تأثير المخففات وموانع التجميد في الصفات الحيوية لمني اسماك الكارب المحفوظ بالتجميد العميق

عباس حسين غافل
الكلية التقنية / المسيب

الخلاصة :

أجري البحث لدراسة تأثير ستة مخففات تمثلت بمخفف الكركورا المطور والمني الصناعي ومخفف الكركورا والوسط غير المحرك والمخفف المحتوي على قاعدة سكرية (كلوكوز + ملح الطعام + ثنائي كربونات الصوديوم) والمخفف المحتوي على قاعدة سكرية (كلوكوز + Tris) وثلاثة مواد حافظة ومانعة للتبلور وهي Dimethyl sulfa oxide (DMSO) والميثانول والجليسيرول في الصفات الحيوية للمني وتمثل بالاتي نسبة الحركة الجماعية للنطف ومدة حيوية الحركة الجماعية للنطف /ثانية مدة الحركة الفردية للنطف /ثانية ودرجة الأس الهيدروجيني للمني وحجم النطف المرصوصة وإعداد النطف في المني المخلوط بعد الجمع من ذكور معروفة الصفات الوراثية ومن قطيع التكاثر المعد للتلقيح الاصطناعي في موسم التكاثر في الاشهر آذار ونيسان ومايس لعام 2008 في مفقس الفرات في محافظة بابل. خفف المني بنسبة 1 : 10 حجم كلي للمخفف والمادة الحافظة بتركيز 10 % وتمت المعادلة لمدة (10 دقيقة) ثم عبئ المني المخفف في قصبات بلاستيكية حجم (0.25 ملم^3) تم إغلاق النهاية المفتوحة بمادة بولي فينايل الكحول وتم الحفظ بالتجميد العميق على درجة – 196 ْم باستعمال النتروجين السائل ثم جري الفحص للصفات الحيوية للمني شهريا للأشهر من السادس الى العاشر بعد الإذابة في حمام مائي على درجة 35 ْم لمدة 110 ثانية . أتضح من نتائج البحث الحالية ان هنالك تأثير معنويا للمخففات وموانع التجميد في الصفات الحيوية للمني المحفوظ وأن أفضل نسبة حركة جماعية للنطف (التي هي احد أهم المؤشرات المدروسة في قابلية الخصوبة للنطف) بعد الإذابة والتنشيط عند استعمال المخفف الأول كركورا المطور والمخفف الثاني البلازما المنوية الصناعية ، (54.44, 52.77, 47.22, 41.11, 33.33) (55.00, 51.11, 47.22, 41.66, 36.11) % على التوالي ولجميع اشهر الدراسة من الاسادس الى العاشر وان أفضل نتائج في الصفات الحيوية المدروسة قد تحققت عند استعمال (DMSO) كمانع تجميد (54.44, 52.50, 48.61, 41.66, 36.11) % على التوالي بينما أفضل النتائج تحققت عند استعمال الميثانول والمخففات المحتوية على قواعد سكرية (كلوكوز) (51.11, 49.16, 45.27, 40.55, 33.61) % ولجميع الاشهر و DMSO مع المخففات المحتوية على الأملاح والايونات وامكانية حفظ المني بنجاح بالتجميد العميق على – 196 ْم وبأستعمال مانع التجميد DMSO لتحسين وتطوير تقانات التكثير الاصطناعي لاسماك الكارب العادي .

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 + $NaHco_3$ Glucose + Tris An three cryoprotectant agents (imethyl sulfa oxide (DMSO) ME_2SO , Methanol , Glycerol) on the spermatological property which are Total motility. Total viability(Duration of motility) /second Individual duration /second pH of seminal plasma Packed sperm volume (PCV)% Number of sperm x $10^9/ml^3$ of seminal plasma of pooled semen collected from proven selected brood stock males hormonally induce stripping at reproduction season (march , April ,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 (PVA) and preserved by Cryopreservation at – 196 ºc in liquid nitrogen (LN_2) tested monthly for spermatological property after thawing in water bath at 35 ºc for 110 second. This study showed a significant influence of extender and cryogen on the spermatological property of preserved semen , the optimum post thawing motility % after activation which is one of key that influence on fertilizing ability of sperm (which is the most spermatological property) when used the modified kurokura and artificial seminal plasma (54.44

ISSN 2072-3875

,52.77 ,47.22 ,41.11 ,33.33) (55.00 ,51.11 ,47.22 ,41.66 ,36.11)% respectively and the optimum result when used DMSO as cryoprotectant with extender contain salt and ions (54.44 ,52.50 ,48.61 ,41.66 ,36.11)% respectively while the optimum result when used the methanol with extender contain sugar – base (glucose) (51.11 ,49.16 ,45.27 40.55 ,30.61)% respectively It is conclude from this study that long term cry preservation at -196 ºc 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 and sugar extender and methanol for long term cryo presertion and improved artificial propagation in common carp fish's .

