تأثير مختلف درجات الإسالة للسائل المنوي المجمد على الصفات الحيوية والكيموحيوية وبعض الانزيمات للسائل المنوي المجمد لثيران الفريزيان –هولشتاين.

عباس حسين غافل **رشا سلمان عبيد**

استاذ مساعد

Mo759090@gmail.com

الكلية التقنية / المسيب – جامعة الفرات الأوسط التقنية – 51009 – بابل / العراق

المستخلص:

اجريت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الانتاج الحيواني /الكلية التقنية /المسيب للمدة من 1/تشرين الاول/2016 لغاية 1/نيسان/2017 لدراسة تأثير درجتي حرارة الاذابة 30 درجة مئوية لمدة 60 ثانيه و50 درجة مئوية لمدة 15 ثانية للسائل المنوي المجمد في قصبات سعة 0.25 مليلتر من 10 ثيران فريزيان هولشتاين بعمر 3–5 سنة المستعملة لجمع السائل المنوي في مركز التلقيح الاصطناعي ابو غريب بغداد على الصفات الحيوية (الاس الهيدروجيني والحركة الفردية والجماعية والتشوهات) والصفات الايضية (البروتين الكلي والكوليسترول الكلي والكلوكوز) والصفات الانزيمية (انزيم الاسبارتيت و انزيم الفوسفاتيز القاعدي) للسائل المنوي المذاب ، اظهرت النتائج تأثير عالي المعنوية (أ≤0.01) لدرجات الإذابة 50 درجة مئوية لمدة 15 ثانية لانزيم الفسفاتيز القاعدي والكلوكوز . وتأثيراً معنوياً (أ≤0.05) لأنزيم الاسبارتيت لدرجة لاذابة 30 درجة مئوية لمدة 60 ثانية .

كلمات مفتاحية : سائل منوي – درجات الإذابة – الأنزيمات – الفريزيان هولشتاين

هذا البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني

Effect of different thawing temperature and duration of frozen seminal plasma on spermatological properties , biochemical and some enzyme of Frisian- Holstein bull.

Abbas H. Ghafil **Rasha S. Obaid**

Assistant Professor

Al-Musaib Technical College - Al-Furat Al-Awsat Technical University

Babil – Iraq

Abstract:

the study was conducted at laboratories of department of animal technical college from 1/ October /2016-1/ April /2017 to investigate the effect of thawing temperature at 30c° for 60 second and 50c° for 15 second from 0.25cc deep frozen thawed straw from main artificial insemination center Abo grabe Friesian Holstein bull aged 3-5years . On the biological properties (pH, Individual motility, Total motility and Morphological defect) and metabolic (total protein ,cholesterol and glucose) and en-

zymatic (Aspartate and alkaline phosphatase) the result show that there is a high significant deference ($p\leq0.01$) at 50c° for 15 second of thawing temperature on the alkaline phosphatase enzyme and glucose,significant deference ($p\leq0.05$) at 30c° for 60 second to aspartate enzyme .
Key words : semen , thawing temperature , Enzyme , Frisian Holstein bull

المقدمة:

