



تجميد النطف البربخية لذكور الجمال العراقية باستخدام العسل النقي العراقي كمادة حافظة للنطف

علي عبد الله السعدون/ كلية الزراعة/ جامعة المثنى*
محمد باقر محمد فخر الدين/ كلية الطب /جامعة جابر ابن حيان الطبية
حيدر محمد الجبور/ كلية الزراعة/ جامعة المثنى

معلومات البحث	المستخلص
تاريخ استلام البحث 2016/1/23 تاريخ قبول البحث 16/4/2017	اجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم الثروة الحيوانية- كلية الزراعة /جامعة المثنى للفترة من 17 /2 /2016 ولغاية 14 /9 /2016 بهدف معرفة إمكانية تجميد النطف البربخية للجمال العراقية، وتأثير إضافة العسل الى محاليل التجميد . جمعت الخصى من المجزرة بعد ذبح الحيوان مباشرة ونقلت بدرجة حرارة مناسبة الى المختبر وقطع ذيل البربخ الى قطع صغيرة واضيف الوسط الزراعي SMART Medium تم تحضيره مسبقا لاستخلاص النطف . وتم تقسيم عينة النطف البربخية على معاملات التجربة الأربعة وكما يلي معاملات المعاملة الاولى قبل التجميد (السيطرة) والمعاملة الثانية محلول التجميد فقط والمعاملة الثالثة محلول التجميد يحتوي على عسل طبيعي 5% و المعاملة الرابعة محلول التجميد يحتوي على عسل 10% وتم التقييم المجهرى للعينات قبل التجميد وبعد الاذابة اذ بينت نتائج التجربة وجود ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الرابعة (10%) على المعاملتين الثانية والثالثة بالنسبة لصفات الحركة الفردية والحركة الجماعية والتكتل وشكل النطف الطبيعية وحيوية النطف فكانت النتائج للحركة الفردية (A,B,C) 0.76 ± 12.66 ، 0.86 ± 16.04 ، 0.48 ± 16.83 على التوالي وكانت للحيوية وشكل النطف الطبيعية والحركة الجماعية 58.00 ± 2.00 ، 73.66 ± 0.42 ، 46.50 ± 0.42 على التوالي .
Keywords Technicalworks preservative materials Cryopreservation sperm epididymis	

Cryopreservation sperm epididymis Iraqi camels using pure honey bee Iraqi as a preservative

Ali Abdullah. al Saadon, Agric College, Al-Muthanna Univ.*
Muhammad Baqir Fakhridin, Medical University of Jabir Ibn Hayyan
Haider Muhammad Al-Jubouri, Agric College, Al-Muthanna Univ.

Abstract

This study was conducted at the laboratory of graduate studies, department of animal production / College of agriculture, University of Al-Muthanna for the period from 17/2 until 14/9/ 2016 to investigate the ability of cryopreservation of epididymis sperms for Iraqi camels and the effect of adding of honey bee (HB) to the cryopreservation solution. The testes were collected from the abattoir directly after slaughtering of animals and transferred to the laboratory in Proper temperature. the sperms were collected from the cauda of epididymis and immersed in culture medium previously prepared .the experiment was divided in to four treatments, the first before cryopreservation (control), the second cryopreservation solution only, the third cryopreservation solution with 5% honey bee concentration, the fourth cryopreservation solution with 10% honey bee .The results of the study showed significant superiority ($P \leq 0.05$) for four treatment (10%) on the second and third treatments in the individual motility, mass motility , agglutination, sperm morphology and viability. The individual motility types A,B,C were 12.66 ± 0.76 , 16.04 ± 0.86 and 16.83 ± 0.48 respectively, and for mass motility, agglutination, sperm morphology and viability were 58.00 ± 2.00 , 73.66 ± 0.42 , 46.50 ± 0.42 respectively .