المقدمـــة

تعد الأسماك من أهم المصادر الغذائيـة وهـي تسهم في تعزيز الأمن الغذائي بتوفيرها مصادر غذائية غنية بالبروتينات والأحماض الدهنية الأساسية التي لا يستطيع الجسم تصنيعها ويكون مصدرها لحوم الأسماك مثل حامضي 1- Lino lenic acid و2- Linoleic acid وهي تدخل ضمن الوظائف الفسلجية للجسم مثل تصنيع هرمونات (البروستا كلاندين) والفيتامينات الذائبة بالـدهون مثـل فيتامين D وقد حققت اسماك الكارب العادي معدلات إنتاج عالية (الرديني ; 2002) ومقاومة واضحة للتغيرات في الظروف البيئية (الشماع ;1999) وسهولـة استزراعهـا (دحام وجماعتـه ; 2005) والنضـج الجنسـي المبكر (Akcay et al; 2004) وتقبلها من قبـل المستهـلك العراقـي (Ashwood-Smith ;1986) ، كـل هـذه الصفـات نموذجيـه لأسمـاك الكـارب (دحـام وجماعته ; 2005) وأجريت البحـوث في عمليات التلقيح الاصطناعي وفـي مجال الانتخاب للأسماك تحت ظروف التكاثر الطبيعي والاصطناعي (Gage et al ;1995 و1997 ; Stokley et al)، وقـد اهتمت العديد من دول العالم بإيجاد تقانات ووسائل جديدة لتطوير ثروتها السمكية وبشكل خاص تلك التي تتعلق بالتحسين الو راثي وتقليل كلف الإنتاج، ومن هذه التقانات حفظ المني للأسماك بطريقة التجميد العميق (Cryopreservation) علـى درجـات حـرارة تصـل – 79ْم باستعمـال الثلـج الجـاف والتجميـد العميـق على درجه حرارة – 196ْم بأستعمال النيتروجين السائل هي الأكثر شيوعا في الوقت الحاضر ولهذه التقانة دور مهم في حل الكثير من المشاكـل التـي تواجـه التكثير الاصطناعي ونجاحه في جمع النواتج الجنسية من الذكـور والإناث عندمـا تكـون فـي أماكن متباعدة عن بعضها (Suquet et al ; 1997) أو قد لا تكون متوفرة معا في الوقت نفسه (Bromage;1995) وكذلك التغلب على مشكلة إنتاج كميات قليلة من المني لبعض الأسماك (Horvath and Urbanyi; 2000 و1995 ; Ohta et al) أو الاستفـادة من المني عندما يكون عالي الجودة بحل مشـكلة ما يسمى شيخوخة النطف التي ينتـج عنها انخفـاض نوعيـة المني (Rana et al ;1990) فضلا عن أن هذه التقانات تقلل كلفة الاحتفاظ بالذكور على مدار ألسنة (Chao and Liao; 2001) وبذلك تقتصر الكلفة بالاحتفاظ بالإناث فقط فضلا عن استعمالها في البرامج البحثيـة وخصوصـا عنـد إنتـاج الهجـن والاحتفـاظ بالصفـات المرغوبة وتطوير صفات أخـرى (Horton and Ott ;1976) وكـذلك تعمل هـذه التقانه على تجنـب أثـار الإمراض التي تحـدث بشكـل مفاجـئ أو الحـوادث مثـل التسـرب النفطي (Cosson; 1996) ، وهنالك عوامـل تتداخـل في إنجـاح هـذه التقانه منهـا نوعيـة المني المستعملة في التجميـد (Ashwood-Smith ;1980; Billard; 1992) والمخـفف الملائـم ونسبـه التخفيـف (Herraez et al ;1993) والمـواد ألحافظة ونسبها (Duncan; 1955) وطريقة ومعدل التبريد والإسالة (Rana and Gilmour; 1996) وكان الهدف من الدراسة معرفة تأثير بعض المخففات (Extender) المستعملة لحفظ مني اسماك الكارب العادي وتقييم بعض المواد الحافظة (Cryogen) النافذة وغير النافذة لحفظ نطف اسماك الكارب العادي في الصفات الحيوية للنطف وكفائتة وفعاليته لإجراء تقانات التكثير الاصطناعي .

