trace	0.07	0.05
C20:3n6	Trace	0.03	0.03
C20:5n3	Trace	0.18	0.15
C22:1n9	Trace	0.03	Trace
C24:0	Trace	0.16	0.13
unknown	0.16	2.01	0.53
n-6PUFA	16.03	37.98	32.32
n-3PUFA	59.88	2.87	11.83
n-6/n-3	0.27	13.25	2.73

2) 精液性状の評価

(1) 低温保存試験

平成29年12月26日～平成30年11月30日までの低温保存採精直後の精子活力の平均を図1に、3週目の精子活力の平均を図2に、低温保存後活力3週目/直後比を図3に示した。なお、給与区の1頭について体調不良により、4月26日以降採精を中止した。また、図2、図3については、採精直後の活力が70%以下の精液は結果から除外した。採精直後の精液は、試験区間有意差はみられなかったが、7月、8月に給与区が低い傾向となった。低温保存精子活力は試験区間有意差はなかったが、4月～7月と11月に給与区が低くなる傾向がみられた。低温保存3週目/採精直後の割合も同様の傾向がみられた。

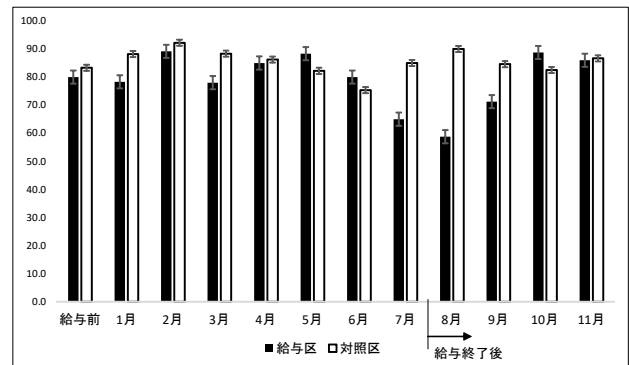


図1 低温保存後精子活力 採精直後 (%)

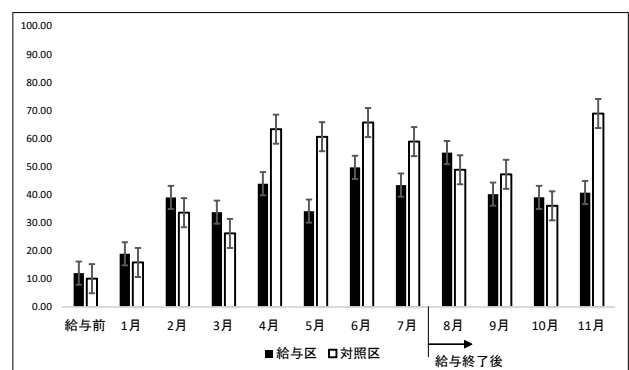


図2 低温保存後精子活力 3週目 (%)

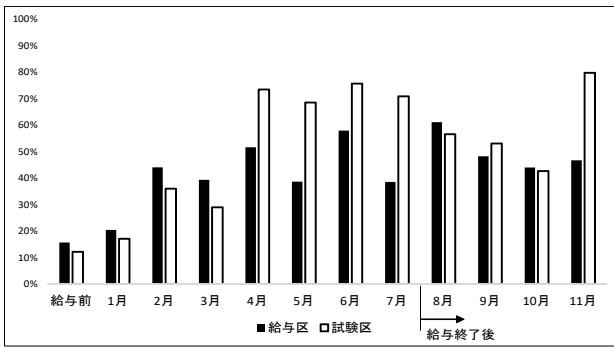


図3 低温保存後活力 3週目/直後

(2) 凍結試験

凍結試験①～④の結果を表5に示す。凍結試験①～④のいずれにおいても、試験区間有意差はみられなかった。

表5 凍結試験の結果

		12/26	2/2.9	2/23
①精子運動性	給与区	78.5	75.7	72.1
	対照区	61.9	70.6	75.0
②精子生存性	給与区	59.1	60.4	58.7
	対照区	38.7	56.2	61.1
③精子細胞膜	給与区	27.3	31.2	33.9
	対照区	26.8	31.7	33.4
④精子先体	給与区	88.1	97.3	97.9
	対照区	87.7	97.2	98.5

3) 精子の脂肪酸組成

試験区と対照区の精子の脂肪酸組成を表6, 7に示す。亜麻仁油に多く含まれるC18:3n3は全期間どの個体からも検出されなかった。C22:6n3, n-3PUFA, 多価不飽和脂肪酸(totalPUFA)が給与区で有意に高くなった(p<0.05)。一方で飽和脂肪酸(totalSFA)が給与区で有意に低くなった(p<0.05)。

