

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

عباس حسين غافل

رشا سلمان عبید

استاذ مساعد

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 ثانية 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 (≥ 0.01) لدرجات الإذابة 50 درجة مئوية لمدة 15 ثانية لانزيم الفسفاتيز القاعدي والكلوكوز . وتأثيراً معنوياً (≥ 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 Hussein Ghafil

Rasha Salman Obaid

Assistant Professor

Al-Musaib Technical College - Al-Furat Al-Awsat Technical University 51009
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 enzymatic (Aspartate and alkaline phosphatase) the result show that there is a high sig-

nificant deference ($p \leq 0.01$) at 50°C for 15 second of thawing temperature on the alkaline phosphatase enzyme and glucose, significant deference ($p \leq 0.05$) at 30°C 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 الاسالة 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 وقابليته على التخفيف والحفظ مع اقل فقدان او خسارة في قدرته على التجميد ، افضل تقنية حفظ طويل ثم اسالة بنجاح ليبقى منه حوالي 50% 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 للحوية والحركة ولذلك لها علاقة في خصوبة السائل المنوي (18) . وبناء على ما تقدم فهذه الدراسة تقيم الصفات الانزيمية (انزيم الاسبارتيت AST وانزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP) 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 الفلسجة التابع لقسم تقنيات الانتاج الحيواني ،الكلية التقنية- المسيب للفترة من تاريخ 2016/10/1 الى 2017/4/1 ، اذ استخدمت 10 ثيران من سلالة 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 الفلسجة 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 50م لمدة 15 ثانية و30 م لمدة 60 ثانية على الصفات الحيوية والايضية والانزيمات وقيست الصفات الحيوية (الاس الهيدروجيني ،الحركة الجماعية ،الحركة الفردية والتشوهات) للعينات قبل مراحل عملية التبريد والتجمد ، أُذيتت القصبات على درجتى 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 : قيس 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 الكروسين ومزجت على شريحة وتم فحص السرائح المصبغة بالعدسة 40x وتم حساب 200 نقطة وذلك لتغطية اكبر مساحة ممكنة من الشريحة وتم حساب نسبة التشوهات للنطف . الصفات الايضية والانزيمات:- قيس تركيز البروتين الكلي للعينات وذلك حسب عُدّة تجارية من الشركة الفرنسية (Maizy Kit France) (28) والكوليسترول للعينات وذلك حسب عُدّة تجارية من الشركة الفرنسية (Maizy Kit France) (25) ، وتركيز الكلوكون استعملت عُدّة تجارية مُناسبة من شركة Agappe (Kit , USA) (24) ، قيس تركيز انزيم الاسبارتيت باستخدام عُدّة تجارية من شركة (Randox-Kit UK) (20)، وقيس تركيز الفوسفاتيز القاعدي تم باستعمال عُدّة 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 درجة حرارة الإسالة في الصفات الانزيمية والايضية اذ وجد ان هناك تأثير عالي المعنوية ($p \leq 0.01$) بالنسبة لدرجات الإسالة 50 درجة مئوية لمدة 15 ثانية و 30 درجة مئوية لمدة 30 ثانية لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي والكلوكوز اذ كانت 3.01 ± 79.40 وحده دوليه/لتر و 3.62 ± 59.80 وحده دوليه /لتر و 2.99 ± 89.90 ملغم/ديسيلتر و 2.93 ± 77.10 ملغم/ديسيلتر على التوالي وتأثير معنوي بالنسبة لانزيم الاسبارتيت 7.14 ± 296.20 و 5.16 ± 278.50 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 و اشار (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 وحدة دولية /لتر وذكر (3) تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي للرجال الطبيعيين في البلازما المنوية هو 29.9 ± 273.6 وحدة دولية/لتر وفي النطف هو 6.2 ± 68.6 وحدة دولية /لتر وهو يتفق مع نتائج الدراسة الحالية بالنسبة للبلازما المنوية .اشار(7) ان تركيز انزيم الاسبارتيت للثيران بدرجة اذابة 35 درجة مئوية م لمدة 60 ثانية هو 0.65 ± 11.37 وحدة دولية/لتر وعلى درجة اذابة 37 درجة مئوية لمدة 30 ثانية هو 0.10 ± 10.28 وحدة دولية / لتر على اذبه 70 درجة مئوية لمدة 9 ثانية هي 0.74 ± 14.39 وحدة دولية /لتر وهو لا يتفق مع نتائجنا الحالية ، وذكر(16) ان تركيز انزيم الاسبارتيت للثيران هو 345-623 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 19.78 ± 192.00 ملغم/ديسيلتر وهذا لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، لا يتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه(14) لثيران الهوليشتاين حيث كان تركيز الكلوكوز هو 192 ملغم /ديسيلتر . وبين (27) ان تركيز الكلوكوز للخيول هو 2.92 ± 24.31 ملغم /ديسيلتر وهو لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية .اشار (8) ان تركيز البروتين الكلي لثيران الهوليشتاين هو 3.43 ± 16.56 غم /ديسيلتر وهذا لا

يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، وبين (5) ان تركيز البروتين لثيران تتراوح بين 3.7 الى 33.55 غم / ديسيلتر ، 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 هي 0.04 ± 0.95 غم / ديسيلتر، وفي دراسة على السائل المنوي لثيران (Neolory) وعددها 13 ثور وجد (24) ان تركيز البروتين تراوح بين 1.5-33 ملغم/ 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 كانت 24.74 ± 10.0 ملغم / ديسيلتر وهي اقل من نتائج الدراسة الحالي هو لا تتفق معه ايضا في نسبة الكلوكوز فهي اكثر من نتائج الدراسة الحالية. وقد اشار (14) ان قله البروتين في السائل المنوي دليل على رداءه السائل المنوي . اشار (14) بأن تركيز الكوليسترول لثيران الهوليشتاين هو 24.75 ملغم / ديسيلتر وهذا لا يتفق مع الدراسة الحالية ، اوضح (14) الى ان تركيز الكوليسترول لثيران الجاموس بالنسبة لمواسم السنة حيث كانت في الشتاء 24.70 ملغم/ ديسيلتر والصيف من 101 الى 192 ملغم/ ديسيلتر لا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، بين (16) ان تركيز الكوليسترول للثيران هو 312 ملغم/ ديسيلتر ، اشار (23) ان تركيز الكوليسترول للثيران هو 28.55 ملغم/ ديسيلتر و 13.18 ملغم/ ديسيلتر على التوالي ولا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية .

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

المتوسط $\pm$ الخطأ القياسي					العدد	درجة الحرارة (م°)
تركيز الكلوكوز (ملغم/ديسيلتر)	تركيز الكوليسترول (ملغم/ديسيلتر)	البروتين الكلي (غم/ديسيلتر)	تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي (IU)	تركيز انزيم الاسبارتيت (IU)		
± 77.10 b 2.93	± 148.40 a 13.55	± 2.45 a 0.11	± 59.80 b 3.62	5.16 ± 278.50 b	10	30م°
± 89.90 a 2.99	± 163.40 a 7.46	± 2.60 a 0.09	± 79.40 a 3.01	7.14 ± 296.20 a	10	50م°
**	NS	NS	**	*	---	مستوى المعنوية
* (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 م لمدة 15 ثانية و 30 م لمدة 60 ثانية في جميع الصفات الحيوية المدروسة اذ كانت الحركة الجماعية 0.03 ± 56.10 على درجة اذابه 50 م 0.61 ± 53.30 على درجه حراره 30 م وهي قريبه مما توصل اليه (30) اذ كانت نسبة الحركة الجماعية 0.4 ± 56.7 على درجة اذابه 50 م لمدة 15 ثانية و 0.4 ± 56.6 على درجة اذابه 37 م لمدة 30 ثانية . اما بالنسبة للتشوهات فكانت 0.4 ± 11.5 على درجة 50 م لمدة 15 ثانية و 0.4 ± 14.4 على درجة اذابه 37 م لمدة 30 ثانية وهي أكثر من نتائج الدراسة الحالية والتي كانت 0.42 ± 12.0 على درجة اذابه 50 م و 0.42 ± 11.5 على درجة اذابه 30 م . تتفق نتائج الدراسة الحالية في الحركة الفردية مع ما توصل اليه (3) عند درجة اذابه 37 م اذ كانت 3.2 ± 65.20 والذي وجد ان نسبة الحركة الفردية تزداد مع ارتفاع درجات الحرارة ، والحركة الفردية اظهرت افضل حركة عند درجة اذابه 30 درجة مئوية لمدة 60 ثانية حيث كانت 60.50 ± 0.50 ، الاس الهيدروجيني يتراوح بين 0.03 ± 6.68 قبل التجميد و 0.03 ± 6.50 بدرجة اذابه 50 درجة مئوية وبدرجة اذابه 30 درجة مئوية هي 0.02 ± 6.57 اذ ان الاس الهيدروجيني للسائل المنوي يقل مع زيادة الخزن نتيجة للفعاليات الأيضية للطاقة (Hydrolysis of ATP) اما الحركة الجماعية فكانت افضلها على درجة اذابه 50 درجة مئوية لمدة 15 ثا حيث كانت 0.62 ± 56.10 اي ان الحركة الجماعية تزداد مع زياده درجة حرارة الإسالة ونسبة الحيامن المشوهة كانت قبل التجميد 0.17 ± 9.50 وبعد الإسالة فكانت اكثر نسبة بدرجة اذابه 50 درجة مئوية التشوهات بلغت 0.42 ± 12.00 اقل تشوهات بعد الإسالة هي 0.42 ± 11.50 بدرجة اذابه 30 درجة مئوية . اشار (3) الى ان الحركة الفردية لثيران الهوليشتاين العراقية على درجة اذابه 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 اذابه 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 نسبة التشوهات تكون عالية في الشتاء وقليلة في الربيع وان هناك اختلافات معنوية بالخصوصية اما (2) وجد ان هناك نسب عالية في الشتاء وقليلة في الصيف مصدر اختلافات معنوية في النطف الميته تبعا للمواسم زادت في الصيف وقلت في الشتاء في ثيران الفريزيان ، اشار (11) ان التشوهات لثيران الفريزيان كانت بين 7.31 الى 11.53 وهي 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 و 14.75 بعد 3 سنوات من الخزن و 10.63 بعد سنة من الخزن، ووضح (17) ان التشوهات لنطف ثيران عند الاسالة 37 م لمدة 30 ثانية

