تأثير المرحلة التكوينية في حفظ اجنة اسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio* L. بطريقة التجميد العميق Cryopreservation method

محمد عبد الهادي غالي*   محسن جواد كاظم**   عبد المطلب جاسم حمادي***

استلام البحث 26، ايلول، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة:

أستخدِمت في الدراسة الحالية 60 سمكة كارب اعتيادي *Cyprinus carpio* L.(40 ذكراً و 20 انثى) باعمار تراوحت بين 2 الى5 سنوات وباوزان تراوحت بين 2 الى5 كغم للذكور و 5- 8 كغم للاناث.

أجريتْ في هذه الدراسةِ سلسلةٌ من التجارب لمعرفة تأثير بعض العوامل الداخلة في حفظ أجنة اسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio* L. بطريقة التجميد العميق Cryopreservation method و منها تأثير المرحلة التكوينية Developmental stage من خلال قياس مدة الانكماش Shrinkage period measurementالتي سُجّلت فيها أطول مدة انكماش للأجنة باستخدام المواد الحافظة من دون الانزيمات في المرحلة التكوينية المعيدة Gastrula باستعمال المادة الحافــظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز15 % بمدة 67 .119 دقيقة، وسجلت اقل مدة انكماش باستخدام المادة الحافظة لوحدها ايضا عند معاملة الأجنة بالميثانول بتركيز5% لنفس المرحلة بنحو 33 .1 دقيقة. اما عند معاملة الاجنة بالمواد الحافظة والانزيمات معاً فقد وصلت مدة الانكماش الاطول وصلت الى36.67 دقيقة في مرحلة ضربات القلب Heart beat باستخدام انزيم التربسين والمادة الحافظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز15%وبمدة تعرض15 دقيقة ، في حين بلغت اقل مدة انكماش بلغت 3.33 دقائق عند معاملتها بإنزيم البرونيز والمادة الحافظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز5%وبمدة تعرض 5 دقائق في أثناء مرحلة المعيدة.

اما نسبة البقاء على قيد الحياة Survival ratio فقد كان الهدف من هذه التجارب معرفة نسبة بقاء أجنة اسماك الكارب الاعتيادي على قيد الحياة بعد معاملتها بالمواد والتراكيز السابقة نفسها لبيان مدى تحملها لهذه المواد قبل تجميدها.

تميزتْ نسبةُ الفقس Hatching ratio الأفضل للأجنة باستخدام المواد الحافظة من دون الانزيمات عند المعاملة بالمادة الحافظة الميثانول لوحدها بتركيز 5% إذ بلغت 80.33% وكانت في مرحلة ظهور العيون في حين كانت النسبة الاوطأ 33.33% في مرحلة المعيدة عند استخدام الكليسيرول كمادة حافظة بتركيز10%.

الكلمات المفتاحية: اسماك الكارب ،اجنة، التجميد العميق.

المقدمة:

هناك عدة عوامل اساسية لها تأثيرٌ مباشرٌ وضروريٌ في حفظ الاجنة بعملية التجميد العميق، اذ ان المرحلة التكوينية للجنين تعد العامل الحاسم لحيوية الاجنة بعد التجميد والاذابة[1] وان المراحل التكوينية لما بعد المعيدة Post gastrula وضربات القلب هي افضل المراحل من حيث معدل بقاء الاجنة[2].

تختلف حساسية الاجنة للتجميد باختلاف المرحلة التكوينية, فقد اوضحت دراسة [3]ان المرحلة التكوينية التي تسمى ما بعد مرحلة التغلف النصفي Half- epiboly Stage يكون فيها الجنين اقل حساسية للتجميد من المراحل المبكرة، وهذا ما اكده [4] في دراستهم لحفظ اجنة اسماك الزيبرا، اذ لاحظوا ان الاجنة في المرحلة التكوينية المتوسطة Intermediate Developmental Stage من مرحلة التغلف النصفي حتى مرحلة Prim-6 قد اعطت افضل النتائج. كذلك اوضحت دراسة [5] ان المراحل المبكرة من اجنة بعض انواع الاسماك العظمية Teleost تكون حساسة للتجميد اكثر من المراحل المتقدمة.