表6 給与区(%)

	給与前	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
C14:0	13.51	12.36	13.88	12.22	13.53	10.81	12.51	10.51	10.86	14.13	12.21	11.79
C16:0	23.94	28.69	29.93	24.58	20.86	24.42	23.89	23.38	24.48	24.38	27.26	23.11
C18:0	11.02	12.91	13.19	10.97	9.14	10.48	10.47	10.12	10.79	10.37	11.37	10.80
C18:1n9	5.86	7.68	7.42	5.12	3.91	4.80	5.47	5.26	5.51	3.97	3.95	5.48
C18:2	3.70	3.99	3.93	4.21	3.93	3.51	3.67	3.80	4.02	3.82	3.99	3.75
C18:3n3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3n3	4.78	2.87	2.65	3.01	3.23	4.27	4.42	4.22	3.99	3.54	4.02	4.43
C22:6n3	30.17	25.80	24.81	33.80	39.51	36.86	34.85	37.59	35.97	28.91	29.61	33.73
n-6PUFA	4.35	6.02	5.10	5.40	5.24	3.87	4.58	6.82	6.90	5.24	4.65	4.41
n-3PUFA	34.96	28.75	27.46	38.76	42.74	41.13	39.27	41.81	39.97	32.45	33.63	38.16
n-3/n-6	8.19	5.71	6.22	8.61	10.16	11.20	9.05	6.36	5.92	6.63	7.54	8.94
totalSFA	53.11	55.86	59.62	50.57	46.14	49.75	50.60	46.04	47.63	52.30	54.21	48.28
totalMUFA	7.58	9.36	7.82	5.27	5.88	5.25	5.55	5.33	5.66	10.01	7.52	9.15
totalPUFA	39.30	34.78	32.57	44.16	47.98	45.00	43.85	48.63	46.99	37.69	38.28	42.57
									→給与終了後			

表7 対照区(%)

	給与前	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
C14:0	17.91	15.90	16.09	16.86	19.53	14.97	14.16	15.06	16.42	15.43	13.20	16.99
C16:0	28.69	30.59	28.71	30.43	21.08	27.62	26.08	26.01	25.09	25.20	28.96	25.10
C18:0	11.79	13.36	12.54	7.88	6.51	11.52	10.88	10.96	10.86	10.10	11.21	11.55
C18:1n9	6.12	8.84	8.89	4.09	4.21	5.22	6.25	5.41	10.73	5.55	5.77	7.94
C18:2	3.86	3.58	4.19	4.28	3.47	3.69	3.73	3.58	3.73	4.16	4.31	4.38
C18:3n3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3n3	4.36	1.93	1.69	1.34	2.60	4.49	4.42	4.69	3.94	3.81	3.99	3.77
C22:6n3	22.70	21.57	24.93	31.99	36.63	27.58	29.92	29.97	25.33	27.09	23.18	23.36
n-6PUFA	5.02	5.62	5.46	6.37	5.29	4.18	4.80	6.19	6.42	5.63	4.70	4.97
n-3PUFA	27.06	23.50	26.62	32.88	39.22	32.07	36.34	34.66	28.81	30.90	27.17	27.13
n-3/n-6	6.59	4.43	5.17	5.82	8.13	8.16	8.45	5.67	4.53	5.99	5.90	5.67
totalSFA	61.47	60.79	58.67	56.05	48.94	57.53	52.94	53.69	52.08	48.65	58.11	55.92
totalMUFA	6.45	10.09	9.25	4.69	6.54	6.22	5.92	5.46	14.30	9.42	10.02	11.98
totalPUFA	32.08	29.12	32.08	39.26	44.52	36.25	41.14	40.85	34.89	33.60	31.87	32.10

4) 低温保存後精子活力と脂肪酸組成の相関

3週低温保存後精液活力と脂肪酸組成の相関係数を表8, 9に示した。表8でC20:3n3では個体F(p<0.01), C22:6n3では個体B(p<0.05), n-3/n-6比では個体A, B, Eにおいて有意な正の相関がみられた(p<0.05)。飽和/不飽和では個体Dにおいて有意な負の相関がみられた(p<0.01)。有意ではないが, C14:0, C16:0, 18:0, 18:1n9は多くの個体で負の相関傾向, C22:6n3は全個体で正の相関傾向がみられた。