المواد وطرائق العمل

أجري البحث في مفقس شركه الفرات المحدودة لإنتاج الأسماك الذي يقع شمال مركز محافظة بابل حوالي 5 كم، وهو متخصص بإنتاج الاصبعيات لأسماك الكارب العادي بحدود 4-5 مليون إصبعيه سنويا .

1- جمـع المنـي بعـد وضـع الذكـور المعدة للجمـع فـي أحواض خاصة وتـم تحفيـزها هرمونيـا باستعمـال مستخلص الغـدة النخاميـة حيث طحنه خلاصه الغدة النخامية بهاون خزفي جـاف وذوبت بالمحلـول الفسلجي (7 غم كلوريد الصوديوم في 1 لتر ماء) وبعد تسجيل أوزان الذكور المختـارة والمعلمة مـن كـل وجبه بوساطة ميزان MP 1364 وعلى ضوء الوزن حسبت الجرعة اللازمة لكل ذكر حيث 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

ISSN 2072-3875

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 ، إما الضغط على منطقه البطن فيكون بين الزعنفة البطنية والحوضية باتجاه الفتحة التناسلية حيث يكون الجمع بإناء (بيكر معلم وخاص) لكل ذكر حسب الأوزان أو الأعمار (Stokley et al; 1997) . 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 .

2- دراسة مواصفات النطف

لغرض 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) . أجريت 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 1- نسبه حركه النطف وحساب مده الفعالية 2- حيوية الحركة الجماعية 3- الحركة الفردية للنطف 4- قياس قيمه الأس الهيدروجيني pH 5- تركيز النطف (الكثافة) 6- قياس إعداد النطف $\times 10^9$ / 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 (Rottmann et al ;1991) بعد ذلك تم تخفيف المني الطري بنسبة 10:1، ولتجنب حدوث الصدمة الازموزية (Cosson and Linhart; 1996) استعملت في التجربة ثلاثة مواد حافظة هي 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 فتره 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 (Magyary et al ;1996) أستعمل البرنامج الإحصائي SAS (2001) في تحليل تأثير العوامل المدروسة للمخففات وموانع التجميد في الصفات المختلفة ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار دنكن (1955) متعدد الحدود . استعملت في هذه الدراسة ستة مخففات هي 1- كركورا المطور 2- مخفف البلازما المنوية 3- مخفف الكركورا 4- الوسط غير المحرك 5- الوسط المحتوي على كلوكوز + ملح الطعام + ثنائي كاربونات الصوديوم 6- كلوكوز + Tris .

النتائج والمناقشة : 1- نسبة الحركة الجماعية للنطف:

يتضمن الجدول (1) ان هنالك تباين عالي المعنوية ($P<0.01$) للمخففات في نسبة الحركة الجماعية للشهر السادس والسابع والثامن والتاسع من أشهر الدراسة بينما لم تتأثر هذه الصفة معنويا بالمخففات للشهر العاشر من التجميد العميق وقد حقق المخفف الأول MK أعلى النسب بعد الإسالة (54.44, 52.77, 41.11,47.22, 33.33) % ولجميع أشهر الدراسة من السادس الى العاشر، ان سبب تفوق هذا المخفف ربما يعود الى ملائمته لنطف هذا النوع من الأسماك ، إذ أنه يوفر ضغطا ازموزيا مساويا الى الضغط الازموزي للمني ويعتقد (Morisawa and Suzuki; 1980) ان تساوى الضغط الازموزي لهذا المخفف مع الضغط الازموزي للمني يؤدى دورا هاما في إنجاح التجميد من خلال إبقاءه على النطف غير متحركة دون ان تستنزف طاقتها المخزونة (Cosson and Linhart; 1996) يتبين إن لموانع التجميد تأثيرا عالي المعنوية ($P<0.01$) في نسبة الحركة الجماعية للنطف بعد الإسالة من التجميد العميق وكان DMSO قد حقق أعلى النسب (36.11 54.44, 52.50, 48.61, 41.66,) % ولجميع أشهر الدراسة .

