EFFET OF EXTENDERS AND CRYOGENES ON SOME SPERMATOLGICAL PROPERTIES OF GRASS CARP CTENOPHORYNGODEN IDLLA FISH

تأثير المخففات وموانع التجميد في عدد من الصفات الحيوية لمني أسماك الكارب العشبي CTENOPHORYNGODEN IDLLA المحفوظ بالتجميد العميق

عباس حسين غافل
قسم تقنيات الانتاج الحيواني – الكلية التقنية / المسيب – هيئة التعليم التقني

المستخلص

أجري البحث لدراسة تأثير ستة مخففات تمثلت بمخفف الكركورا المطور (Modified kurokura M.K) والمني الصناعي (Artificial seminal plasma ASP) ومخفف الكركورا (kurokura -K) والوسط غير المحرك (I .M Immobilizing Media) والمخفف المحتوي على قاعدة سكرية (كلوكوز + ملح الطعام + ثنائي كربونات الصوديوم) والمخفف المحتوي على قاعدة سكرية (كلوكوز + Tris) وثلاثة مواد حافظة ومانعة تبلور وهي Dimethyl sulfa oxide (DMSO) والميثانول والجليسيرول في الصفات الحيوية للمني وتمثل بالاتي (نسبة الحركة الجماعية للنطف مدة حيوية الحركة الجماعية للنطف /ثانية ومدة الحركة الفردية للنطف /ثانية ودرجة الأس الهيدروجيني للمني وحجم النطف المرصوصة ٪ وإعداد النطف × 10^9 / ملم ^{3}) من المني المخلوط بعد الجمع من ذكور معروفة الصفات الوراثية ومن قطيع التكاثر المعد للتلقيح الاصطناعي الكارب العشبي في موسم التكاثر في أشهر آذار ونيسان ومايس للعام 2008 في مفقس الفرات في محافظة بابل , خفف للمني بنسبة 1 : 10 حجم كلي للمخفف والمادة الحافظة بتركيز 10 % , تمت المعادلة لمدة 10 دقيقة ترفع ثم عبئ المني المخفف في قصبات بلاستيكية حجم 0.25 ملم^3 وإغلاق النهاية المفتوحة بمادة بولي فينايل الكحول ثم حفظت القصبات بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

اتضح من نتائج الدراسة الحالية ان هنالك تأثيرا معنويا للمخففات وموانع التجميد في الصفات الحيوية للمني المحفوظ وان أفضل نسبة حركة جماعية للنطف بعد الإذابة والتنشيط عند استعمال المخفف الأول كركورا المطور والمخفف الثاني البلازما المنوية الصناعية (55.55 و53.88 و50.00 و45.55 و40.00) (56.11 و54.44 و50.00 و45.55 و38.88٪) على التوالي ولجميع اشهر الدراسة من السادس الى العاشر وان أفضل نتائج في الصفات الحيوية المدروسة قد تحققت عند استعمال مانع تجميد DMSO مع المخففات المحتوية على الأملاح والايونات (55.00 و53.61 و50.55 و47.77 و42.22٪) ولجميع أشهر الدراسة من السادس الى العاشر ويمكن الاستنتاج من هذه الدراسة بإمكانية الحفظ بنجاح بالتجميد العميق على – 196 ْم وباستعمال النايتروجين السائل لتحسين وتطوير تقانات التكثير الاصطناعي لاسماك الكارب العشبي وذلك بتوفير المني من سلالات وراثية معروفة .

ABSTRACT

Experiment were carried out to investigate the effect of six extenders Modified kurokura (M.K) Artificial seminal plasma(ASP) Kurokura Immobilizing Media Glucose + Nacl + $NaHco_3$ and Glucose + Tris And three cryoprotectant agents Dimethyl sulfa oxide (DMSO) ME_2SO Methanol and Glycerol on the spermatological properties which are total motility % total viability (Duration of motility) /second Individual duration /second and pH of seminal plasma and packed sperm volume % and number of sperm x $10^9/ml^3$ of seminal plasma of pooled semen collected from proven selected brood stock males grass carp hormonally induce stripping at reproduction season (march , April and may) 2008 in Babylon province Hatcheries . The milt was diluted at 1; 10 total volume extender and 10 % cryogen equilibrate fore 10 minute then packed in plastic straw 0.25 ml sealed with poly venial alcohol and Cryopreservation at – 196 c°.