توصلت دراسة [6] المتعلقة بالازالة الجزئية للمح من اجنة اسماك الزيبرا *Dranio rerio* الى ان نسبة البقاء كانت 17.9% في مرحلة 26-Somit (24 ساعة بعد التخصيب)، ثم ارتفعت الى 81.4% بعد 49 ساعة، ولاحظ [7] ان اجنة اسماك عائلة الشبوطيات Cyprinidae كانت حساسة جداً للتجميد في مرحلتي التوتة Morula والتغلف النصفي Half-epiboly Stage ، فيما أعطت مرحلة ضربات القلب في اجنة اسماك الزيبرا افضل النتائج قياسا مع غيرها في المراحل المبكرة[8].

هناكَ علاقةٌ واضحةٌ بين المرحلة التكوينية و مدة التعرض لدرجات الحرارة. ففي دراسة [3] عن حساسية التعرض للتجميد لاجنة اسماك الزيبرا

*جامعة بغداد/كلية العلوم للبنات /قسم علوم الحياة
** وزارة العلوم والتكنولوجيا /الدائرة الزراعية
***جامعة بغداد/كلية الطب البيطري

وجد أن ما يقارب 50 % من الاجنة في مراحل 7 الى 20 ساعة بعد الاخصاب في مرحلة المعيدة تهلك عند تعرضها لمدد 20 دقيقة و4 و 14 و 16و20 ساعة لدرجة حرارة تبلغ صفراً مئوياً، في حين تتحمل هذه الاجنة التعرض لمدة 10 ساعات عند درجة الصفر المئوي في مرحلة ضربات القلب، ولا يؤدي التعرض لدرجة حرارة ثابتة في المراحل 27 الى 49 ساعة بعد الاخصاب الى اختلافات في نسب البقاء .

المواد وطرائق العمل :

أُجريَت الدراسةُ الحاليةُ في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد بالتعاون مع كل من مختبرات مركز علوم الحياة /جامعة النهرين ومفقس الرحمن الأهلي/ قضاء المدائن ومزرعة الصادق الخاصة لإنتاج الأسماك / قضاء المدائن للمدة من شهر آذار 2006 حتى شهر تشرين الثاني 2007. اذ أُجريت فيها سلسلةٌ من التجارب العملية اشتملت على اختبار أهم العوامل المؤثرة في عملية حفظ أجنة اسماك الكارب الاعتيادي Cyprinus carpio بطريقةِ التجميدِ العميق Cryopreservation. ولمعرفة هذه النفاذية بشكل ملموس تم استخدام طريقة التغير في الحجم (Shrink/Swell) للجنين وذلك بتعريضهِ لإحدى المواد الحافظة الثلاث و بتراكيز ومدد مختلفة لحساب مدة الانكماش الحاصلة له نتيجة خروج الماء Dehydration منه ومن ثم استعادة الشكل الأصلي له بعد ذلك. حسب طرائق [10,9] استخدم مجهر مركب نوع Olympus 1200 ياباني الصنع ،مزود بكاميرة فيديو نوع Kodak,1310 صينية الصنع.

حددت ثلاث مراحل تكوينية من اجنة اسماك الكارب الاعتيادي، وتم تعريض كل منها الى الانزيمات المستخدمة في الدراسة الحالية لمدة 15 دقيقة

تجميد الأجنة

استخدمت 10 أجنة من اسماك الكارب الاعتيادي لكل معاملة، اذ تمت تعبئة الاجنة المعاملة بالمواد الحافظة لوحدها او المعاملة بالمواد الحافظة مع الانزيمات في اقماع بلاستيكية مخروطية الشكل Eppendrof tubs ذات سدادات محكمة في درجة حرارة 24 م°, ثم نقلت الى محل تبريد للتحكم في تدرج الحرارة (ثلاجة يمكن التحكم في درجة حرارة المادة المراد حفظها من خلال رفوف متباعدة بقياسات ثابتة نـــــوع Gram Model KF 355 Denmark، اذ تم تخفيض درجة الحرارة تدريجياً الى 15 م° لمدة 20 دقيقة، ثم خفضت الى5 م° لمدة 15 دقيقة. استمر كذلك خفض درجة الحرارة تدريجياً الى -2 م° (باستخدام جهاز التجميد العميق المبرمج نـوع (Forma Scientific Model 1771 U.S.A وصولا لغاية -8 م° لمدة 15 دقيقة ، ثم الانتقال الى الدرجة الحرارية -35 م° والبقاء لمدة 10 دقائق،