*Corresponding author :E-mail alinahaa@yahoo.com

استغلال موارده المحدودة (1993, Fernandez-Baca) وتواجه الإبل في الوطن العربي معوقات وصعوبات من أهمها انخفاض تكاثره و زيادة نفوق المواليد والإصابة بالأمراض والطفيليات ويمكن التغلب على بعض المشاكل التي تعيق من انتاجية الإبل باستخدام تقنية التلقيح الاصطناعي وتجميد السائل المنوي (Chen و زملاؤه ، 1990 ، Cooper و زملاؤه ، 1990)، ولتطبيق تلك التقنيات تم دراسة صفات السائل المنوي وإمكانية تطبيق تقنية تجميده ودراسة الصفات الاعتيادية للسائل المنوي (Jeyendran

المقدمة

تتميز الإبل عن غيرها من الحيوانات الحقلية الأخرى بعدة مميزات أهمها مقدرتها على العيش في ظروف بيئية قاسية ولها المقدرة على تناول غذائها من الشجيرات والنباتات الملحية والشوكية وعلى الرغم من الأهمية البالغة للإبل ، لكنها عانت من الإهمال وعدم الاهتمام لفترة طويلة لو قورنت مع بقية حيوانات المزرعة، لكن في السنوات الأخيرة بدأ بعض الباحثين بالاهتمام بالإبل لما له أهمية اقتصادية كحيوان يعيش وينتج تحت ظروف قاسية وله القدرة على

وزملاؤه 1984 ؛ pace و craham ، 1970) و تبلغ ذكور الابل جنسيا في عمر 3 سنوات وتتضج بعمر 4-6 سنوات ، و قمة النشاط الجنسي تكون بعمر 7 سنوات وتستمر القدرة على التناسل حتى عمر 22 سنة (Homedia وزملاؤها، 1988) .

اما العسل النقي فيعد من احد الأغذية المهمة التي ذكرها الله تعالى بفوائدها للبشر وخصص سوره كامله باسم النحل الذي سخره الله تعالى بلون من الوان الوحي اذ يقوم برحلته لجمع الرحيق وانتاج العسل بألوانه المختلفه ليكون فيه شفاء للناس وذكر العسل في القران **أَوْ حَىٰ بِالْكَلْبِ إِلَى النَّحْلِ أَنْ اتَّخَذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْتَمِدُونَ مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُرُوجًا مِّنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ ۗ**

(سورة النحل : 68 : 69)، ويمكن تعريف العسل بانه عبارة عن مادة حلوة يكونه النحل من رحيق الازهار ونحل العسل و جنس (ايبس) هو من الانواع الأكثر شيوعا وهناك انواع عديدة من العسل وتختلف النكهات والألوان استنادا الى رحيق الازهار (Aparna و Rajalakshmi، 1999؛ Vaughn و Bryant، 2001) ويتكون العسل من خليط من الكربوهيدرات والبروتينات والأنظمة وكميات قليلة من المعادن والمواد الطيارة وكذلك يحتوي على مواد مضادة للبكتريا والفيروسات وللأكسدة وكذلك يحتوي على احماض امينية ودهنيه (Mato وزملاؤه ، 2003).

لذ تهدف الدراسة الحالية الى :

امكانية تجميد النطف البربخية للجمال العراقية المنبوحه في المجزرة.

استخدام العسل العراقي النقي كمادة حافظة للنطف البربخية .

مواد وطرائق العمل

اجريت هذه الدراسة للفترة من 2016/2/17 ولغاية 2016 /9/14 في مختبر الدراسات العليا التابع لقسم الثروة الحيوانية كلية الزراعة جامعة المثنى باستخدام خصى تسعة عشر من ذكور الإبل العراقية تبلغ من العمر (5-8) سنة وحصل عليها من مجزرة محافظتي(الساوا والديوانية) وجمعت الخصى منها بعد ذبح الحيوانات مباشرة ثم بعد ذلك تم فحص النطف البربخية. ولمعرفة تأثير تجميد نطف البربخ باستخدام عسل النحل قسمت التجربة على اربعة معاملات.

