فعالية بعض محاليل التمديد في حفظ السائل المنوي لكباش العواس

رامي خلوف[1] وسليمان سلهب[2] ومحمد ربيع المرستاني[2]

الملَخص

نفذت الدراسة في مخبر التلقيح الصنعي ونقل الأجنة في محطة بحوث إزرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد)، خلال العام 2009، بهدف مقارنة فعالية محاليل التمديد المحلية (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب الخالي الدسم)، مع الـ Andromed® كمحلول قياسي مستورد لحفظ السائل المنوي لكباش العواس لفترات قصيرة أوطويلة الأمد. جمع السائل المنوي من أربعة ذكور بعمر سنتين، وبمتوسط وزن 75± 3 كغ باستخدام المهبل الصنعي مرة أسبوعيا، بمعدل قذفتين/ مرة، مدة 4 أشهر خلال الفصل التناسلي. قيّمت الحركة التقدمية للنطف مجهرياً، واستعملت صبغات خاصة لتمييز النطف الميتة عند كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي. أظهرت النتائج وجود تأثير معنوي (P <0.05) للكبش في حجم القذفة (1.8–2.46 مل)، وتركيز النطف (2.4- 3.8 مليار نطفة/مل)، كما أثّر محلول التمديد بدرجة كبيرة (p <0.01) في الحركة التقدمية للنطف ونسبتها الميتة خلال مراحل مداولة السائل المنوي، وكان معدل البقاء الكلي للنطف الحية في محلول الشاهد (65.1%)، وأقلها في محلول تمديد الحليب (22.3%). أما في محلول السترات فبلغت 51.3%. وبلغت النسبة الكلية للنطف الميتة 41.9، و56.9، و78.9% للشاهد، والسترات، والحليب، على التوالي. واستُنتِج أنه يمكن اعتماد محاليل التمديد المصنعة محلياً في تمديد السائل المنوي لكباش العواس بشكل طازج وممدد، وحفظه لفترات قصيرة (محلول الحليب الخالي الدسم)، وبشكل مجمد، وحفظه لفترات طويلة (السترات مع صفار البيض). ويوصي باستخدام محلول السترات مع صفار البيض والغليسيرول بديلاً عن محلول الأندرومد المستورد خاصة إذا زيد تركيز النطف قبل التجميد بنحو 10-15% في برامج التلقيح الصنعي في الغنم.

الكلمات المفتاحية: حيوية السائل المنوي، محاليل التمديد، السترات مع صفار البيض، الحليب الخالي الدسم، تجميد السائل المنوي، كباش العواس، سورية.

[1] طالب دكتوراة، [2] أستاذ، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Efficiency of some diluents in cryopreservation of Awassi Ram Semen

Khlouf. R[1]. S.A. Salhab[2] and M. R. Al- Merestani[2]

Abstract

This study was carried out at the laboratory of artificial insemination and embryo transfer in Ezra station Belongs to ACSAD during 2009 to estimate the efficiency of local diluents (sodium citrate with egg yolk, EYC and skimmed milk, SM)in comparison to Andromed® as a standard diluent for short and long -term preservation period of semen in Awassi rams. Four rams, two years old with live body weight 75± 3 Kg, were used. Semen was collected by artificial insemination twice/ per day per week for 4 months during the breeding season. Progressive motility and live – dead sperms were evaluated at each step of semen handling. Results showed that there was a significant effect ($p<0.05$) for the ram on ejaculate volume (1.8-2.46 ml) and sperm concentration (2.4-3.8 X 10^9/ml) and more significant effect ($p< 0.01$) for the diluents on studied traits after each step of semen handling. The highest final survival rate of viability (65.1%) was shown in semen diluted with Andromed® compared with 51.3% in EYC and 22.3% in SM and the total rates of dead sperms were 41.9, 56.9. 78.9% in the standard, EYC and in SM, respectively. It was concluded that local diluents can be used for extending and using Awassi semen as a fresh diluted semen for a short time preservation using SM and as a frozen and preserved semen for a long time with EYC in artificial insemination programs and it was suggested that EYC with glycerol can be replaced for Andromed® if sperm concentrate is increased by 10-15% at dilution.