يُعد التلقيح الاصطناعي الخطوة الاولى من تقنيات التكاثر للتحسين الوراثي لأبقار الحليب وهناك تأثير لعمليات تجميد السائل المنوي والتي تكون مؤذية للنطف مما يؤدي الى فقدان حوالي نصف عدد النطف اثناء التجميد والاسالة ، كما أن التغير في درجات الحرارة تأثير على تركيب ومكونات النطف وجدران خلية النطفة لان التجميد يؤدي الى تكوين البلورات الثلجية مما يسبب تحطيم جدران خلية النطفة وعليه فان الإسالة تؤثر على حياه النطف بعد التجميد (17) . كما تؤثر الاسالة على الصفات الحيوية والكيموحيوية والوظيفية لخلايا النطف (17) . تعيد الاسالة النطف للحياة والى درجة حرارة الجسم وعليه يجب حماية النطفة اثناء الاسالة ويجب البحث ودراسة درجات الاسالة للحصول على اعلى معدل للنطف الحية بعد الاسالة (3) . إن نجاح التلقيح الاصطناعي يرتكز على نوعية السائل المنوي الطازج او المجمع حديثا وقابليتهُ على التخفيف والحفظ مع اقل فقدان او خسارة في قدرته على التجميد ، افضل تقنية حفظ طويل ثم اسالة بنجاح ليبقى منه حولي50% حي من النطف (27). ان الهدف الرئيسي لعملية الحفظ بالتجميد ليست فقط المحافظة على نسبة الحيوية والحركة ولكن ايضا المحافظة على الايض الضروري لإنتاج الطاقة ، بروتين البلازما الضروري في الجهاز التناسلي الانثوي وقت الاخصاب . انزيمات الكرموسوم تعمل على اختراق جدار البويضة والقابلية على الحركة ومنع اي ضرر قد يؤدي بحياة النطف اثناء الاخصاب (20) . البلازما المنوية تتكون من افرازات من الغدد الجنسية الملحقة بالجهاز التناسلي الذكري والبربخ والتي تتكون من العديد من العناصر العضوية وغير العضوية لها تأثير على نوعية السائل المنوي تمتلك الانزيمات والبروتينات خاصية وقائية ضد تأثير التخفيف لحماية المكونات الداخلية للخلية (10).

ويُعتبر انزيمي الاسبارتيت (AST) والفوسفاتيز القاعدي (ALP) انزيمات ضرورية للعمليات الايضية التي تجهز الطاقة للحيوية والحركة ولذلك لها علاقة في خصوبة السائل المنوي (18) . وبناء على ما تقدم فهدف هذه الدراسة تقيم الصفات الانزيمية (انزيم الاسبارتيت AST وانزيم الفوسفاتيز القاعديALP) والصفات الايضية (البروتين الكلي والكوليسترول الكلي والكلوكوز) والصفات الحيوية (الاس الهيدروجيني والحركة الجماعية والفردية ونسبة التشوهات) وعلاقتها في درجات اسالة مختلفة وبيان مدى تأثير درجات الاسالة عليهما .

المواد وطرائق العمل:

تمت التجربة في مختبر الفسلجة التابع لقسم تقنيات الانتاج الحيواني ،الكلية التقنية– المسيب للفترة من تاريخ 2016/10/1 الى 2017/4/1 ، اذ استخدمت 10 ثيران من سلاله فريزيان هولشتاين بعمر 3–5 سنوات من دائرة الثروة الحيوانية قسم التلقيح الاصطناعي في ابو غريب غرب محافظة بغداد والحيوانات موضوعة في حصارات مفردة شبه مكشوفة ، اذ جلبت 10 قصبات لكل ثور ونقلت من مركز التلقيح الاصطناعي ابو غريب الى مختبر الفسلجة التابع لقسم تقنيات الانتاج الحيواني في الكلية التقنية – المسيب بواسطه حاويات التلقيح الاصطناعي الخاصة والحاوية على نيتروجين سائل لغرض دراسة تأثير الاسالة في درجات حرارة 50مْ لمدة 15 ثانية و30 مْ لمدة 60 ثانية على الصفات الحيوية والايضية والانزيمات وقيست الصفات الحيوية (الاس الهيدروجيني ،الحركة الجماعية ،الحركة الفردية والتشوهات) للعينات قبل مراحل عملية التبريد والتجمد ، أُذيبت القصبات على درجتي حرارة 30 درجة مئوية لمدة 60 ثانية و50 درجة مئوية لمدة 15 ثانية باستعمال حمام مائي وتم ضبط درجة الحرارة باستعمال محرار زئبقي . الاس الهيدروجيني : قيسَ الاس الهيدروجيني باستعمال اوراق كاشفة خاصة .الحركة الجماعية :– قيست الحركة الجماعية للسائل المنوي المجمع حديثا على اساس الحركة الموجية اذ وضعت قطرة من السائل الغير مخفف على شريحة زجاجية دافئة على مسرح حراري بدرجة 37 درجة مئوية وفحصت على العدسة 10x وتدرج الحركة على اساس الامواج المتحركة وكثافتها وتم تحويلها الى نسب مئوية وذلك لتسهيل العمليات الإحصائية (4).الحركة الفردية:– قُدرت الحركة الفردية حيث وضعت قطرة من السائل المنوي الغير مخفف على شريحة زجاجية بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وغطيت بغطاء زجاجي (cover slide) وفحصت الحركة تحت العدسة 40x وقدرت الحركة من 0–100% نسبة الى الحركة الامامية (4) للنطف . التشوهات :– فُحصت التشوهات للنطف وذلك بوضع قطرة من السائل المنوي مع قطره من صبغة الايوسين وقطره من صبغة النكروسين ومزجت على شريحة وتم فحص السرائح المصبغة بالعدسة 40x وتم حساب 200 نطفة وذلك لتغطية اكبر مساحة ممكنة من الشريحة وتم حساب نسبة التشوهات للنطف . الصفات الايضية والانزيمات:– قيس تركيز البروتين الكلي للعينات وذلك حسب عُدة عده تجارية من الشركة الفرنسية (Maizy Kit France) (28) والكوليسترول للعينات وذلك حسب عُدة عده تجارية من الشركة الفرنسية (Maizy Kit France) (25) ، وتركيز الكلوكوز استعملت عُدة تجارية مُناسبة من شركة Agappe (Kit , USA) (24) ، قيس تركيز انزيم الاسبارتيت باستخدام عُدة تجارية من شركة (Randox-Kit UK) (20)، وقيس تركيز الفوسفاتيز القاعدي تم باستعمال عُدة تجارية من شركة Syrbio الاسبانية

وقيس تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP (12) ، وفُحصت حسب الخطوات من قبل الشركة المجهزة في الدليل المرفق لكل فحص ، وقرات العينات باستعمال جهاز المطياف الضوئي .

التحليل الإحصائي

أُستعمل البرنامج الإحصائي (SAS)(21) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة (درجة الحرارة) في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار (9) متعدد المديات .