This study showed a significant influence of extender and cryogen on the spermatological properties of preserved semen , the optimum post thawing motility % after activation which is one of key that influence on fertilizing ability of sperm when used the modified kurokura and artificial seminal plasma (55.55 ,53.88 ,50.00 ,45.55 and 40.00) (56.11 ,45.44 ,50.00 ,45.55 and 38.88 %) respectively from June to October and the optimum result when used DMSO with

extender contain salt and ions (55.00 ,53.61 ,50.55 ,47.77 and 42.22%) respectively from June to October DMSO It is conclude from this study that long term cryopreservation at -196 °c can be successfully done .The present in formation will evently help in selecting good extender M. K and A.S.P and with DMSO as crygene for long term cryo presertion for improved artificial propagation in grass carp fishs .

المقدمـــه

استثمرت البحوث في عمليات التلقيح الاصطناعي وفي مجال الانتخاب الجنسي للأسماك تحت ظروف التكاثر الطبيعي والاصطناعي (27)و(10) وقد اهتمت العديد من دول العالم بإيجاد تقانات ووسائل جديدة لتطوير ثروتها السمكية وبشكل خاص تلك التي تتعلق بالتحسين الوراثي وتقليل كلف الإنتاج ومن هذه التقانات حفظ المني للأسماك بطريقة التجميد العميق (Cryopreservation) على درجات حرارة تصل – 79ْم باستعمال الثلج الجاف والتجميد العميق على درجه حرارة – 196 ْم باستعمال النيتروجين السائل هي الأكثر شيوعا في الوقت الحاضر ولهذه التقانه دور مهم في حل الكثير من المشاكل التي تواجه التكثير الاصطناعي ونجاحه في جمع النواتج ألجنسية من الذكور والإناث عندما تكون في أماكن متباعدة عن بعضها أو قد لا تكون متوفرة معا في الوقت نفسه (5) وكذلك التغلب على مشكلة إنتاج كميات قليلة من المني لبعض الأسماك (28)و(5)و(20)و(15) أو الاستفادة من المني عندما يكون عالي ألجودة بحل مشكلة ما يسمى شيخوخة النطف التي ينتج عنها انخفاض نوعية المني (24) فضلا عن ان هذه التقانات تقلل كلفة الاحتفاظ بالذكور على مدار ألسنة (6) وبذلك تقتصر ألكلفة بالاحتفاظ بالإناث فقط فضلا عن استعمالها في البرامج ألبحثية وخصوصا عند إنتاج الهجن والاحتفاظ بالصفات المرغوبة وتطوير صفات أخرى (15) وكذلك تعمل هذه التقانه على تجنب أثار الإمراض التي تحدث بشكل مفاجئ أو الحوادث مثل التسرب النفطي (7) وهنالك عوامل تتداخل في إنجاح هذه التقانه منها نوعية المني المستعملة في التجميد (4) والمخفف الملائم ونسبه التخفيف (13) والمواد ألحافظة ونسبها (29) وطريقة ومعدل التبريد والإسالة (23) والنجاح في حفظ وتجميد النطف لأسماك الكارب يساعد في الحصول على أجيال (تحسين وراثي) من أباء ذات صفات وراثية جيده ومرغوبة ويساعد في نقل المني للأسماك ذات الصفات الوراثية المرغوبة بسهوله ويسر الى مناطق بعيده بدلا من نقل الأسماك في أحواض كبيرة ومكلفه يمكن حمل النطف ألمجمده في حاوية وتجهز المفاقس بالنطف على مدار ألسنه وعند ألحاجة وأمكانيه تكوين بنك للمني مشابه لمركز التلقيح الاصطناعي للحيوانات الكبيرة والاقتصاد في تداول الذكور في تقانات التناسل والتكاثر ويستعمل ذكر واحد ذا مواصفات عالية ليخصب أكثر من أنثى ويعود تاريخ استعمال هذه الطريقة الى عام 1853م إذ بحث العلماء آنذاك طرائق لحفظ الخلايا الجنسية الذكرية حية (15) .

وكان الهدف من البحث دراسة تاثير ستة مخففات (Extender) المستعملة لحفظ مني اسماك الكارب العشبي وتقييم بعض المواد الحافظة (Cryogen) النافذة وغير النافذة لحفظ نطف اسماك الكارب العشبي ومدى تاثيرة في الصفاة الحيوية للمني وكفائتة وفعاليته لاجراء تقانات التكثير الاصطناعي وتوفير المني عندما تتوفر البيوض لتطوير عمليات التفقيس الاصطناعي .