المعاملة الاولى : قبل التجميد (السيطرة)

المعاملة الثانية: من دون إضافة عسل النحل

المعاملة الثالثة: إضافة عسل النحل 5%

المعاملة الرابعة : إضافة عسل النحل 10%

واخذت الفحوصات قبل وبعد التجميد للصفات المدروسة جميعها

جمع الخصى ونقلها

ذبحت الإبل (2-4) صباحا ثم تم الحصول على العينات وقطعت بشكل كامل من دون أي اضرار ثم بعد ذلك نقلت بحافضة اعد بشكل خاص بدرجة حرارة مناسبة ونقلت الى المختبر بأسرع ما يمكن للحصول على افضل النتائج .

جمع النطف من البربخ

بعد ان حضرت العينات الى المختبر ووضعت في درجة حراره الغرفة بعد ذلك فصل البربخ عن جسم الخصية مع الحرص على عدم حدوث أضرار اثناء استخراج البربخ بعدها تم التخلص من الاوردة والشرايين من على جسم البربخ بعد ذلك تم تقطيع ذيل البربخ الى قطع صغيره جدا ثم وضع محلول محضر (SMORT Medium) مسبقا للحصول على النطف البربخ ومزجت جيدا ثم تم استخلاص المحلول الحاوي على النطف وجرى لها فحص اولي تحت المجهر بقوة تكبي X100 .

محاليل التجميد

أستخدم محلول التجميد الحاوي على 15% جلسرين و موانع تجميد(cryoprotectan*) وعلى البومين المصل البشري لحماية الحيوانات المنوية من التلف واجريت هذه الدراسة بإضافة عسل النحل الى محلول التجميد (FertiPro N.V Industrie Park Noord 32, and 8730 Beernem, Belgium) وقسمت التجربة الاولى الى اربع معاملات وكما يلي :المعاملة الاولى قبل التجميد (السيطرة) و المعاملة الثانية بدون عسل نحل ،المعاملة الثالثة عسل نحل 5% اما المعاملة الرابعة عسل النحل 10% و تم خلط العسل مع محلول التجميد بالتراكيز المذكورة اعلاه.

* محلول التجميد بلجيكي الصنع

حيوية النطف

قيست حيوية الحيوانات المنوية باستخدام صبغة الأيوسين و مزجت قطرة من محلول النطف البربخ مع قطرة من محلول صبغة الأيوسين وتركت لمدة دقيقتين في الحاضنة ثم بعد ذلك قيست الحيوية بالاعتماد على نفوذ أو عدم نفوذ صبغة الأيوسين وقيست تحت المجهر بقوة تكبير X 400 (Fakhrildin، 2014).

حركة ونشاط النطف البربخية

قيست حركة الحيوانات المنوية تحت المجهر بقوة تكبير X400 اذ وضعت قطرة من النطف البربخ وبعد دقيقة تم العد في درجة حرارة 30-35 مئوية وفحص الحقل المجهرى بكل منتظم على فق(WHO،2010) وصنفت حركة الحيوانات المنوية اعتمادا على طريقة Fakhridin (2014) الى 4 اصناف A حركة تقدمية عالية، B حركة دائرية فقط، C و حركة دائرة محورية أو حركة الذيل فقط و D غير متحرك .

شكلياء النطف الخارجي

أجري فحص تشكل للحيوانات المنوية مع قياس الحيوية معا باستخدام شرائح بقوة تكبير 400 وتم حساب نسبة الحيوانات المنوية الطبيعية ونسبة الحيوانات المنوية غير الطبيعية حسب طريقة (WHO، 2010) .

تكتل النطف

تم حساب تكتل (تراص) النطف البربخية مثل التصاق الرأس مع الرأس او الذيل مع الرأس وهناك حيوانات غير قادرة على الحركة ملصقة مع بعضها البعض حسب طريقة (WHO،2010) وتم قياسها بنفس شرائح قياس فعالية الحركة .

التحليل الاحصائي

استخدم التصميم العشوائي التام في تحليل البيانات الاحصائية وحسب النموذج العلمي الاتي : $Y_{ij} = M + T_i + e_{ij}$:

Y_{ij} يمثل الصفة المدروسة

M: المتوسط العام للتجربة

T_i : يمثل المعاملات ($i=1,2,3$)

e_{ij} : الخطأ العشوائي

واستخدم في تحليل البيانات البرنامج الاحصائي SPSS نسخة 14 ولدراسة معنوية الفروقات استخدم اختبار دنكن متعدد الحدود (Duncan 1955).