Keywords: Semen viability, Diluents, Skimmed milk, Citrate with egg yolk, Freezing of semen, Awassi rams, Syria.

[1]PhD Student, [2] Prof. Dr. Dep. Ani. Prod. Fac. Agric., Univ. Damascus, Syria.

المقدمة

شهد قطاع الثروة الحيوانية في سورية خلال السنوات الأخيرة تطوراً ملحوظاً، فأصبحت عائداته تشكل ما يزيد عن32% من مجمل الناتج الزراعي. وتعدُّ تربية الغنم المكون الرئيس للثروة الحيوانية، إذ بلغت أعدادها نحو 22 مليون رأس (المجموعة الإحصائية، 2008). كما تشكل أكثر من 80% من الوحدات الحيوانية الكلية في سورية (المرستاني، 2010)، ما يوجب تركيز العمل لتحسينه وإكثاره. ولما كانت غنم العواس السلالة الوحيدة في سورية والأكثر انتشاراً في منطقة غرب آسيا، والقادرة على التكيف في مناطق مختلفة من العالم (طليمات، 1996)، كان تطوير محاليل تمديد محلية مفيداً جداً في حفظ نطاف الكباش المحسنة والمختبرة لمثل هذه السلالة الواعدة، ومساعداً في استخدام تقانة التلقيح الصنعي، والإستفادة منها في نشر العوامل الوراثية لذكور التلقيح الصنعي المختبرة. وعلى الرغم من الصعوبات التي اعترضت استخدام تقانة التلقيح الصنعي في الغنم، يزداد تطبيقها يوماً بعد يوم في العالم، ليصل إلى 2.3 % عام 1999 و3.1% (Colbjørnsen، 2001). وقد أورد زكريا وسلهب (1991) أن بلدان رابطة الدول المستقلة (الاتحاد السوفيتي سابقا) تلقح أكثر من 30 مليون رأس من النعاج سنوياً، ويلقّح في فرنسا وأستراليا سنوياً نحو 350 و400 ألف رأس من النعاج، على التوالي.

استُخدمت السترات المرتبطة بالسكر باعتبارها محلولاً واقياً لتجميد السائل المنوي للكباش (Garde وزملاؤه، 2008). ووُجد أن إضافة سترات الصوديوم لمحاليل التمديد تحافظ على نوعية السائل المنوي بعد الإذابة (Tekin، 1982). كما استُخدمت مستويات مختلفة من صفار البيض في تحضير محاليل التمديد، فقد استُخدم بتركيز 3-6% (Waston وMartin، 1975)، و6% (Graham وزملاؤه، 1987)، و10% (Mary وAbdel-Malak، 1994)، و20% (Tuli وزملاؤه، 1991)، و25- 30% (Abdel-Hakeam وزملاؤه، 1991).

واستخدم الحليب على نطاق واسع لتمديد نطاف الثيران (Salamon وزملاؤه، 1995)، والظباء (Lebouef وزملاؤه، 2003). كما مدد السائل المنوي بالحليب الخالي الدسم، وخزن في درجة 18سْ. واستخدم على نطاق واسع في برنامج التلقيح الصنعي (Colas وزملاؤه، 1980). واعتبر الممدد الرئيس لحفظ السائل المنوي للكباش في درجة حرارة 15 سْ في دول البحر المتوسط (Yániz وزملاؤه، 2005). واستخدم كممدد على مرحلتين من أجل تجميد السائل المنوي بشكل عملي في السويد (Lillo، 1984) والنرويج (Amdal وزملاؤه، 1982؛ Berg،1989; Paulenz وزملاؤه، 2003).