النتائج والمناقشة

بينت نتائج الجدول (1) تأثير درجه حرارة الإسالة في الصفات الانزيمية والايضية اذ وجد ان هناك تأثير عالي المعنوية ($p\leq0.01$) بالنسبة لدرجات الإسالة 50 درجة مئوية لمدة 15 ثانيه و 30 درجة مئوية لمدة 30 ثانيه لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي والكلوكوز اذ كانت 79.40±3.01وحده دوليه/لتر و59.80±3.62 وحده دوليه /لتر و89.90±2.99 ملغم/ديسيلتر و77.10±2.93 ملغم/ديسيلتر على التوالي وتأثير معنوي بالنسبة لانزيم الاسبارتيت 296.20±7.14 و278.50±5.16 وحده دولية/لتر على التوالي على درجة اذابة 50 درجة مئوية و 30 درجة مئوية اما بالنسبة للبروتين الكلي وتركيز الكوليسترول الكلي فلم يظهر اي تأثير معنوي لمختلف درجات حرارة الاسالة . لا تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (5) اذبين وجود انخفاض معنوي في الكلوكوز وانزيم الفوسفاتيز القاعدي واشار (8) بأن قيمة انزيم الاسبارتيت في ثيران الهوليشتاين هو 1012 وحدة دولية /لتر وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، كما بين (13) بأن تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي للثيران هو 250–730 وحدة دولية /لتر . ولا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (22) اذ تراوح تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي للإنسان بين 20–950 وحده دوليه /لتر وذكر (3) تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي للرجال الطبيعيين في البلازما المنوية هو273.6±29.9 وحدة دولية/لتر وفي النطف هو 68.6± 6.2 وحدة دولية /لتر وهو يتفق مع نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للبلازما المنوية .اشار(7) ان تركيز انزيم الاسبارتيت للثيران بدرجة اذابة 35 درجة مئوية مْ لمده 60 ثانيه هو 11.37±0.65 وحدة دولية/لتر وعلى درجة اذابة 37 درجة مئوية لمده 30 ثانية هو 10.28±0.10 وحدة دولية / لتر على اذبه 70 درجة مئوية لمده 9 ثانيه هي 14.39±0.74 وحدة دولية /لتر وهو لا يتفق مع نتائجنا الحالية ، وذكر(16) ان تركيز انزيم الاسبارتيت للثيران هو345–623 وحدة دولية/لتر وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية اشار(15) بأن تركيز انزيم الاسبارتيت لأغنام العواسي حسب فصول السنة حيث كانت في الصيف 364 وحدة دولية /لتر والخريف 295 وحدة دولية /لتر والشتاء 388 وحدة دولية / لتر وهذا يتفق مع النتائج الدراسة الحالية . بين (8) بأن تركيز الكلوكوز لثيران الهوليشتاين العراقية هو 192.00± 19.78 ملغرام/ديسيلتر وهذا لايتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، لا يتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه(14) لثيران الهوليشتاين حيث كان تركيز الكلوكوز هو 192 ملغرام /ديسيلتر. وبين (27) ان تركيز الكلوكوز للخيول هو 24.31±2.92 ملغرام /ديسلتر وهو لا يتفق مع نتائج

الدراسة الحالية .اشار (8) ان تركيز البروتين الكلي لثيران الهوليشتاين هو16.56±3.43 غم /ديسيلتر وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، وبين(5) ان تركيز البروتين لثيران تتراوح بين 3.7 الى 33.55 غم / ديسلتر ، بينما بين (16) ان تركيز البروتين الكلي للثيران هو 3.8 غم / ديسيلتر ولا يتفق مع نتائجنا ، وبين (19), ان تركيز البروتين الكلي هو 8.22 غم /ديسيلتر ولا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، ذكر (23) ان تركيز البروتين الكلي للخيول هي0.95±0.04 غم/ ديسيلتر، وفي دراسة على السائل المنوي لثيران (Neolory) وعددها 13ثور وجد (24) ان تركيز البروتين تراوح بين1.5–33 ملغرام/ مل وهو يتفق مع نتائج دراستنا الحالية ويعزى السبب الى الاختلافات الوراثية . ولا تتفق نتائج الدراسة الحالية في الكوليسترول مع ما توصل اليه (14) اذ كانت10.0±24.74 ملغرام / ديسيلتر وهي اقل من نتائج الدراسة الحالي هو لا نتفق معه ايضا في نسبه الكلوكوز فهي اكثر من نتائج الدراسة الحالية. وقد اشار(14) ان قله البروتين في السائل المنوي دليل على ردائه السائل المنوي . اشار(14) بأن تركيز الكوليسترول لثيران الهوليشتاين هو 24.75 ملغرام / ديسيلتر وهذا لا يتفق مع الدراسة الحالية ، اوضح (14) الى ان تركيز الكوليسترول لثيران الجاموس بالنسبة لمواسم السنة حيث كانت في الشتاء 24.70 ملغرام/ ديسيلتر والصيف من 101 الى 192 ملغرام/ ديسيلتر لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، بين (16) ان تركيز الكوليسترول للثيران هو 312 ملغرام/ ديسيلتر ، اشار (23) ان تركيز الكوليسترول للثيران هو 28.55 ملغرام/ ديسيلتر و13.18 ملغرام/ ديسيلتر على التوالي ولا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية .

الجدول 1: تأثير درجة حرارة الإسالة في الصفات الانزيمية والايضية لنطف الثيران

درجة الحرارة (مْ)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي				
		تركيز انزيم الاسبارتيت (IU)	تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي(IU)	البروتين الكلي (غم/ديسيلتر)	تركيز الكوليسترول (ملغم/ديسيلتر)	تركيز الكلوكوز (ملغم/ديسيلتر)
30مْ	10	5.16 ± 278.50 b	± 59.80 b 3.62	± 2.45 a 0.11	± 148.40 a 13.55	± 77.10 b 2.93
50مْ	10	7.14 ± 296.20 a	± 79.40 a 3.01	± 2.60 a 0.09	± 163.40 a 7.46	± 89.90 a 2.99
مستوى المعنوية	---	*	**	NS	NS	**

* (P<0.05)، ** (P<0.01)، NS: غير معنوي.

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

اوضحت نتائج الجدول 2 تأثير درجة حرارة الإسالة في الصفات الحيوية المدروسة ان هناك تأثير عالي المعنوية بالنسبة لدرجة الاسالة 50 مْ لمده 15ثانيه و30 مْ لمده 60 ثانيه في جميع الصفات الحيوية المدروسة اذ كانت الحركة الجماعية 56.10±0.03 على درجه اذابه 50 مْ 53.30±0.61 على درجه حراره 30مْ وهي قريبه مما توصل اليه (30) اذ كانت نسبة الحركة الجماعية 56.7±0.4 على درجه اذابه 50 مْ لمده 15 ثانيه و 56.6±0.4 على درجه اذابه 37مْ لمدة 30 ثانية .اما بالنسبة للتشوهات فكانت 11.5±0.4 على درجة 50مْ لمده 15 ثانية و14.4±0.4على درجه اذابه 37مْ لمده 30 ثانيه وهي أكثر من نتائج الدراسة الحالية والتي كانت 12.0± 0.42 على درجه اذابه 50 مْ و11.5±0.42 على درجة اذابة 30 مْ . تتفق نتائج الدراسة الحالية في الحركة الفردية مع ما توصل اليه (3) عند درجة اذابة 37 مْ اذ كانت 65.20±3.2 والذي وجد ان نسبة الحركة الفردية تزداد مع ارتفاع درجات الحرارة ، والحركة الفردية اظهرت افضل حركة عند درجة اذابة 30 درجة مئوية لمدة 60 ثانية حيث كانت50.0± 60.50 ، الاس الهيدروجيني يتراوح بين 6.68±0.03 قبل التجميد و 6.50±0.03 بدرجة اذابة 50 درجة مئوية وبدرجة اذابة 30 درجة مئوية هي 6.57±0.02 اذ ان الاس الهيدروجيني للسائل المنوي يقل مع زيادة الخزن نتيجة للفعاليات الأيضية للطاقة (Hydrolysis of ATP) اما الحركة الجماعية فكانت افضلها على درجة اذابة 50 درجة مئوية لمدة 15ثا حيث كانت56.10±0.62 اي ان الحركة الجماعية تزداد مع زياده درجة حرارة الإسالة ونسبة الحيامن المشوهة كانت قبل التجميد 9.50±0.17 وبعد الإسالة فكانت اكثر نسبة بدرجة اذابة 50 درجة مئوية التشوهات بلغت 12.00±0.42 اقل تشوهات بعد الإسالة هي 11.50±0.42 بدرجة اذابة 30 درجة مئوية . اشار (3) الى ان الحركة الفردية لثيران الهوليشتاين العراقية على درجة اذابة 37 لمدة 30 ثانية كانت 65 وهي قريبة من نتائج الدراسة الحالية ، نتائج الدراسة الحالية تتفق مع (15) الذي اشار الى الحركة الجماعية لنطف اغنام العواسي في درجة اذابة 50 درجة مئوية لمدة 30 ثانية هو 45 ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء به (6) ان الاس الهيدروجيني بلغ 6.88 في الثيران ولا يتفق هذا نتائج الدراسة الحالية معه بالنسبة للحركة حيث بلغت 80.15 والتشوهات ايضا لا تتفق حيث بلغت 4.24 اما الحركة الجماعية بلغت 60 وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية . اشار(4) ان نسبه التشوهات تكون عالية في الشتاء وقليلة في الربيع وان هناك اختلافات معنوية بالخصوبة اما (2) وجد ان هناك نسب عالية في الشتاء وقليلة في الصيف مصدر اختلافات معنوية في النطف الميتة تبغا للمواسم زادت في الصيف وقلت في الشتاء في ثيران الفريزيان ، اشار (11) ان التشوهات لثيران الفريزيان كانت بين 7.31 الى11.53وهي تتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، وبين (1) ان التشوهات تزداد مع زيادة مدة الخزن بالنسبة لثيران الهوليشتاين – فريزيان حيث كانت 22.51 بعد 6 سنوات من الخزن و14.75بعد 3 سنوات من الخزن و 10.63بعد سنة من الخزن، واوضح (17) ان التشوهات لنطف ثيران عند الاسالة 37مْ لمدة 30 ثانيه