المواد وطرائق العمل

اجري البحث في مفقس شركه الفرات المحدودة لإنتاج الأسماك الذي يقع شمال مركز محافظة بابل حوالي 5 كم حيث يقوم بإنتاج 1.5 مليون إصبعية من الكارب العشبي وجمع المني بعد وضع الذكور المعدة للجمع في احواض خاصة وتم تحفيزها هرمونيا باستعمال مستخلص الغدة النخامية إذ طحنت خلاصه الغدة النخامية بهاون خزفي جاف وذوبت بالمحلول الفسلجي (7 غم كلوريد الصوديوم في 1 لتر ماء) وبعد تسجيل أوزان الذكور المختارة والمعلمة من كل وجبه بوساطة ميزان MP 1364 وعلى ضوء الوزن حسبت الجرعة اللازمة لكل ذكر إذ حقن 2 ملغم / كغم وزن حي وأعطيت بجرعة واحده مع الجرعة الثانية للأنثى تمت المراقبه للذكور المحقونة وفحصها كل ساعتين وبعد 12ساعه من الحقن تم جمع المني من الذكور بطريقه التمسيد الخفيف على جدار البطن بعد مسك الذكر والسيطرة عليه جيدا بوساطة عامل متدرب ووضع على إسفنجه ومسك باستعمال قطعة قماش بعد تجفيف الفتحة التناسلية وتم إفراغ المني من الذكور في بيكرات بلاستيكية نظيفة جافه معقمة مدرجة لكل ذكر حسب الأوزان أو الأعمار ، إما الضغط على منطقه البطن فيكون بين الزعنفة البطنية والحوضية باتجاه الفتحة التناسلية (26) بعد جمع المني وضع في أنابيب سعه 10ملم^3 في حاويه مبرده بداخلها ثلج مجروش لغرض تبريد المني إثناء النقل إلى المختبر واستعمل لهذه التجربة المني بطريقه الخلط ولغرض التعرف على المواصفات الحيوية المطلوبة في النطف المعدة للتبريد والتجميد العميق تم تخفيف المني الطري على مرحلتين بالمخففات المستعملة في البحث وذلك لتقليل لزوجه المني وزيادة انتشار النطف حيث كانت نسبه التخفيف 10:1 (مني: مخفف) ثم اخذ 0.1 مل من المني المخفف وأضيف إلى 1مل من المخفف فأصبحت 100:1 مل ثم اخذ 0.1 مل من المني المخفف وأضيف إلى 1 مل فأصبح التخفيف 1000:1 وأجريت بعد ذلك فحوصات حركه النطف بوساطة المجهر بقوه تكبير X400 وذلك بوضع قطرة صغيرة من المني على الشريحة الزجاجية ومن ثم نشطت النطف بإضافة قطرة صغيرة من محلول التخصيب أو التنشيط بعد المزج، وضع غطاء الشريحة وتمت مراقبه الحركة التي بدأت حال الملامسة وأعيدت كل عمليه ثلاث مرات ثم سجلت القراءات وقد شملت الدراسة ونسبه حركه النطف وحساب مده الفعالية وحيوية الحركة الجماعية والحركة الفردية للنطف وقياس قيمه الأس الهيدروجيني وتركيز النطف (الكثافة) وقياس إعداد النطف × 10^9 / ملم ^{3} من المني بعد وصول

المني الطري والموضوع في أنابيب اختبار داخل الثلج المجروش في حافظة خاصة (ترمس) وفي غرفه مبرده وتم وضع المواد المستعملة في التعبئة والمخففات في ثلاجة وعلى درجه -5 مْ لتلافي حصول تفاوت حراري بين المني والمواد المستعملة في التعبئة نظرا لحساسية النطف للحرارة والصدمة الحرارية (25) بعد ذلك تم تخفيف المني الطري بنسبة 10:1، ولتجنب حدوث الصدمة الازموزية (12) استعملت في التجربة ثلاثة مواد حافظة هي (Dimethyl sulfa oxide DMSO) 10% والميثانول 10% والجليسيرول 10% بعد التخفيف تم حفظ المني المخفف على 5 مْ لمده 10 دقائق للتعادل بعد أن تم ترقيم وتعليم المخففات الستة المستعملة في التجربة للكارب العادي . بعد مده التعادل تم تعبئه المني المخفف في قصبات بلاستيكية (Straw) ذات حجم 0,25 ،أجريت عمليات التجميد العميق بالاستعانة والفحص في قسم التلقيح الاصطناعي التابع للشركة العامة لخدمات الثروة ألحيوانيه في أبي غريب وتمت الإسالة في حمام مائي على درجه 35 مْ لمده 110 ثانيه وحسب طريقه (19) أستعمل البرنامج الإحصائي SAS (2001) في تحليل تأثير العوامل المدروسة للمخففات وموانع التجميد في الصفات المختلفة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار دنكن (14) متعدد الحدود . استعملت في هذه الدراسة ستة مخففات هي كركورا المطور ومخفف البلازما المنوية ومخفف الكركورا والوسط غير المحرك والوسط المحتوي على كلوكوز + ملح الطعام + ثنائي كاربونات الصوديوم وكلوكوز + Tris .