وينطوي استخدام الإضافات المشتقة من أصل حيواني مثل الحليب، أو صفار البيض في تمديد السائل المنوي على مخاطر كثيرة، نظراً لإمكانية حدوث تلوث بكتيري

(Thibier وGuerin، 2000). واستخدم بدلاً من ذلك ممددات خالية من تلك الإضافات مثل الأندروميد (شركة Minitüb الألمانية)، الذي يكون غنياً بالفوسفوليبيدات، وTris، وحمض الستريك، والفركتوز، ومانعات تأكسد، ومواد واقية، وغليسيرول، ومجموعة من المضادات الحيوية، ولايحتوي صفار البيض أو أية مواد حيوانية، ويتفادى أي خطر في نقل العوامل المرضية (Nöthling وزملاؤه، 2007).

ونظراً لصعوبة تأمين محاليل التمديد من خارج القطر، كان لابد من الاعتماد على الذات في إنتاج محاليل تمديد محلية الصنع تفيد في تمديد السائل المنوي للكباش، وزيادة حجمه للمساعدة في نشر تقانة التلقيح الصنعي.

الأهـــداف

إنتاج محاليل تمديد محلية لتمديد السائل المنوي في ذكور العواس، واختبار فعاليتها في حفظ السائل المنوي لفترات قصيرة أو طويلة الأمد مقارنة بمحلول الأندروميد المستورد.

مواد البحث وطرائقه

نُفذ البحث في مخبر التلقيح الصنعي ونقل الأجنة في محطة بحوث إزرع التابعة للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD) عام 2009. جُمع السائل المنوي باستخدام المهبل الصنعي مرة واحدة في الأسبوع، وبمعدل قذفتين من كل كبش وذلك من أربعة طلائق تلقيح صنعي من ذكور العواس بعمر سنتين ومتوسط أوزانها 75 ± 3 كغ، ولمدة 4 أشهر خلال الفصل التناسلي. واستخدمت لتمديد السائل المنوي وحفظه محاليل تمديد محلية الصنع (سترات الصوديوم مع صفار البيض، والحليب الخالي الدسم، بالإضافة إلى 6% غليسيرول) وفق ما أشار إليه سلهب (1987)، أما المحلول الثالث (الأندروميد) فكان مستورداً. قُيّم السائل المنوي من حيث الحركة التقدمية، ونسبة النطف الميتة باستخدام مجهر متغاير الطور، وصبغة الأيوزين-نيغروزين.

حُوِّلَت النسب المئوية إلى أرقام لوغارتمية، ثم حُلِّلَت البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل، باستخدام النموذج الخطي العام General Linear Model (GLM). واستخدم لذلك الغرض برنامج SPSS، وحسبت الفروق المعنوية وأقل فرق معنوي Least Significant Differences (LSD) بين المتوسطات،

النتـــائـــج

نظراً لعدم وجود فرق معنوي في مواصفات السائل المنوي لكباش العواس المستخدمة بين القذفتين عند الجمع، دُمجت القذفتان معاً، واستخدم متوسط القذفتين، ليعبر عن متوسط تلك الصفة لاحقاً في السائل المنوي.

أظهــرت النتائج (الجدول1) أن المتوسط العام لحجم القذفتين معاً لذكور العواس بلــغ 2.13مل، وبلغ متوسط تركيزها 3.1 مليار نطفة/مل، وكان اللون أبيض كريمي. وقد وُجِد تأثير معنوي (P< 0.05) للكبش في حجم القذفة وتركيزها. وليس في الحركــة التقدميــة للنطف، ونسبتها الميتة بعد الجمع مباشرة، إذ بلغ المتوسط العام للنسبة المئويــة للحركــة التقدمية للنطف 81.9%، ولنسبة النطف الميتة 14.8% (الجدول4).

الجدول (1) مواصفات السائل المنوي ($\bar{x}$ ±SD) في كباش العواس.

رقم الكبش	اللون	حجم القذفة /مل	التركيز (مليار/مل)
كبش1	أبيض	0.20 ± 2.06^{ab}	0.21 ± 3.4^{a}
كبش2	أبيض كريمي	0.46 ± 2.46^{a}	0.10 ± 2.9^{b}
كبش3	أبيض كريمي	0.42 ± 1.8^{b}	0.42 ± 2.4^{b}
كبش4	أبيض	0.41 ± 2.22^{ab}	0.99 ± 3.8^{a}
المتوسط العام	-	0.44±2.13	0.95±3.1

تشير الأحرف المتشابهة في العمود الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي (P< 0.05) بين المتوسطات.