表9で有意な相関はC20:3n3で個体E, Fがそれぞれ0.50(p<0.01), 0.43(p<0.05), C22:6n3で個体Bが0.35(p<0.05)であった。有意ではないが, C14:0, C16:0, 18:0, 18:1n9は多くの個体で負の相関傾向, C20:3n3, C22:6n3は全個体で正の相関傾向がみられた。

表8 低温保存後精子活力と脂肪酸組成の相関(全期間)

12~12月	A	B	D	E	F
	試験区		対照区		
精子活力					
C14:0	-0.08	-0.09	0.28	-0.20	0.08
C16:0	-0.14	-0.20	-0.21	-0.26	-0.26
C18:0	-0.11	-0.22	-0.10	0.04	-0.04
C18:1n9	0.02	-0.28	-0.19	0.04	-0.01
C18:2	0.07	-0.03	0.00	-0.14	-0.06
C20:3n3	-0.02	0.17	0.12	0.26	0.37**
C22:6n3	0.03	0.28*	0.24	0.19	0.04
飽和/不飽和	-0.09	-0.25	-0.37**	-0.14	-0.18
n3/n6	0.30*	0.34*	0.26	0.31*	0.25

*:p<0.05 **:p<0.01

表9 低温保存後精子活力と脂肪酸組成の相関(給与期間)

12~8月	A	B	D	E	F
	試験区		対照区		
精子活力					
C14:0	-0.09	0.01	0.32	-0.28	0.00
C16:0	-0.21	-0.30	-0.16	-0.21	-0.33
C18:0	-0.19	-0.32	-0.16	0.06	-0.19
C18:1n9	-0.02	-0.29	-0.27	-0.02	-0.28
C18:2	0.21	0.01	0.02	-0.21	-0.05
C20:3n3	0.01	0.10	0.12	0.50**	0.43*
C22:6n3	-0.03	0.35*	0.23	0.16	0.32

*:p<0.05 **:p<0.01

5) 凍結融解後精子性状と低温保存後精子活力の相関

凍結融解後の精子性状と低温保存後精子活力の相関を表10に示す。精子細胞膜, 精子先体の

評価結果と3週間低温保存後の精子活力において有意な相関がみられた ($p < 0.05$)。また、精子生存性と3週間低温保存後の精子活力で有意ではないが正の相関傾向がみられた。

表10 凍結融解後精子性状と低温保存後精子活力の相関

	活力
精子運動性	0.18
精子生存性	0.45
精子細胞膜	0.61*
精子先体	0.77*
*: $p < 0.05$	

考 察

他の畜種に比べて耐凍能の低い豚の凍結精液を作製するために耐凍能を向上させる方法が研究されてきた。そのなかでRookeら²⁾はn-3系の多価飽和脂肪酸(PUFA)であるC22:6n3(DHA)を豊富に含む魚油を飼料添加することで豚の精子の運動性が向上し、奇形率が低下することを報告している。またLiuら³⁾は大豆油と魚油により飼料中のn-6:n-3の割合を変化させることで精液性状が向上することを報告している。そこで今回の試験では、精子耐凍能の向上を目的とし、n-3系多価不飽和脂肪酸である α リノレン酸(C18:3n3)を豊富に含む亜麻仁油の種雄豚の飼料に添加することで精子の脂肪酸組成を変化させ低温保存後の精子活力の向上を試みた。加えて、精子活力と精子脂肪酸組成との関連について検討した。

飼料中のC18:3n3は亜麻仁油添加により基礎飼料のみの場合より9%上昇し、飼料中のn-6/n-3は減少した。しかし、低温試験、凍結試験において試験区間有意差はみられなかった。よって、亜麻仁油給与による精子耐凍能の向上は認められなかった。なお、凍結融解後の精子性状と低温保存後の精子活力に有意な相関がみられ

たことから、低温保存試験が凍結精液保存試験の指標として有効であると考えられる。

給与区の精子脂肪酸組成においてC22:6n3, n-3PUFA, totalPUFAが対照区より有意に高く、totalSFAが有意に低くなった。しかし、給与前、給与期間中、給与終了後において給与区と対照区の脂肪酸組成の変化量に差はないことから、亜麻仁油給与による精子の脂肪酸組成の変化は認められず、給与区個体の脂肪酸組成に占めるC22:6n3の割合が高いことによってn-3PUFA, totalPUFAが高くなり、totalSFAが低くなったと考えられる。