7.3 الإسالة Thawing

تمَ رفعُ الأجنةِ من النتروجين السائل (-35 م°) بوساطة ملاقط خاصة الى بخار ذلك النتروجين (- 8 م°) باستخدام رفوف متباعدة لإسالتها بصورة تدريجية و بسرع كبيرة، وذلكَ تحاشياً لتكوين البلورات الثلجية، ومن ثم تم غمرها في حمامٍ مائي بدرجة حرارة 35 م° لمدة دقيقة ونصف، واخيراً تم غسل الاجنة بمحلول رنجر ثلاث مرات للتأكد من خلوها من المادة الحافظة والانزيم ومن ثم فحصت تحت المجهر.

التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم استخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Random Desingn (CRD) لايجاد الفروق المعنوية لتجارب متعددة العوامل Factorial ، كذلك اجري اختبار دنكن Dunkan لاختبار معنوية الفروق بين متوسطات القيم المقاسة، وتم اجراء التحليل الاحصائي باستخدام البرنامج الاحصائي الجاهزSPSS (العقيلي والشايب، 1998).

النتائج:

قياس مدة الانكماش Shrinkage period measurement

سُجّلت أطول مدة انكماش للأجنة باستخدام المواد الحافظة من دون الانزيمات في المرحلة التكوينية المعيدة Gastrula باستعمال المادة الحافـــظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز15 % بمدة 67 .119 دقيقة، وسجلت اقل مدة انكماش باستخدام المادة الحافظة لوحدها ايضا عند معاملة الأجنة بالميثانول بتركيز5% عند ظهور العيون بنحو 5 .1 دقيقة(جدول1). اماعند معاملة الاجنة بالمواد الحافظة والانزيمات معا فقد وصلت مدة الانكماش الأطول الى36.67 دقيقة في مرحلة ضربات القلب Heart beat باستخدام انزيم التربسين والمادة الحافظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز15%وبمدة تعرض15 دقيقة (جدول2).، في حين بلغت اقل مدة انكماش 3.33 دقائق عند معاملتها بإنزيم البرونيز والمادة الحافظة ثنائي مثيل الكبريت بتركيز5%وبمدة تعرض 5 دقائق في أثناء مرحلة المعيدة (جدول3).

جدول (1) : مدة انكماش الاجنة (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة لوحدها وبتراكيز مختلفة

التركيز %	المادة الحافظة	المراحل التكوينية		
		المعيدة	ضربات القلب	ظهور العيون
5	ثنائي مثيل الكبريت	30.33(±2.51) aA	4.33(±0.57) bB	32.33(±0.57) aA
	الميثانول	1.33(±0.58) bB	3.33(±0.57) aA	1.5(±0.86) aB
	الكليسيرول	36.33(±2.08) aA	34.33(±4.04) aA	34.67(±2.08) aA
10	ثنائي مثيل الكبريت	74.67(±4.51) aA	11.67(±0.57) cC	55.00(±5.00) bB
	الميثانول	10.67(±0.57) aA	10.33(±0.58) aA	10.33(±1.52) aA
	الكليسيرول	95.00(±6.00) aA	28.33(±4.51) cC	40.67(±3.05) bB
15	ثنائي مثيل الكبريت	119.67(±7.51) aA	15.33(±0.57) cC	35.66(±4.5) bB
	الميثانول	29.67(±2.52) aA	7.33(±0.58) cC	22.33(±2.51) bB
	الكليسيرول	صفر	صفر	صفر

*الحروف الصغيرة للمقارنة بين التراكيز للمواد الحافظة (في الصف الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P.
*الحروف الكبيرة للمقارنة بين المواد الحافظة عند كل مرحلة (في العمود الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P.