وكان لنوعية محاليل التمديد تأثير معنوي (P< 0.01) في الحركة التقدميــة للنطــف (الجدول2)، ونسبتها الميتة (الجدول3) خلال كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي. فقد بلغت نسبة الحركة التقدمية بعد التمديد 76.7 % في محلــول الــشاهد، و74 % فــي محلول السترات، و69.4% في محلول الحليب الخالي الدسم. وبلغت نسبة النطف الميتــة 19.2 %، و24.1 %، و29% في محاليل الشاهد، والسترات ، والحليب الخــالي الدســم، على التوالي (الجدول4). وراوحت متوســطات الحركــة التقدميــة للنطــف بــين 71.7 و58.5%، ونسبة النطف الميتة بين 23.9 و39.8% قبل التجميد، وانخفضت نسبة الحركة التقدمية للنطف لتراوح بين 18.3 و53.3%، وتزايدت نسبة النطف الميتة لتــراوح بــين 41.9 و78.9% بعد مرحلة الإذابة (الجدول 4). ولم يكن للكبش وللتفاعــل بــين الكــبش ومحلول التمديد تأثير معنوي على الصفات المدروسة.

الجدول (2) تحليل التباين لتأثير العوامل المدروسة في الحركة التقدمية للنطف خــلال مراحــل مداولة لسائل المنوي في كباش العواس.

مصدر التباين	درجة الحرية	متوسط المربعات		
		بعد التمديد	قبل التجميد	بعد الإذابة
الكبش	3	45.370	109.088	28.704
محلول التمديد	2	326.042^{**}	7685.347^{**}	1034.375^{**}
التفاعل (كباش×محلول)	6	4.745	1.310	3.912
الخطأ التجريبي	60	13.889	22.875	14.861

** $p < 0.01$

الجدول (3) تحليل التباين لتأثير العوامل المدروسة في نسبة النطف الميتة خلال مراحل مداولة لسائل المنوي في كباش العواس

مصدر التباين	درجة الحرية	متوسط المربعات		
		بعد التمديد	قبل التجميد	بعد الإذابة
الكبش	3	16.926	103.532	30.963
محاول التمديد	2	580.181**	8334.125**	1539.056**
التفاعل (كباش×محلول)	6	3.106	9.366	4.907
الخطأ التجريبي	60	14.489	31.847	15.511

** $p < 0.01$

الجدول (4) الحركة التقدمية للنطف ونسبة النطف الميتة في السائل المنوي الممدد خلال مراحل مداولة السائل المنوي في كباش العواس.

مراحل المداولة	% الحركة التقدمية (n= 32)			% النطف الميتة (n= 32)		
بعد الجمع	81.9			14.8		
	الشاهد	السترات	الحليب	الشاهد	السترات	الحليب
بعد التمديد	76.7±3.5[a]	74.00±4.2[a]	69.4±3.7[b]	19.2±3.6[a]	24.1±3.5[b]	29.00±3.9[c]
قبل التجميد	71.7±3.5[a]	64.8±3.5[b]	58.5±4.5[c]	23.9±4.00[a]	33.44±4.1[b]	39.8±3.6[c]
بعد الإذابة	53.3±5.5[a]	42.00±4.8[b]	18.3±4.6[c]	41.9±5.5[a]	56.9±6.1[b]	78.9±5.7[c]

تشير الأحرف المتشابهة في السطر الواحد في الصفة المدروسة إلى عدم وجود فرق معنوي ($p < 0.05$) بين المتوسطات.

الجدول (5) معدل بقاء النطف خلال مراحل مداولة السائل المنوي في كباش العواس.

مراحل المداولة	% الحركة التقدمية (n= 32)		
	الشاهد	السترات	الحليب
حتى التمديد	93.6[a]	90.4[a]	84.7[b]
حتى التجميد	87.5[a]	79.1[b]	71.4[c]
من التجميد حتى الإذابة	74.3[a]	64.8[b]	31.2[c]
الكلي	65.1[a]	51.3[b]	22.3[c]

تشير الأحرف المتشابهة في السطر الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي ($p < 0.005$) بين المتوسطات.