الأحرف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) بين المعاملات. H.B% : تمثل النسبة المئوية لتركيز عسل النحل.

ومن جدول (2) نلاحظ ان تكتل نطف البربخ لم تحصل بين المعاملة الاولى والثانية والثالثة زيادة معنوية وكذلك لم بين المعاملتين الثالثة والرابعة في حين نلاحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى والثانية مقارنة مع المعاملة الرابعة اما دراسة الحركة الجماعية للنطف اذ تبين من جدول رقم(2) حصول

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج دراسة الحركة التقدمية (A وB) والحركة غير التقدمية (C) والنطف عديمة الحركة (D) اذ حصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى (قبل التجميد) مقارنة مع المعاملات الثانية والثالثة والرابعة بالنسبة للحركة التقدمية A وB والحركة غير التقدمية C اما النطف عديمة الحركة D اذ حصل لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثانية على المعاملات الاولى والثالثة والرابعة ويعزى سبب ذلك الى ان التجميد يسبب اجهادا كبيرا للنطف ويسبب تدهورا في نوعية السائل المنوي (Andrabi،2007؛ Mahfouz،2010) وفي صفات النطف الاعتيادية ايضا (Watson ، 2000 ، Andrabi،2007؛ Lemma،2011) بالإضافة الى ان التجميد يسبب صدمة البرودة وتغيرات في جهد الضغط التناظري وجهد التأكسد (sikka، 2001 ؛ Watson، 2000) في حين نلاحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملتين الثالثة والرابعة مقارنة مع المعاملة الثانية و لم تظهر زيادة معنوية بين المعاملة الرابعة والمعاملة الثالثة بالنسبة للحركة التقدمية A وB اما الحركة غير التقدمية C نلاحظ أيضا عدم وجود زيادة معنوية بين المعاملة الثانية والثالثة والرابعة . اما النطف عديمة الحركة D اذ نلاحظ حصول زيادة معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثانية على المعاملتين الثالثة والرابعة ولم تظهر زيادة معنوية بين المعاملة الرابعة والثالثة ويعزى سبب هذه التغيرات الى ان للعسل الطبيعي أثر مهم لاحتوائه على مواد حافظه غير نافذة مثل السكريات الاحادية ويكون عملها بين الخلايا وهي مهمة في الحفاظ على الضغط الأزموزي للنطف وتوفر الحماية في اثناء عملية التجميد وتقليل الاضرار الناجمة من التجميد (Manafi،2011؛ Muldrew؛ 2004 Fuller، 2004) . والنتائج موضحة في جدول رقم (1) .

ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى (قبل التجميد) مقارنة مع جميع المعاملات وكذلك حصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملتين الثالثة والرابعة على المعاملة الثانية ومن الدراسة اتضح أيضا ان النسبة الكلية للنطف عديمة الحركة حصل لها ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الثاني على جميع المعاملات وحصول ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملتين الثالثة والرابعة على المعاملة الاولى كما في جدول رقم(2) ويرجع السبب الى ان العسل يحتوي

(2007؛ Said وزملاؤه، 2010).

ومن خلال الدراسة لحيوية نطف البربخ تبين حصول ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى مقارنة مع المعاملات الثانية والثالثة والرابعة في حين لم نلاحظ وجود زيادة معنوية بين المعاملتين الثالثة والرابعة لكن حصل ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملتين الثالثة والرابعة على المعاملة الثانية ويرجع سبب ذلك الى ان التجميد يسبب اضرارا دقيقة للنطف وتغيرات كيميائية ووظيفية تؤدي الى تحطم الغشاء البلازمي والاكرووسوم للنطف مما يؤدي الى فقد في حيوية النطف (Leboeuf وزملائه ، 2000) ، ومن الاسباب ايضا ان نطف الثدييات حساسة جدا اتجاه انخفاض الحرارة ولاسيما جزء الغشاء البلازمي للنطف إذ أن التجميد يؤدي الى تغيرات في الغشاء البلازمي وتغير في فعالية البروتينات الموجودة في الغشاء البلازمي للنطف ومن ثم تتغير نفاذية الغشاء للماء والمواد المذابة و هذه التغيرات جميعها تؤدي الى اضطراب في دخول المواد المهمة لإدامة حياة النطف وخروج النواتج الايضية الى الخارج مما يؤدي الى تدهور في حيوية النطف (Bailey وزملاؤه، 2003).