كانت14.4 و50 مْ لمدة 15 ثانيه كانت 11.5 و70 مْ لمدة 5 ثانيه كانت 7.5 وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع الباحث على درجة حرارة 50م

جدول 2: تأثير درجة حرارة الاسالة في الصفات الحيوية المدروسة

درجة الحرارة (مْ)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي			
		الاس الهيدروجيني (PH)	نسبة الحركة الفردية (%)	نسبة الحركة الجماعية (%)	نسبة الحيامن المشوهة (%)
قبل التجميد	10	0.03 ± 6.68 a	1.00 ± 51.00 b	0.83 ± 44.40 c	b 0.17 ± 9.50
30مْ	10	0.02 ± 6.57 b	0.50 ± 60.50 a	0.61 ± 53.30 b	0.42 ± 11.50 a
50مْ	10	0.03 ± 6.50 b	0.00 ± 40.00 c	0.62 ± 56.10 a	0.42 ± 12.00 a
مستوى المعنوية	---	**	**	**	**

** (P<0.01).

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

References:

1. **Abdul, M; Muhammad, I; Muhammad; I. Z.(2015)** Effect of Long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability Motility and abnormality of frozen thowed frozen holistein Bull.*Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1):22-25.
2. **AL-Ani; A. A; Ishak; M. A; AL-Rawi; A. A. (2014)** Infiuence of season on some sexualbehavior and semen characteristics in Holstein-Friesian bulls. *Jordanian journal of Agricultural Sciences* . 10,no 3.
3. **Al-Badry , K. I.(2012)** Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of friesian bulls in Iraq. *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 4(6): 384-388.
4. **AL-Haboby, A. H. (1977)** studieson some semen charasteristics of crossbred friesian bulls and the effect of some diluents and dilrtion rates on spermatozoan motility during storage. *Master Thesis / Coliege of Agriculture / University of Baghdad*.
5. **Assumpcao;T. I; Torres, R. A. A; Sousa, J; M.V; Ricart; C. A. O. (2005)** Correlation between fertility and levels of protein,sugar and free amino

asids in seminal plasma of nelore bulls. Arq.*Bras.med vet.zootec.*5 :55-61.