المناقشة

أظهرت النتائج (الجدول1) أن مواصفات السائل المنوي المظهرية لكباش العــواس لا تختلف عن غيرها من العروق الأخرى في حجم القذفة والتركيز، واللون، ومدى تباينها بين الكباش. ولم يوجد تباين معنوي في الحركة التقدمية للنطف، ونسبتها الميتة عند الجمع بين الكباش المستخدمة، وهذا يعزى إلى ظروف الرعاية نفسها، وأعمارهــا، وأوزانهــا المتقاربة، وكونها جميعاً منتخبة وراثياً لتكون طلائق تلقيح في برنامج التلقيح الصنعي.

كما بينت النتائج (الجدول2) وجود تأثير معنوي (P< 0.01) لمحلول التمديد في قدرته على حفظ الحركة التقدمية للنطف خلال كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي، وكان المحلول الشاهد هو الأفضل في المحافظة على حياة النطف، إذ بلغ معدل بقاء النطف 93.6 %، و87.5 %، و74.3.1 % بعد مراحل التمديد، والتبريد، والتجميد، على التوالي (الجدول5)، مقارنة مع 90.4 %، و79.1%، و64.8% في السترات، و84.7 %، و71.4 %، و31.2% في الحليب على التوالي (الجدول5). وهذا يشير إلى أفضلية محلول الشاهد المستورد على المحاليل المحلية الصنع في حفظ النطف لفترات طويلة الأمد، وهذا يتفق مع yutaka وزملائه (2008) الذين وجدوا أن استخدام محاليل تمديد تحتوي مشتقات غير حيوانية تؤدي إلى زيادة في حركة النطف مقارنة مع محاليل التمديد التي تحتوي مشتقات حيوانية، ومع Kenney وزملاؤه (1983) الذين أكدوا أن معدل الحركة التقدمية للنطف بعد تمديد السائل المنوي يختلف حسب نوع محلول التمديد. كما يتضح من النتائج (الجدول5) أن نحو51.3 % من النطف احتفظت بحركتها خلال عمليتي التجميد والإذابة عند استخدام السترات بوصفه محلول تمديد محلي، في حين قاومت نسبة 22.3% فقط من تلك النطف عمليتي التجميد والإذابة عندما استخدم الحليب محلولَ تمديد، وهذا يتوافق مع Al-Juburi (1987) وTekin (1982) اللذان أكدا تفوق السترات على الحليب في حفظ النطف والحصول على معدلات حيوية أعلى. ما يؤكد صلاحية استخدام السترات كمحلول محلي في حفظ النطف لفترة طويلة الأمد في سورية، واستخدام الحليب لحفظ السائل المنوي بشكل طازج. وهذا يتوافق مع ما اقترحه Paulenz وزملاؤه (2003) الذين أوصوا باستخدام الحليب كمحلول تمديد عند استخدام السائل المنوي بصورة طازجة في برامج التلقيح الصنعي في النرويج. وقد يعود تفوق محلول السترات الحاوي على الحليب في هذه الدراسة إلى ما أشار إليه Chehadeh (2000) و Das وRajkonwar (a وb، 1995)، وهو أن صفار البيض يحافظ على سلامة أغلفة النطف.

كما أوضحت النتائج (الجدول 3) وجود فرق معنوي (P< 0.01) بخصوص النطف الميتة بين المحاليل الثلاثة خلال كل مرحلة من مراحل مداولة السائل المنوي، فقد بلغت بالمتوسط بعد التمديد نسب 19.2%، و24.1 %، و29% للشاهد، والسترات، والحليب الخالي الدسم على التوالي (الجدول4)، وقد أكدMarques وزملاؤه (2006) أن تركيب محلول التمديد له تأثير على حياة النطف، كما أكد (Banu وزملاؤه، 1988) أن حركة النطف ونسبتها الحية في السائل المنوي الممدد بصفار البيض مع سترات الصوديوم أفضل مقارنة مع الحليب الخالي الدسم واستطاع محلول الشاهد، ومن ثم السترات الإقلال من نسبة النطف الميتة مع تقدم مراحل مداولة السائل المنوي بصورة أكبر من محلول الحليب (P< 0.05). وهذا يتعارض مع نتائج Das وزملائه (1985) الذين وجدوا أن محلول الحليب يحافظ على حركة النطف ونسبتها الحية عند الدرجة 5 °س بشكل أفضل