جدول (2) : مدة انكماش الاجنة (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم التربسين بمدد تعرض مختلفة في مرحلة ضربات القلب

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10دقائق	15دقيقة
ثنائي مثيل الكبريت	%5	6.00 (±0.57) aC	4.33 (±0.33) bC	6.33 (±0.33) aC
	%10	9.67 (± 0.88) bB	11.67 (± 0.33) abB	12.00 (±0.57) aB
	%15	27.00(±0.57) bA	26.67(±0.88) bA	36.67(±0.66) aA
الميثانول	%5	6.67 (±0.33) cB	11.67 (±0.33) bA	14.33 (±0.88) aA
	%10	7.33 (±0.33) cB	10.66 (±0.33) bA	12.67 (±0.33) aA
	%15	11.33 (±0.33) aA	6.67 (±0.33) cB	9.33 (±0.33) bB
الكليسيرول	%5	17.33 (±0.33) bA	18.33 (±0.33) bA	22.33 (±0.66) aA
	%10	14.00 (±0.66) aB	12.33 (±0.33) bB	15.00 (±0.57) aB
	%15	صفر	صفر	صفر

*الحروف الصغيرة للمقارنة بين التراكيز للمواد الحافظة (في الصف الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P .
*الحروف الكبيرة للمقارنة بين المواد الحافظة عند كل مرحلة (في العمود الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P.

جدول (3) : مدة انكماش الاجنة (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم البرونيز بمدد تعرض مختلفة في مرحلة المعيدة

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10 دقائق	15دقيقة
ثنائي مثيل الكبريت	%5	3.33 (±0.33) cC	4.67 (±0.33) bC	6.66 (±0.33) aC
	%10	10.33 (±0.33) cB	17.67 (±0.33) bB	27.00 (±0.57) aB
	%15	14.66 (±0.33) cA	27.66 (±0.33) bA	36.66 (±0.33) aA
الميثانول	%5	6.33 (±0.33) bB	7.66 (±0.33) bA	14.33 (±1.45) aA
	%10	6.33 (±0.33) bB	6.33 (±0.33) bA	8.00 (±0.57) aB
	%15	8.00 (±0.57) aA	7.00 (±0.57) aA	6.66 (±0.33) aB
الكليسيرول	%5	11.66 (±0.33) cB	16.33 (±0.33) bA	20.33 (±0.88) aA
	%10	16.66 (±0.88) aA	10.33 (±0.33) cB	13.33 (±0.88) bB
	%15	صفر	صفر	صفر

*الحروف الصغيرة للمقارنة بين التراكيز للمواد الحافظة (في الصف الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥P .

نسبة البقاء Survival ratio

سجّلت افضل نسبة بقاء عند المعاملة بأنزيم البرونيز والمادة الحافظة الميثانول بتركيز 5% وبمدة تعرض 5 دقائق في مرحلة ظهور العيون Eye stage إذ بلغت 84.67%(جدول4)، اما أقل نسبة بقاء فقد بلغت 20.33% وتمثلت في مرحلة المعيدة باستخدام انزيم التربسين والمادة الحافظة الكليسيرول بتركيز10% وبمدة تعرض 10 دقائق (جدول5)

جدول (4): نسبة بقاء الاجنة (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم البرونيز بمدد تعرض مختلفة في مرحلة ظهور العيون

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10دقائق	15 دقيقة	مجموعة السيطرة
ثنائي مثيل الكبريت	%5	61.00(±0.57 bB)	65.33(±0.33 aA)	50.33(±1.45 cB)	88.67(±2.33)
	%10	65.67(±0.88 aA)	62.00(±1.15 bA)	56.67(±0.88 cA)	
	%15	56.33(±1.20 bC)	66.00(±1.73 aA)	60.33(±1.45 bA)	
الميثانول	%5	**84.67**(±2.60 aA)	71.00(±0.57 bA)	70.66(±0.33 bA)	
	%10	74.67(±0.33 aB)	70.67(±1.45 aA)	70.33(±1.76 aA)	
	%15	56.67(±0.88 bC)	66.00(±1.15 aB)	50.33(±2.02 cB)	
الكليسيرول	%5	32.67(±1.45 bB)	45.67(±3.48 aA)	29.00(±0.57 bA)	
	%10	40.33(±1.45 aA)	40.33(±0.33 aA)	32.33(±1.20 bA)	
	%15	صفر	صفر	صفر	