على مواد مانعة للتأكسد مثل chrysin, pinocembrin pinobanksin, vitamin C, catalase, التي تعمل على المحافظة على حيوية النطف بعد الاذابة ومنع عمليات التأكسد التي تحدث في اغشية النطف وبالتالي تحافظ على اكبر عدد ممكن من النطف الحية (Moskwa وزملاؤه، 2014 ؛ Bogdanov وزملاؤه، 2008؛ Fakhridin وزملاؤه، 2014) كما يحتوي على انواع مختلفة من المواد الكيميائية عالية الفينول والفلافونويد الذي يساهم في النشاط العالي ضد الاكسدة (Moskwa وزملاؤه، 2014) ويحتوي العسل أيضا على سكريات احادية التي تعتبر من مصادر الطاقة المهمة للحيوانات المنوية (Fuller، 2004) اما من خلال دراسة الشكل الطبيعي للنطف اذ نلاحظ ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) للمعاملة الاولى (قبل التجميد) على جميع المعاملات في حين لم نلاحظ أي زيادة معنوية بين المعاملات الثانية والثالثة والرابعة كما موضح في جدول رقم (2) ويرجع السبب الى ان التجميد يؤدي الى تكوين البلورات الثلجية التي تحطم الغشاء البلازمي للنطف وبالتالي يحصل تغيير في شكل النطف مما يؤدي الى زيادة عدد النطف المشوهة والنطف الميتة (Esteves وزملاؤه ،

جدول رقم (1). يبين تأثير اضافة العسل (قبل التجميد) على نشاط نطف البربخ للجمال العراقية بعد الاذابة

المعاملات	قبل التجميد	بعد الاذابة	المعاملات
المعاملة الاولى (السيطرة)	المعاملة الثانية (0%)	المعاملة الثالثة (5%)	المعاملة الرابعة (10% HB)
0.56± 20.66	0.56± 9.50	0.75± 13.83	0.76± 12.66
a	c	b	b
0.77± 21.66	0.97± 11.00	0.49± 15.66	0.86± 16.04
a	c	b	b
0.70± 23.16	0.60± 15.83	1.30± 16.83	0.48± 16.83
a	b	b	b
1.61± 34.50	1.54± 63.33	0.92± 53.50	0.75± 54.83
c	a	b	b

جدول رقم (2). يبين تأثير اضافة العسل (قبل التجميد) على نشاط نطف البربخ للجمال العراقية بعد الاذابة

المعاملات	(قبل التجميد)	بعد الاذابة	المعاملات
معاملة الاولى (السيطرة)	المعاملة الثانية (0% HB)	المعاملة الثالثة (5% HB)	المعاملة الرابعة (10% HB)
0.56± 21.66	0.58± 21.91	0.97± 20.00	0.60± 19.16
a	a	ab	b
1.61± 65.50	1.54± 36.66	0.92± 46.50	0.42± 46.50
a	c	b	b
1.61± 34.50	1.54± 63.33	0.92± 53.50	0.42± 53.50
c	a	b	b
1.23± 79.50	2.21± 69.66	0.70± 72.6	0.42± 73.66
a	b	b	b

2.00± 58.00 b	1.07± 58.16 b	0.80± 40.66 c	1.76±71.33 a	حيوية النطف (%)
الأحرف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروقات معنوية (P≤0.05) بين المعاملات. H.B% : تمثل النسبة المئوية لتركيز عسل النحل.				

استخدام العسل بتركيز 10% اعطى افضل النتائج .