مقارنة مع محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض. ويوضح الجدول (3) وجود فرق معنوي (P <0.01) بالنسبة للنطف الميتة بين المحاليل الثلاثة بعد الإذابة، فقد بلغت بالمتوسط 41.9%، 56.9 %، و78.9% للشاهد، والسترات، والحليب على التوالي، ويلاحظ أن محلول السترات حافظ على حياة النطف بعد الإذابة بشكل أفضل مقارنة مع محلول الحليب (Tekin، 1982)، أما محلول الشاهد فيشكل بديلاً أكثر نفعاً مقارنة مع ممددات الحليب، والسترات، من أجل مداولة السائل المنوي لذكور العواس (Gil وزملاؤه، 2003).

واستنتج أنه يمكن تمديد السائل المنوي وحفظه عند الدرجة 5 °س لذكور العواس بكفاءة مقبولة بالنسبة لمحلول الحليب الخالي الدسم، وتزداد الكفاءة في محلول سترات الصوديوم مع صفار البيض، وتكون أعلى نسبياً في المحلول القياسي. كما وجد أن المحلول القياسي كان الأفضل في حفظ النطف بالتجميد يليه محلول السترات، ثم محلول الحليب الخالي الدسم. ويوصى باستعمال محلول السترات مع صفار البيض والغليسرول بوصفه محلولاً محلياً لحفظ السائل المنوي لكباش العواس لفترات طويلة الأمد، بديلاً عن الأندروميد المستورد بالعملة الصعبة إذا زيد تركيز النطف في قشة التلقيح قبل التجميد بنحو 10- 15%.

References المراجع

زكريا، عبد الحميد و سليمان سلهب.1991. فيزيولوجيا التناسل والتلقيح، جامعة دمشق.

طليمات، فرحان. 1996. موسوعة عروق الغنم في الدول العربية. أكساد/ث ح /ن 155/.

المجموعة الإحصائية. 2008. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي- دمشق- سورية.

المرستاني، محمد ربيع. 2010. دراسة حالة الأمن الغذائي في الجمهورية العربية السورية. المركز الدولي للسياسات الزراعية – وزارة الزراعة. سورية.

Amdal, J., K. E. Johansen and T. Grafter. 1982. Artificial insemination of ewes using frozen semen. Proc. 14th Nord. Vet. Cong., Copenhagen; 349-350.

Abdel- Hakeam, A. A., E. F. Graham, I. A. Vazquez and K. M. Chaloner. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. Cryobiology; 28: 43- 49.

Al- Juburi, S. A. 1987. Studies on preservation of ram semen by freezing and other methods. Ph. D. Faculty of agric. Zagazig univ.

Banu, L. A., S. S. Hussain and R. Amin. 1988. The effect of goat milk as buck semen diluter compared with egg yolk- Citrate and powdered milk. Bangladesh. J. Anim. Sci., 17: 7(A. B. A., 58, 4440).

Berg, K. A. 1989. Künstliche besamung (KB) mit gefriersperma beim schaf- Insemination spunkt und ein- Oder Zweimalige Besamung. Tieriirztl. Umsch., 44: 322-325.

Chehadeh, R. 2000. Studies on preservation of male goat semen. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo Univ.

Colas, G., M. Tryer, Y. Guerin and D. Aguer. 1980. Fertilizing ability of ram sperm stored in aliquid state during 24 hours. Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and A.I. Madrid, III; 315.

Colbjørnsen, E.I. 2002. Seminstatistikk sau 2001 (AI- Statistics 2001 in ewes). Sau Geit; 3: 5- 44.