جدول (5) : نسبة بقاء الاجنة (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم التربسين بمدد تعرض مختلفة في مرحلة المعيدة

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10دقائق	15دقيقة	مجموعة السيطرة
ثنائي مثيل الكبريت	%5	58.0 (±1.0 aB)	55.0 (±2.88 aB)	41.67(±0.88) bC	82.4 (±1.45)
	%10	64.6 (±2.40 bA)	74.33 (±1.20) aA	65.0 (±0.57) bA	
	%15	41.0 (±0.57) cC	49.67 (±0.88) bB	60.0 (±0.57) aB	
الميثانول	%5	74.0 (±0.57) aA	74.33 (±1.20) aA	49.0 (057±) bB	
	%10	64.67 (±0.88) aB	49.67 (±0.88) cB	60.33 (±1.45) bA	
	%15	49.67 (±0.88) aC	40.33 (±1.45) bC	49.0 (±0.57) aB	
الكليسيرول	%5	49.67 (±145) aA	49.33 (±0.33) aA	40.33 (±0.88) bA	
	%10	24.33 (±1.20) aB	**20.33** (±0.88) bB	24.67 (±0.88) aB	
	%15	صفر	صفر	صفر	

*الحروف الكبيرة للمقارنة بين عدد البقاء بأستخدام المواد الحافظة والتربسين ، المختلفة تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$

نسبة الفقس Hatching ratio

أظهرت نتائجُ الدراسة الحالية ان النسبة العالية للفقس قبل التجميد عند معاملة الاجنة بانزيم البرونيز والمادة الحافظة الميثانول معاً بتركيز 5 % وبمدة تعرض 10 دقائق إذ بلغت نسبتها 77.33% في مرحلة ظهور العيون (جدول6). فيما سجَّلت الأجنة في أثناء مرحلة المعيدة قبل التجميد أقل نسبة فقس 24.67% بعد معاملتها بانزيم التربسين والتركيز 10% من المادة الحافظة الكليسيرول وبتعرض لمدة 15 دقيقة(جدول7).

جدول (6) : نسبة فقس الاجنة قبل التجميد (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم االبرونيز بمدد تعرض مختلفة في مرحلة ظهور العيون

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10 دقائق	15 دقيقة	مجموعة السيطرة
ثنائي مثيل الكبريت	%5	(3.17±)60.33 cB	(1.15±)70.0 bB	(2.02±)69.66 bB	±90.0 (1.15
	%10	(0.88±)61.66 cB	1.45±)70.33 (bB	(0.33±)50.33 dC	
	%15	(0.66±)50.66 cC	(0.57±)55.0 bC	(1.45±)42.33 dD	
الميثانول	%5	(0.88±)71.66 cC	0.33±)**77.33** (bB	(2.02±)70.33 cB	
	%10	(0.88±)75.33 bB	1.45±)70.33 (cC	(0.57±)65.00 dBC	
	%15	(0.57±)70.0 bC	0.66±)60.66 (dC	(3.17±)60.33 cC	
الكليسيرول	%5	(0.33±)44.66 bB	0.33±)40.33 (dB	(0.33±)42.33 cB	
	%10	(0.33±)33.66 cC	1.45±)40.33 (bB	(0.57±)33.0 cC	
	%15	صفر	صفر	صفر	

*الحروف الكبيرة للمقارنة بين المواد الحافظة عند كل مرحلة (في العمود الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

جدول (7) : نسبة فقس الاجنة قبل التجميد (± الخطأ القياسي) المعاملة باستخدام المواد الحافظة وأنزيم التربسين بمدد تعرض مختلفة في مرحلة المعيدة