الاستنتاجات

امكانية تجميد النطف البريخية للجمال العراقية .

References

- Andrabi, S. M. H., 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. *International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)*. (9), Pp.367-369.
- Aparna, A.R. and Rajalakshmi, D., 1999. Honey—its characteristics, sensory aspects, and applications. *Food Reviews International*, 15(4), Pp.455-471.
- Bailey, J., Morrier, A. and Cormier, N., 2003. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Canadian journal of animal science*, 83(3), Pp.393-401.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. and Gallmann, P., 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), pp.677-689.
- Chen, B. X., Zhao, X. X. and Huang, Y. M., 1990, September. Freezing semen and AI in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). In *Proc. Unite de Coordination pour l'Elevage Camelin*. Workshop: Is it Possible to Improve the Reproductive Performance of the Camel (Pp. 285-291).
- Cooper, M. J., Skidmore, J., Ali, M., Billah, T., Wensvoort, S., Billah, A. and Allen, W.R., 1990. An attempt to induce and synchronize ovulation and superovulation in dromedary camels for embryo transfer. In *Proc. Unite de Coordination pour l'Elevage Camelin* (Pp. 313-326).
- Esteves, S. C., Sharma, R. K., Thomas Jr, A. J. and Agarwal, A., 2007. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International braz j urol*, 33(3), pp.364-376.
- Fakhrildin, M. B. M. and Alsaadi, R. A., 2014. Honey supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *Journal of family & reproductive health*, 8(1), p.27.
- Fakhrildin, M. B. M. and Alsaadi, R. A., 2014. Honey supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *Journal of family & reproductive health*, 8(1), p.27.
- Fernández-Baca, S., 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal reproduction science*, 33(1), pp.307-323.
- Fuller, B. J., 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, 25(6), Pp.375-388.
- Homeida, A. M., Khalil, M. G. R. and Taha, A. A. M., 1988. Plasma concentrations of progesterone, oestrogens, testosterone and LH-like activity during the oestrous cycle of the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of reproduction and fertility*, 83(2), pp.593-598.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. and Zaneveld, L. J. D., 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, 70(1), Pp.219-228.
- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal reproduction science*, 62(1-3), pp.113-141.
- Lemma, A., 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In *Artificial insemination in farm animals*. In *Tech*, Pp. 191-216
- Mahfouz, R., Sharma, R., Thiyagarajan, A., Kale, V., Gupta, S., Sabanegh, E. and Agarwal, A., 2010. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and sterility*, 94(6), Pp.2141-2146.

- Manafi, M. 2011. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Published by In Tech Janeza Trdine (9), 51000 Rijeka, Croatia.
- Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J. E. S. Ú. S. and Sancho, M. T., 2003. Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of food protection*, 66(12), Pp.2371-2376.
- Moskwa, J., Borawska, M. H., Markiewicz-Zukowska, R., Puscion-Jakubik, A., Naliwajko, S. K., Socha, K. and Soroczynska, J., 2014. Polish natural bee honeys are anti-proliferative and anti-metastatic agents in human glioblastoma multiforme U87MG cell line. *PloS one*, 9(3), p.e90533.
- Muldrew, K., Acker, J. P., Elliott, J. A. W. and McGann, L. E., 2004. The water to ice transition: implications for living cells. *Life in the frozen state*, Pp.67-108.
- Pace, M. M. and Graham, E. F., 1970. The release of glutamic oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method of assessing semen quality and fertility. *Biology of reproduction*, 3(2), Pp.140-146.
- Said, T. M., Gaglani, A. and Agarwal, A., 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), Pp.456-462.
- Sikka, S. C., 2004. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of andrology*, 25(1), pp.5-18.
- Sikka, S.C. (2004). Role oxidative stress and antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *J. Androl.* (25), Pp. 786-799.
- Vaughn, M., 2001. Bryant Jr. Pollen Contents of Honey. *CAP News letter*, (24), Pp.10-24.
- Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, (60), Pp.481-492.
- Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, (60), Pp.481-492.
- World Health Organization, 2010 Reference values and semen nomenclature. In: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th. Ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.. ISBN 9789241547789.