Das, K. K. and C. K. Rajkonwar. 1995a. Effect on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. Inter. J. Anim. Sci; 10: 127. (A. B. C., vol.63, No. 6528).

Das, K. K. and C. K. Rajkonwar. 1995b. Effect of glycerol and equilibrium time on the post thaw motility of spermatozoa of buck in maltose egg yolk glycerol extender. Ind. J. Anim. Repord; 16: 57- 63.

Das, A., B. N., Kakati, C. K. Rajkonwar and B. N. Borgohain. 1985. Survival of buck spermatozoa in egg yolk citrate, milk and Tris diluters at 4 c. Ind. J. Anim. Sci., 55: 670.

Garde. J. J., A. del Olmo, A.J. Soler, G. Espeso, M. Gomendio and E.R.S. Roldan. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's Gazelle (Gazella cuvieri). Animal Reproduction Science; 108(3-4): 384- 401.

Gil. J., L. Nils., S. Lennart., and R. M. Heriberto. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post- Thaw sperm parametrs in ram semen. Theriogenology; 59: 1241- 1255.

Graham, E. F., B.G. Carbo, and M. M., Pace. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci; 47 (Suppl.2): 80.

Kenney, R., J. Hurtgen., Ri. Pierson., D. Witherspoon and J. Simons. 1983. Manul for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion.

Lebouef, B., Ph. Guillouet, F. Batellier, D. Bernelas, J. L. Bonn´e,Y. Forgerit, G. Renaud and M. Magistrini. 2003. Effect of phosphocaseinate on the in *vitro* preservation of fresh semen. Theriogeno., 60: 867– 877.

Lillo, A. 1984. Lambing rates after single inseminations of ewes with liquid or deep- Frozen semen. Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., 10- 14 June, Illinois, . 3: Abstr. No. 373.

Marques, C. C., J. P. Barbas., M. C. Baptista., C. Serra., M. I. Vasques., R. M. Pereira., S. C. Gonçalves and A. E. M. Horta. 2006. Reproduction in the ovine saloia breed: Seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in *vivo* and in *vitro* fertility. In: Animal products from mediterranean area. EAAP Pub, 119: 331– 336.

Mary, G. and Abdel- Malak. 1994. Relationship between hormonal and fertility parameters in rams. Thesis, Ph. D., Fac. Vet. Med., Cairo Univ.

Nöthling, J. O., D. Gerber., B. Colenbrander., D. Maaike ., B. Tynke., and K. Decramer. 2007. The Effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in biladyl with equex STM paste or Andromed®. Theriogeno., 67: 264- 275.

Paulenz, H., S. Lennart., A. Tormod., H. F Ove and A. B. Kjell . 2003. Effect of milk- and TRIS- Based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. Theriogenol., 60: 759-766.

Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim. Repord. Sci., 37: 185- 249.

Salhab. S. A. 1987. Environmental Factors effecting survival of bovine spermatozoa. Ph. D. Thesis. University of Missouni- Colombia- USA.

Tekin, N. 1982. Insemination of sheep with frozen semen: Effect of different diluents on motility, acrosome integrity and sephadex-Filtration of spermatozoa processed in mini- Straws. Ph. D. Thesis. Tierarztliche Hochschule Hannover.

Thibier, M. and B. Guerin. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci., 62: 233- 251.

Tuli, R. K., R. Schmidt- Baullain and W. Holtz. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from boer goats. Anim. Repord. Sci., 25*:* 125-131.

Waston. P. F. and I. C. A. Martin. 1975. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. J. Biol .Sci., 28*:* 153-159.

Yániz, J., J. I. Martí., M. A. Silvestre., J. Folch., P. Santolaria., J. L. Alabart and F. López- Gatius. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 °C on their survival and penetrating capacity. Theriogenol., 64:1844- 1851.

Yutaka. F., K. Hirohide., T. Tetsuro., H. Mami, and O. Kentaro. 2008. Fertility after insemination using asoybean- Based semen extender in sheep. J. Repro.Develop., 54(4): 286- 289.

Received	**2013/07/01**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/08/20**	**قبول البحث للنشر**