المادة الحافظة	التعرض / التركيز	5 دقائق	10 دقائق	15 دقيقة	مجموعة السيطرة
ثنائي مثيل الكبريت	5%	(2.02±)40.33 bB	(1.73±)57.0 aC	(1.45±)40.33 bB	(0.63±)75.6 aA
	%10	(1.45±)42.33 bB	(0.33±)62.66 aB	(1.45±)42.33 bA	
	%15	(2.33±)40.66 bB	(0.66±)40.66 bD	(1.45±)37.33 cC	
الميثانول	5%	(1.45±)74.66 aA	(0.88±)75.33 aA	(2.02±)70.66 aA	(0.63±)75.6 aA
	%10	(3.17±)65.66 bB	(3.17±)70.33 aA	(1.45±)70.33 aA	
	%15	(1.45±)50.33 bC	(2.02±)50.33 bB	(2.02±)40.33 bB	
الكليسيرول	5%	(1.45±)40.33 bB	(0.33±)40.33 bB	(0.33±)37.33 bB	(0.63±)75.6 aA
	%10	(2.7±)43.0 bB	(2.02±)33.33 cC	(2.60±)24.67 cC	
	%15	صفر	صفر	صفر	

*الحروف الكبيرة للمقارنة بين المواد الحافظة عند كل مرحلة (في العمود الواحد) والمختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

المناقشة :

تختلفُ حساسية للتجميد الأجنة باختلاف عوامل عدة منها النوع والمرحلة الجنينية ومدة التعرض للمواد الحافظة ونوعها وتركيزها[2] ، فللمرحلة العمرية أهمية في نجاح الحفظ بالتجميد، إذ إن معظم الاختلافات في حساسية التجميد المرتبطة بالمرحلة التكوينية للجنين ربما تكون مرتبطة بالتغيرات في أنواع الخلايا وكذلك بميكانيكية إصلاح الضرر والتفاعلات الأنزيمية في المراحل التكوينية المختلفة [11] ، بينت النتائجُ الخاصة بنسبةِ البقاءِ في المراحل الجنينية المختلفة ان اعلى نسبة بقاء قد سُجّلت في مرحلةِ ضربات القلب ومن ثم مرحلة ظهور العيون وأخيراً مرحلة المعيدة على التوالي اذ تراوحت النسبة بين 20 الى 84% ويعودُ السببُ في تدني الحد الأدنى الى حساسية التجميدِ التي ترتبطُ بالمرحلةِ الجنينية ونوع وتركيز المادة الحافظة ومدة التعرض لها [12]. أوضحَ آدم وجماعته [13] إن نسبة الهلاك غالباً ما تتراوح بـــين 20 الى 80% وان معدل البقاء هو 50 الى 60 % في الأجنة المعرضة لعمليات الحفظ . وإن نسبة البقاء تبدو اعلى في المراحل المتوسطة من نمو الجنين، و ذكر زهانك وجماعته [3] إن أفضل النتائج في معدلات البقاء قد تم ألحصول عليها في المراحل الوسطية Intermediate من التكوين الجنيني الواقعة بين المعيدة المتأخرة ومرحلة ضربات القلب. و كذلك في مرحلة ظهور الذنب في الكارب العادي [9]، ومرحلة ظهور العيون في التراوت القزحي [14]، ومرحلة ضربات القلب فـي الزيبرا [2] إذ غالباً ما يحصل تكسر في الجنين خلال المراحل

الجنينية المبكرة بينما تزداد مكونات الجنين ومنها كمية المح والقطرات الدهنية في المراحل المتأخرة [7]. لاحظ [15]في دراستهما إن المراحل المبكرة من التكوين الجنيني حساسة جدا للتجميد. كما لوحظ بإن الزيادة في نسبة البقاء مع تقدم المراحل التكوينية للاجنة ترتبط بتزايد عدد الخلايا وتشابه حجمها في المراحل المتأخرة، والذي من شانه ان يزيد من قدرة تحمل الجنين لصدمة التجميد بالقياس إلى المراحل المبكرة التي تكون فيها الخلايا قليلة العدد وكبيرة الحجم [16]

انَ من الاسبابِ الأخرى لهذا الاختلاف هو إن المادة الحافظة تكون ذات نفاذية اكبر في مرحلة ما بعد التويتة وذلك بسبب ازدياد النفوذية مع تقدم المرحلة الجنينية [10] ومن ثم فان تأثير المادة الحافظة لا يعتمد على خصائصها الكيميائية فقط بل يعتمد على المرحلة الجنينية أيضا [17].