جدول رقم (1) أنواع المخففات المستعملة في التجربة (غم / لتر)

ألمـــاده	المخفـــــــــــــف					
	الأول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس	السادس
	M.K كركورا المطور	ASP البلازما المنوية الصناعية	K كركورا	I.M الوسط غير المحرك	كلوكوز+املاح الصوديوم	كلوكوز+ Tris
NaCl	3.60	3.21	0.75	_	0.30	_
KCl	10,00	6,14	0.02	14.91	_	_
CaCl2	22.0	0,22	0.02	_	_	_
MgCl2	0.08	0,07	_	_	_	_
NaHCo3	20.0	1.67	02.0	_	0.05	_
Tris*	_	_	_	1.83	_	1.83
Glucose	_	_	_	_	6.00	22.00

* Tris = Hydroxyl methyl amine methan محلول منظم للاس الهيدروجيني (pH)

النتائج والمناقشة

يتضح من الجدول 2 : إن للمخففات تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في الحركة الجماعية للنطف ولجميع أشهر الدراسة (من السادس إلى العاشر) اذ حقق المخفف الأول أفضل نسبة حركة جماعية (55.55 و53.88 و50.00 و45.55 و40.00٪) وللأشهر من السادس الى العاشر على التوالي والمخفف الثاني (ASP) (56.11 و54.44 و50.00 و45.55 و38.88٪) ولجميع أشهر الدراسة من السادس الى العاشر أفضل نسبة حركة للنطف ولجميع أشهر الدراسة بعد الإسالة ، وقد يعود السبب إلى إن المخففان يحتويان على عناصر ومكونات تحاكى التركيب الفسلجى للبلازما المنوية ويوفران محلول دارئ (Buffer) وهما ملائمان لحفظ نطف اسماك الكارب واسماك Tench واسماك Piracan juba (21) ، فضلا عن أنهما يحافظان على الضغط الازموزى بين المخفف والبلازما المنوية مما يثبط حركة النطف إثناء التخفيف والخزن والمحافظة على النطف دون ان تستنزف طاقتها المخزونة فيها (11) ويحتويان على MgوNa المسؤلان عن استمرار الحركة فضلا عن الكالسيوم الضروري لابتداء وزيادة نسبة الحركة (28) وأظهرت الدراسة إن لموانع التجميد تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في النسبة المئوية لحركة النطف , اذ حقق المانع DMSO أعلى النسب ولجميع أشهر الدراسة (55.00 و53.61 و50.55 و47.77 و42.22٪) على التوالي تلاه الجليسيرول إذ كانت نسب الحركة (52.50 و50.00 و46.66 و43.33 و39.72٪) على التوالي وأخيرا جاء الميثانول من حيث نسب الحركة إن سبب التفوق ربما يعود إلى فاعليته في المحافظة على بيوت الطاقة (Mitochondria) ومحتواها من ATP والتي يعول عليها في الحركة الجماعية (21) إما سبب تدنى نسب الحركة باستعمال الميثانول يتفق مع ما توصل إليه (12) والذي أشار إن لا فاعلية تذكر للميثانول عند استعماله لحفظ نطف اسماك كروكرا الأطلسي .

جدول 2 : تأثير المخففات وموانع التجميد في نسبة الحركة الجماعية للنطف لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النايتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	AB 55.55	A 53.88	A 50.00	A 45.55	AB 40.00
2	A 56.11	A 54.44	A 50.00	A 45.55	AB 38.88
3	B 47.77	B 46.11	B 43.33	B 41.11	B 37.77
4	B 47.77	B 45.55	B 43.88	B 41.66	B 37.22
5	AB 55.00	A 52.77	A 49.44	A 46.66	A 41.66
6	B 47.77	A 50.55	A 48.88	A 45.00	A 42.22
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 55.00	A 53.61	A 50.55	A 47.77	A 42.22
MeoH	C 50.00	B 48.05	B 45.55	B 41.66	C 36.94
Glycerol	B 52.50	B 50.00	B 46.66	B 43.33	B 39.72
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .** (P<0.01)