本試験では精子から亜麻仁油に豊富に含まれるC18:3n3は検出されなかった。Ahluwalia⁷⁾によると豚精液中に含まれるn-3PUFAは牛に比べて少ないとされている。また、Asmatullahら⁸⁾による報告では牛の精液中のn-3PUFAは3.48%であり、その中のC18:3n3は0.43%であるとされている。上記のことを踏まえると、豚の精子に含まれるC18:3n3は検出限界以下のごく微量である可能性が考えられる。

低温保存後精子活力と脂肪酸組成の相関において、飽和脂肪酸であるC14:0, C16:0, C18:0と単価不飽和脂肪酸であるC18:1n9に有意ではないが、負の相関傾向がみられた。n-3系不飽和脂肪酸であるC20:3n3, C20:6n3に有意な正の相関や有意ではないが正の相関傾向がみられた。飽和脂肪酸/不飽和脂肪酸比は負の相関傾向がみられ、n-3PUFA/n-6PUFA比は正の相関傾向がみられた。よって、精子中のn-3PUFAを増加させることが精子活力を高める可能性が示唆された。新居ら⁶⁾の報告においても多価不飽和脂肪酸は融点が低いために、低温でも流動性を保つための細胞膜に適しており、その多価不飽和脂肪酸の一つであるC22:6n3は精子の造精機

能、運動性及び受胎性などに重要な役割を果たしていることが述べられている。

外因性のPUFAにより精子の脂肪酸組成を変化させ、精子性状の向上を図った試験はいくつか報告されており、今回の試験のように効果が認められなかった報告⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾と効果が認められた報告²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾の両方がある。それはまた人¹³⁾¹⁴⁾やウサギ¹⁵⁾¹⁶⁾の分野などでも同じである。したがって、外因性の脂肪酸によって精子の耐凍能を向上させるためには、給与する脂肪酸の量やその種類の検討が必要であり、引き続き研究する必要がある。

なお本研究の一部は、農林水産オープンイノベーション推進事業「豚の遺伝子再生技術の確立」において実施したものであり、研究成果の一部は徳島大学へ委託した試験によるものである。

文 献

- 1) 入谷明, 凍結及び乾燥研究会会誌, 72-77, 1983
- 2) Rooke. J. A., Shao. C-C., Speake. B. K., Journals of Reproduction and Fertility. 315-322. 2001
- 3) Qing L., Yuan F. Z., Run J. D., Hong K. W., Jian. P., Si W. J., Asian journal of Andrology. 223-229. 2017
- 4) Qing L., Yuan F. Z., Run J. D., Hong K. W., Jian. P., Animal Reproduction Science. 11-19. 2015
- 5) Lin Y., Cheng X., Mao J., Wu D., Ren B., Xu SY., Fang ZF., Che LQ., Wu CM., Li J., Lipids in Health and Disease. 15-31. 2016
- 6) 新居雅宏・水野一郎・仁木明人. 徳島県肉畜試験場研究報告25号. 25-33. 1997
- 7) Ahluwalia B., Holman R. T., F. Report. Fert. 431-437. 1969
- 8) Asmatullah K., Haron W., Yusoff R., Nurhusien. Y., Khumran. A. M., Kazhal S., Atique A. B., Ubedullah K., Ebrahimi. M., Animal Reproduction Science. 1-7. 2015
- 9) Vicente Z. Z., Jose L. F. V., Jose L. C. M., Adelfa del C. G. C., Maria T. S. T., Silvia C. D., Jose A. M. A., Veterinaria Mexico OA .vol. 4. 26-40. 2017
- 10) Castellano CA., Audet L., Baily JT., Laforest JP., Matte JJ., Theriogenology. 1482-90. 2010
- 11) Cerolini S., Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi TM., Reproduction. 395-401. 2001
- 12) Andriola YT., Moreira F., Anastcio E., Camelo FA jr., Silva AC., Varella AS jr., Gheller SMM., Goularte KL., Corcini CD., Lucia T jr., Andrologia. 2017
- 13) Safarinejad MR., Safarinejad S., Asian J Androl. 514-515. 2012
- 14) Conquer JA., Martin JB., Tummon I., Watson L., Tekpetey F., Lipids. 149-154 2000
- 15) Gliozzi TM., Zaniboni L., Maldjian A., Luzi F., Maertens L., Cerolini S., Theriogenology. 910-911. 2009
- 16) Mourvaki E., Cardinali R., Dal B. A., Corazzi L., Castellini C., Theriogenology. 620-637. 2010