المصادر:

1. Cocero, M.J.; Lopez, A.; Barragan M.and Picazo, R. 1996. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. Cryobiology,33: 502-507.

2. Zhang ,T.; Rawson ,D.and Morris, G. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). Aqua. Living Resource, 145-153.

3. Zhang, T.; Liu, X. and Rawson, D. 2003. Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos . Theriogenology, 59(7): 1545-56.

4. Liu,X; Zhang,T. and Rawson,D. 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. Cryoletters, 19: 309-318.

5. Lubzens, E. ; Pekarsy, I. and Magnus, Y. 2001.Term and prospects for long term storage of teleost ova and embryos . Proceedings of the conference of – IIR-Commission-C2,-Bordeaux, Colloquium- Refrigeration and Aquaculture Froid-et- Aquaculture – Colloque -de- 1996: 419-501.Abs.

6. Liu, X.; Zhang, T. and Rawson, D. 1999. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Cryobiology,39 :236-242.

7. Magyary, I.; Urbanyi, B. and Horvath,L.1996.Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm I.The importance of oxygen supply Appl. Ichtyol.,12:113-115.

8. Chao, N.H.; Chen, Y.R.; Hsu, H.W.; Tseng, F.S. and Lin, T.T. 1997. Pretreatment and Cryopreservation of zebrafish embryos. Cryobiology, 35 (4): 340P.

9. Zhang, X.; Zhao, L.; Hua, T. and Zhu, H. 1989.Astudy on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) embryos. Cryoletters, 10(5) :271-278.

10. Hagedorn,M.;Hsu,E.;Kleinhans,F. and Wildt, D.1997.New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation. Cryobiology,34:335-342.

11. Delgado,M.;Valdez,J.; Akira,M. 2004. Sesitivity to chilling of medaka (*Oryzias latipes*) embryos at various developmental stages. Theriogenology, 69 : 1-11.

12. Zhang, T. And Rawson,D. 1995. Studies on chilling sensitivity of zebra fish (*Brachydanio rerio*) embryos. Cryobiology, 37:239-246.

13. Adam, M.; Rana, k.j. and McAndrew, J. 1995. Effect of cryoprotectant on activity of selected enzymes in fish embryo .Cryobiology, 32: 92-104.

14. Haga, Y. 1982. On the sub zero temperature preservationof fertilized eggs of rainbow trout .Bull Jpn Soc Sci fish 48:1569-1572.In Delgado, M.;Valdez,J.;Akira,M.2004.Sesitivit yto chilling of medaka (*Oryzias latipes*)embryos at various developmental stages . Theriogenology, 69 : 1-11.

liquid nitrogen vapour. J.Reprod. Fertil., 76:401-408

17. Dinnyes, A.; Urbanyi, B.;Baranyai,B. and Magyary,I. 1998.Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different development stages in the presence or absence of cryoprotectant.Theriogenology,50:1-13P

15. Schneider, U. and Mazur, P. 1984. Osmotic consequences of Cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen thawed embryos. Theriogenology, 21: 68-78.

16. Szell A. and Shelton, J. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in

Effect of developmental stage in cryopreservation of Carp fish *Cyprinus carpio* L.

Mohammad Abdul-Hadi Gali* ***Muhsin Jawad Kadhim**** ***Abdul-mutalib Jasim Hammadi*****

*Dep. of Bio. Collage of Science for women, Baghdad Uni.
**Fish Dep. Ministry of Research and technology
***College of Veterinary Medicine / Baghdad University.

Abstract:

A total of 60 specimens of common carp *Cyprinus carpio* L. (40 male, 20 female) were using in present study, ranges between 2 to 5 years, 2 to 5 kg. in total weight for male and 5 to 8 kg. in weight for female. Then preparing the fish for propagation and gain the sex products.

A series of experimental processes were conducted to determine the effect of some entrant factors in the cryopreservation of carp embryos, one of these factors was Effect of developmental stage in cryopreservation of Carp fish ***Cyprinus carpio* L .** by measurement of Shrinkage period ;Survival ratio and Hatching ratio.