كانت 14.4 و 50 م لمدة 15 ثانيه كانت 11.5 و 70 م 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

المتوسط $\pm$ الخطأ القياسي				العدد	درجة الحرارة (م)
نسبة الحيامن المشوهة (%)	نسبة الحركة الجماعية (%)	نسبة الحركة الفردية (%)	الاس الهيدروجيني (PH)		
b 0.17 $\pm$ 9.50	0.83 $\pm$ 44.40 c	1.00 $\pm$ 51.00 b	0.03 $\pm$ 6.68 a	10	قبل التجميد
0.42 $\pm$ 11.50 a	0.61 $\pm$ 53.30 b	0.50 $\pm$ 60.50 a	0.02 $\pm$ 6.57 b	10	30م
0.42 $\pm$ 12.00 a	0.62 $\pm$ 56.10 a	0.00 $\pm$ 40.00 c	0.03 $\pm$ 6.50 b	10	50م
**	**	**	**	---	مستوى المعنوية
** (P<0.01).					
المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويًا فيما بينها.					

المصادر:

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 thawed frozen holstein Bull.Asian pacific journal of reproduction . 4(1):22-25.
2. AL-Ani ,A.A.,Ishak,M.A.,AL-Rawi,A.A.(2014) Influence of season on some sexualbehavior and semen characteristics in Holstein-Friesian bulls. Jordanian journal of Agricultural Sciences .vol.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 characteristics 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 acids 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.org/Vol.8/July
8. Dhia, J.K. and Ali, F.A. (2012) Physical and biochemical evaluation of semen in holstein bulls with rind vaccine in Iraq. *Department of surgery and Obstetrics, Coll. Vet. Med. Baghdad University, Iraq. Volume 1, Issue 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 usable 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. Biol. Sci.* 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/ thawed 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 . *Turk. J. Vet.* 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 J Vet Anim Sci* 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) Phosphatase and transaminase activity in the seminal plasma of bull in relation to freezability 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. Volume 3 | Issue 1 | 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 semen Theriogenology 62. 1498–1517.
23. Thirumala, R. T., Gorakh, M., and Sanjay, K. R. (2017) Biochemical 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. 4th 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: v.4 n.2:201-209.
27. Watson P. F. (1981) The effect of cold shock on sperm cell membranes in morris G. J. Ciark A (eds) : Effect of low temperature on biological. New York, NY. Academic Press. PP :189-218.
28. Young, D. (2001) Effect of disease on clinical laboratory tests., 4th ed. AACC.