يتبين من 3 : إن هنالك تباين معنوي (P<o.o1) في حيوية الحركة الجماعية للنطف من الشهر السادس إلى العاشر إذ حقق المخفف 4 الوسط غير المحرك أعلى المدد (235.55 و232.22 و223.33 و223.33 و215.55 /ثانية) ويعتقد إن سبب التفوق هو احتوائة على البوتاسيوم الذي يثبط حركة النطف إثناء التخفيف والتجميد وبذلك تبقى النطف محافظة على الطاقة المخزونة (ATP) في خلية النطف مما أدى إلى زيادة مدة حيوية النطف المتحركة وهنالك علاقة قوية بين الحركة والإخصاب والفقس(28) وقد جاءت نتائج هذه الدراسة قريبة لما توصل إلية (3) إذ كانت مدة الحيوية 250 ثانية لأسماك الكارب المرأتي .

ويتضح من نفس الجدول إن هنالك تباين معنوي (P<0.01) في حيوية النطف لجميع أشهر الدراســة عدا الشهر العاشر اذ لم تتأثر هذه الصفة بموانع التجميد المدروسة وحقق DMSO أطول المدد لبقاء الحركة الجماعية (240.55 و235.00 و225.00 و213.88 و201.11 /ثانية) على التوالي بعد الإسالة من التجميد العميق وربما يعود سبب التفوق الى ملائمة لنطف هذا النوع من الأسماك لمحافظتة على بيوت الطاقة وعليها تعتمد الحيوية والحركة كونها مصدر الطاقة في خلية النطفة إما الميثانول الذي حقق أدنى القيم (227.77 و222.22 و211.66 و204.44 و192.22/ ثانية) على التوالي فهو يتفق مع ما اكدة (22) الذي أشار ان للميثانول تأثيرا ساما على سلامة الغشاء البلازمي وفاعلية بيوت الطاقة مقارنة مع DMSO والجلسيرول كما ان فاعليتة كانت قليلة كمادة حافظة على اسماك التراوت قوس قزحي الطرية والمجمدة (16) .

جدول 3 : تأثير المخففات وموانع التجميد في حيوية الحركة الجماعية للنطف /ثانية لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النايتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	AB 234.33	A 231.11	B 212.22	C 194.44	C 180.00
2	AB 233.33	A 230.00	A 215.55	BC 204.44	BC 188.88
3	B 224.44	B 218.88	B 211.11	AB 213.33	B 200.00
4	A 235.55	A 232.22	A 223.33	A 223.33	A 215.55
5	A 235.55	AB 225.55	A 220.00	B 211.11	B 195.55
6	AB 231.11	AB 225.55	A 221.11	BC 202.22	B 193.33
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 240.55	A 235.00	A 225.00	A 213.88	A 201.11
MeoH	B 227.77	B 222.22	B 211.66	B 204.44	B 192.22
Glycerol	B 228.88	B 224.44	B 215.00	B 206.11	B 193.33
مستوى المعنوية	**	**	**	**	NS

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .** (P<0.01)

أظهرت النتائج الحالية بان لنوع المخفف تأثيرا معنويا (P< 0.01) في الحركة الفردية للنطف (طول المدة الزمنية بالثانية لبقاء أخر نطف متحركا حول نفسة) ، اذ حقق المخفف 4 الوسط غير المحرك أطول المدد (351.11 و341.11 و330.00 و324.44 و305.55 /ثانية) على التوالي ولجميع اشهر الدراسة (جدول 4) ويعتقد إن سبب ذلك هو احتواء المخفف على البوتاسيوم الذي يثبط الحركة إثناء التخفيف والتجميد ويحافظ على النطف غير متحركة دون إن تستنزف طاقتها المخزونة مما أدى الى بقائها متحركة لأطول مدة زمنية والحركة الفردية للنطف متلازمة مع الحركة الجماعية للنطف تزداد وتقل تبعا لها وهى تزداد وتقل تبعا لها .

ويتبين من جدول 4 : إن هنالك تأثيرا عالي المعنوية (p<0.01) لموانع التجميد على الحركة الفردية للنطف عدا الشهر العاشر إذ لم تتأثر هذه الصفة معنويا بموانع التجميد في الشهر العاشر وقد سجلت أعلى المدد (350.00 و339.44 و320.00 و280.55 و243.88 /ثانية) على التوالي وسبب تفوق DMSO (350.00 و339.44 و320.00 و280.55 و243.88/ ثانية) على التوالي وذلك لمحافظته على بيوت الطاقة والتي يعتمد عليها في حركة النطف (21) .