6. **Bharatkumar R. Patel and G. M. Siddiquee.(2013)** Physical and morphological characteristics of Kankrej bull semen.doi:10.5455/vetworld.405-408
7. **Binod, K. D. B, Bharat, C. D; Ranjan, K. B; Prithiviraj,C; Sourabh, D; Sudip, S. and Kutubuddin (2015)** Effect of thawing methods on frozen semen quality of yak (*Poephagus grunniens L*.) bulls Veterinary World, EISSN : 2231-0916. Available at www.veterinaryworld.organize.8/July
8. **Dhia; J. K. and Ali; F. A.(2012)** Physical and biochemical evaluation of semen in holistein bulls with rind vaccine in iraq.epartment of surgery and Obstetrics, Coll. Vet. Med. Baghdad University, Iraq. 1, 2 ISSN 2320–21 .
9. **Duncan; D. B. 1955. Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.**
10. **Foxcroft GR, Dych MK; Ruiz.Sanchez A,Novaks S,Dixon WT,(2008)** Identifying usabie semen .*Theriogenology* 70.1324-1335.
11. **Ghada; A.T; Nabila; I. E; Alaa; E. B; Zeidan, M. T. (2012)** Effect of anthel drugs on biochemical characteristics of bull Friesian frozen semen. Proc. 7th Int. *Con. Biology Sciences*, 204: 302– 232 .
12. **Kind P. R; N; King E. G. J. Clin. (1971)** Path 1954-7-322 Belfild A ,GOLDBERG ,D.M ENZYME 1971-12-561.
13. **Maria; E. P; Pietro; L;Valentina, L; Lucia;B; Giuseppe,V; Luigi; Z; Francesca, C; Bianca; G.(2017)** Influence of γ-glutamyltransferase and alkaline phosphatase activity on in vitro fertilization of bovine frozen/ thawe semen. italian journal of animal science issn: (Print) 1828-051x (Online*) Journal homepage.*
14. **Mesut, C;Purhan; B .T; Umut ;T; Taner; O . (2007)** Comparison of Spermatological Characteristics Oligoasteno zoo spermic Bulls of Two Breed . *Turkish Juornal*, 31(6): 381-387. TUBiTAK .
15. **Mustafa, G. (2006)** Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Rams . *Turk Journal Anim Sciences 30* 95-100. TBUTAK.
16. **Nasrin; S. J; AND Calogero; J.(2012)** Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. Journal of Andrology,Vol.33: 4, July/August .
17. **Nur, Z. I. Dogan, M. K. Soylu and K. AK. (2003)** Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen Revue .*Méd.Vet* . 154:7, 487-**490 .**
18. **Pangawaker. G. R: Sharma, M. (1987)** Phosphatatase and transaminase activity in the seminal plasma of bull in relation to freezabitity of semen . Theriogenology ,20.1393.
19. **Ponraj; P, Suresh; K. S; Kezhavituo, V; Kobu, K; Muthusamy, V; Chandan, R. (2015)** Biochemical profiles in freezable And non freezable

ejaculates of mithun(Bos frontalis) semen. advances in animal. *And Veterinary Sciences*. Page 19.

20. Reitman, S; and Frankel; J. Clin.(1957) Path.28:56.

21. SAS. (2012) Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

22. Suppawiwat,P; Birgitta, E;Catharina, L. F. b.(2004) Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine seme Theriogenology 62. 1498–1517.

23. Thirumala, R. T; Gorakh, M; and Sanjay ,K. R.(2017) Biochemica components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and Poitou jack Veterinary World , EISSN : 2231-0916 *Available at www.veterinaryworld. Org*.

24. Tietz, N. W. (1999) Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed AACC .

25. Tietz, N. W .(2005) Text book of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4rd Ed. Burtis, ashwood ER, bruns D. WB Saunders C.

26. Vijay, P; Rajesh, N; Pawanjit, S;Ambika, S. S; Dilip, K. S; Lokesh, S; and Shilpi , D.(2014) Influence of Season on Biochemical Attributes Bhadawari Buffalo Bull Semen : Effect of Temperature and humidity. *Journal of Animal Research*: 4.(2):201-209.

27. WatsonP. F. (1981) The effect of cold shok on sperm cell mambranes in morris G.J.Ciark A(eds) : Effect of low temperature on bioiogical .*New York,NY.Academime Press.PP* :189-218 .

28. Young, D. (2001) Effect of disease on clinical laboratory tests., *4th Ed. AACC.*