جدول 4 : تأثير المخففات وموانع التجميد في حيوية الحركة الفردية للنطف / ثانية لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النيتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	AB 337.77	A 330.00	BC 300.00	D 230.00	D 203.33
2	B 328.88	A 324.44	C 286.66	C 245.55	C 222.22
3	AB 338.88	A 325.55	C 291.11	B 276.66	B 234.44
4	A 351.11	A 341.11	A 330.00	A 324.44	A 305.55
5	A 347.77	A 328.88	AB 330.00	B 266.66	C 224.44
6	A 346.66	A 332.22	AB 316.66	B 260.00	B 244.44
مستوى المعنوية	**	NS	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 350.00	A 339.44	A 320.00	A 280.55	A 243.88
MeoH	B 335.00	AB 330.00	B 297.77	B 265.00	A 236.11
Glycerol	AB 340.55	B 321.66	B 294.44	B 256.11	A 237.22
مستوى المعنوية	**	**	**	**	NS

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .** (P<0.01) ، NS (غير معنوي) .

ويتضح من جدول 5 : إن للمخففات تأثيرا معنويا (P <0.01) على درجة الأس الهيدروجيني للمني للأشهر الثامن والتاسع والعاشر من الدراسة في حين لم تتأثر هذه الصفة بالمخففات للشهر السادس والسابع ، وقد سجل المخفف (6) المحتوى على كلوكوز و Tris اعلي القيم (7.50و7.50و7.50 و7.44 و7.40) على التوالـي ، وهذا يتفق مع ما توصل إلية (17) من إن زيادة قيمة الأس الهيدروجيني تزيد من نسبة الإخصاب عند استعمال المحلول المنشط (Activation solution) وقد تم استعمال هذا المحلول في الدراسة لجميع الصفات المدروسة للمني وتبين إن لموانع التجميد المدروسة تأثيرا معنويا (P<0.01) على الأس الهيدروجيني المني المسال بعد التجميد العميق وقد سجل (DMSO) أعلى القيم (7.51 و7.50 و7.46 و7.42 و7.39) بالمقارنة مع النوعين الآخرين .

جدول 5 : تأثير المخففات وموانع التجميد في درجة الأس الهيدروجيني لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النيتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 7.51	A 7.46	B 7.41	B 7.37	B 7.26
2	A 7.51	B 7.45	B 7.43	B 7.41	AB 7.33
3	A 7.51	B 7.45	B 7.42	B 7.41	AB 7.34
4	A 7.50	AB 7.46	B 7.43	B 7.41	AB 7.33
5	A 7.50	AB 7.47	B 7.42	B 7.41	A 7.40
6	A 7.50	A 7.50	A 7.50	A 7.44	A 7.40
مستوى المعنوية	NS	NS	*	*	*
Cryo gene					
DMSO	A 7.51	A 7.50	A 7.46	A 7.42	A 7.39
MeoH	A 7.50	B 7.45	B 7.42	A 7.40	B 7.30
Glycerol	A 7.50	B 7.45	B 7.41	A 7.40	AB 7.34
مستوى المعنوية	NS	*	*	NS	*

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .* (P<0.05)

إن لنوع المخفف تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في حجم النطف المرصوصة بعد الإسالة من التجميد العميق ولجميع أشهر الدراسة من السادس إلى العاشر (جدول 6) ، وقد حقق المخفف الثاني (ASP) أعلى النسب (58.66 و57.11 و54.33 و47.88 و40.44٪) على التوالي ، وهذا ما يتفق مع ما توصل آليه (1) من إن ASP أفضل المخففات موازنة مع المخففات الأخرى .

وأظهرت النتائج إن هذه الصفة قد تأثرت معنويا عند مستوى (P<0.01) إذ سجل DMSO أعلى النسب لهذه الصفة (57.66 و56.22 و52.66 و50.11 و45.00٪) على التوالي في حين كان أدنى مستوي عند استعمال الميثانول وقد جاء الجليسيرول وسطا بين الاثنين ، ربما يعزى سبب تفوق DMSO الى ملائمتة لنطف اسماك الكارب ونتائج الدراسة تتفق مع ما توصل إليه (18) .

جدول 6 : تأثير المخففات وموانع التجميد في حجم النطف المرصوصة لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النيتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	AB 58.00	AB 56.33	A 52.77	A 48.22	AB 42.66
2	A 58.66	A 57.11	A 54.33	AB 47.88	BC 40.44
3	C 50.88	C 48.88	B 45.88	C 43.66	C 40.22
4	C 50.33	C 48.22	B 46.44	BC 44.22	C 39.88
5	AB 57.66	AB 55.33	A 52.11	A 49.11	AB 43.77
6	B 55.11	B 52.88	A 51.44	AB 46.88	A 44.88
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 57.66	A 56.22	A 52.66	A 50.11	A 45.00
MeoH	C 52.55	B 50.55	A 50.61	B 44.22	C 39.27
Glycerol	B 55.11	B 52.61	B 48.22	B 45.66	B 41.66
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .** (P<0.01)

ويبين جدول 7 : إن لنوع المخفف المستعمل تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في إعداد النطف إذ حقق المخفف 2 (ASP) أعلى الإعداد (5.48 و5.25 و4.77 و4.35 و3.58×10^9 نطفة /ملم من المني) لأشهر الدراسة من السادس الى العاشر على التوالي ، في حين كانت أدنى الإعداد عند استعمال المخفف 4 الوسط غير المحرك وكانت الإعداد (4.66 و4.47 و4.45 و4.04 و3.61 ×10^9 /ملم من المني) ، وان السبب قد يكون في تفوق ASP هو في محاكاته الى السائل المنوي لاحتوائه على مكونات تثبط الحركة وتحدث محلول دارئ يحافظ على النطف من صدمة التخفيف والتجميد والصدمة الازمولية والتي تسبب تناقص إعداد النطف بعد التجميد مباشرة (9) .

كان لموانع التجميد المدروسة تاثيرا عالي المعنوية (P<0.01) على إعداد النطف وقد حقق DMSO أعلى تلك الإعداد (5.38 و5.21 و4.92 و4.60 و4.08 ×10^9 /ملم من المني) بينما كانت ادني الإعداد عند استعمال الميثانول وجاء الجليسيرول وسطا بين الاثنين ويعتقد ان سبب التفوق الى ملائمة DMSO لحفظ نطف العديد من الأسماك إما سبب تدنى الإعداد عند استعمال الميثانول هو لتأثيره السام على غشاء خلية الحيمن مما يسبب موت النطف وقلة الإعداد (22) .

جدول 7 : تأثير المخففات وموانع التجميد في إعداد النطف × 10^9 / ملم ^{3} من المني لأسماك الكارب العشبي المحفوظ باستعمال النيتروجين السائل بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم .

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	AB 5.40	A 5.24	A 4.90	A 4.45	AB 3.90
2	A 5.48	A 5.25	AB 4.77	AB 4.35	B 3.58
3	C 4.74	C 4.52	C 4.20	C 3.97	B 3.62
4	C 4.66	C 4.45	BC 4.47	BC 4.04	B 3.61
5	AB 5.32	BC 5.06	AB 4.74	AB 4.35	AB 3.88
6	B 5.10	BC 4.80	AB 4.73	AB 4.23	A 4.07
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 5.38	A 5.21	A 4.92	A 4.60	A 4.08
MeoH	C 4.86	B 4.61	B 4.48	B 3.95	B 3.52
Glycerol	B 5.11	B 4.84	B 4.50	B 4.15	B 3.73
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها .** (P<0.01) .

المصـــــادر

1- الرديني , محسن جواد كاظم ،(2002). حفظ المني لأسماك الكارب العادي ***(Cyprinus carpio)*** بطريقة التجميد العميق .رسالة ماجستير. كلية الزراعة ,جامعة الانبار , ص67 .

2-عجام , إسماعيل , حسين السعدي, مرتضى الحكيم ،(1981) . فسلجة التناسل والتلقيح الاصطناعي جامعة الموصل . ص 536

3- Akcay ,E. Bozkart, S. and Tekun, N.(2004).Cryopreservation of Mirror Carp semen .Turk .J. Vet . Anim .Sci.28;837-843 PP.

4- Billard, R., 1990. Artificial insemination in fish. In G.E. Lamming, Editor. Marshall's Physiology of Reproduction , volume 2, reproduction in the male. Churchill Livingstone, New York.

5- Blaxter, J. H. S., 1953. Sperm strage and cross- fertilization of sprig and autumn spawning herring . Nature (London).172: 1189-1190.

6- Bromage, N.(1995). Brood stock management and seed quality. General considerations. In : Broodstock management and egg and larval quality (ed. by, Bromage, N. R. & Roberts, R. J.).. Cambridge University Press. Cambridge. p. 1-25.

7- Chao, N. and . Liao .I, (2001) . Cryopreservation of fin fish and shellfish gametes and embryos. Aqua. 197: 161-189.

8- Duncan , D. B. 1955. Multiple range and multiple of test-biometrics ,11:1

9- Fiser, P. and . Fairfull R, (1989) . The effect of the glycerol – related osmotic changes on post – thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa , Cry and obiol., 26:64-69.

10- Gage, MJG, Stockley P, Parker GA (1995). Effects of alternative male mating strategies on characteristics of sperm production in the Atlantic salmon (*Salmo sala*): theoretical and empirical investigations. Phil Trans. R. Soc. Lond. B. 350:391-399. Cited by: Leach and Montgomerie, 2000.

11- Graham, E. (1978) . Fundamental of the preservation of spermatozoa . In : The Integrity of frozen spermatozoa. N.T. Grisamore and G. M. Sieber, editors. Proceeding of around-Table Conference, Washington, D.C., 4-44

12- Gwo, J. (1999) . Cryopreservation of sperm from endangered Formosan land locked salmon . Therio., 51: 569-582.

13- Herraez, M.; Carral, J., Alvarez, R., Saez -Royuela, M.and De-Paz, P., (1993) . Effect of several extenders and cryoprotectives on semen fertility in brown and rainbow trout. (*Actas-Marinas*).; 1-6 PP.

14- Horvath, A. and Urbanyi, B. (2000) . The effect of cryoprtectant on the motility and fertilizing of cryopreserved African catfish *Claris griepinus* sperm. Aqua. Res., 31: 317-324.

15- Horton, F. and Ott, G. (1976). Cryopreservation of spermatozoa and ova. J. Fish. Res. Bd. Can., 33:995-1000.

16- Leung, L.,(1987). Cryopreservation of the spermatozoa of the Barranunidi. *Lates calicalifer*. Aqua., 64:243-247.

17- Linhart, O.; Cosson,; J.; Mims, S.D.; Shelton, W.L. and Rodina, M. (2002). Effects of ions on the motity of fresh and demdmbranated paddle fish *(Polyodon spathula*) spermatozoa. Reproduction 124 713-719.

18- Magyary, I.; Urbanyi, B.; and L. Horvath, (1996) . Cryopreservation of common carp. optimal condition for fertilization. J. Appl. Ichthyol. 12(2) 117-119.

19- Maria, A.N. Viveirosa ,T.M. Frietasr, T,F and, Oliveira ,A.V.(2006). Extender and cryoprotectant for cooling and freezhng of priacanjuba (brycon orbignyanus) semen an endangered Brazillian teleost fish. Aquaculture 260;(1-4) 298-306 pp .

20- Ohta, H.; Shimma, H. and Hirose, K. (1995) . Relationship between fertility and motility of cryopreserved spermatozoa of amago salmon *Oncorhynchus masou* Ishikawae, Fish. Sci., 61: 886-887.

21- Ogier de Boulny, B.; Le Vern, Y.; Kerboeuf, D. and . Maisse G, (1997). Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa, Cryobiol., 34:141-149.

22- Piironen, J. and Hyvarinen, H. (1983) . Composition of milt of some teleost fishes. J. Fish. Biol. 22:351-361.

23- Rana, K. and Gilmour, A. (1996) . Cryopreservation of fish spermatozoa. Effect of reproducibility of cooling rates and viability . In Refrigeration and Aquaculture Conference, Bordeaux 20-22 March 1996. 3-12 PP.

24- Rana, K. (1995). Cryopreservation of gametes. In: Broodstock management and egg and larvel quality (ed. by N. R. Bromage & R. J. Roberts). PP 53-76 Cambridge University Press. Cambridge.

25- SAS. (2001) . SAS users Guide : statistics SAS. Inst . Inc. Cary. Nc. USA .

26- Scott, A. and . Baynes S, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish. Biol.,17: 707-739.

27- Stokley ,P. Gage, M.J.G. Parker, G.A. and Muller, A.P.(1997).Sperm competition in fish ;The evolution of testis size and ejaculate characteristics .The American Naturalist .149;933-954PP.

28- Suquet, M.; Dreanno, C.; Fauvel, C.; Cosson, J. and. Billard R, (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. Aqua. Res., 31:231-243.

29- Zhang, L.; Lu, X.; Chen, S.; Lu, D. and F. Guo, 1994. Effect of dimethyle sulfoxide on osmotic pressuer and survival rate of the sperm of several fresh water species. Acta. Hydrobiol. Sci. 18(4): 297-302.