ISSN 2072-3875

الجدول (1) تاثير المخففات وموانع التجميد في نسبة الحركة الجماعية للنطف Motility % لاسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 54.44	A 52.77	A 47.22	A 41.11	A 33.33
2	A 55.00	A 51.11	A 47.22	A 41.66	A 36.11
3	A 52.77	A 51.66	A 47.22	A 42.22	A 36.11
4	B 44.44	B 42.77	B 38.88	A 42.22	A 32.33
5	A 54.44	A 52.22	A 47.22	B 34.44	A 35.00
6	A 52.77	A 50.55	A 45.55	A 40.55	A 32.77
مستوى المعنوية	**	**	**	**	NS
Cryo gene					
DMSO	A 54.44	A 52.50	A 48.61	A 41.66	A 36.11
MeoH	B 51.11	B 49.16	B 45.27	AB 40.55	B 33.61
Glycerol	B 51.38	B 48.88	C 42.77	B 38.05	B 33.11
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

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

1- حيوية الحركة الجماعية للنطف

و اتضح من الجدول (2) أن للمخففات تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) على المدة الزمنية لإبقـاء الحركة الجماعية لحيامن الكارب العادي ولجميع أشهر الدراسة ، كان للمخفـف الخامـس الذي يحتوى على كلوكوز كقاعدة سكرية أعلى المدد الزمنية (241.11, 228.88, 208.88, 188.88, 168.88) ثانية على التوالي ولجميع أشهر الدراسة ، وهذا ما يتفق مع ما توصل إليه Akcay et al; (2004) ، إذ كانت مدة الحيوية 250 ثانية عند استعماله المخفف المحتوى على {كلوكوز+ ملح الطعام + بيكاربونات الصوديوم} وهو نفس المخفف المستعمـل فـي هذه البحث ، وتبين أن لموانع التجميد تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في حيوية النطف وقد حقق DMSO أقصى المدد الزمنية (237.77, 226.38, 210.00, 195.00, 173.61) ثانية على التوالي لجميع الأشهر .

الجدول (2) تاثير المخففات وموانع التجميد في حيوية الحركة الجماعة للنطف /ثانية Duration لنطف أسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 240.00	A 225.00	A 213.33	A 208.88	A 180.00
2	A 237.77	A 226.66	A 207.77	AB 200.00	A 181.66
3	B 218.88	B 206.66	C 188.88	D 167.77	C 155.00
4	B 220.00	A 222.77	A 206.66	D 173.33	B 168.88
5	A 241.11	A 228.88	A 208.88	BC 188.88	B 168.88
6	AB 229.44	A 216.66	B 194.44	CD 180.00	C 153.33
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 237.77	A 226.38	A 210.00	A 195.00	A 173.61
MeoH	AB 231.11	AB 220.55	A 204.44	B 185.27	A 169.72
Glycerol	B 224.72	B 216.38	B 195.55	B 179.16	B 160.27
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

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

ISSN 2072-3875

2- حيوية الحركة الفردية للنطف:

أظهرت نتائج البحث الجدول رقم (3) الحالية أن للمخففات تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في حيوية الحركة الفردية للنطف ولجميع أشهر الدراسة (خمسة شهور) ، وقد تفوق المخفف الأول (M-K) في تحقيق أعلى المدد (379.44, 371.11, 341.66, 306.66, 252.22) ثانية على التوالي أن سبب التفوق ربما يعود إلى ملائمة هذا المخفف لحفظ وتجميد نطف اسماك الكارب العادي لما يحتويه من ايونات ومكونات أساسية لمنع حركة النطف إثناء التخفيف والتجميد دون ، أن يفقد النطفة طاقته المخزونة للحركة مما أدى إلى إطالة مدة الحركة أن لموانع التجميد تأثيرا معنويا (P<0.01) على مدة الحيوية الفردية للنطفة ولجميع أشهر الدراسة ، وكان مانع التجميد DMSO قد حقق أقصى المدد (379.16, 352.50, 325.55, 287.77, 254.72) ثانية على التوالي ولجميع اشهر الدراسة، ويعتقد ان سبب التفوق يعود إلى سرعة نفاذ المادة عبر غشاء الخلية وسرعة تفاعله مع الدهون المفسفرة لجدار الخلية المكون من فوسفو لبد وفوسفو بروتين (Phospholipids and Phosphoproteins) ويوفر حماية للغشاء البلازمي OgierdeBoulny; (1997) .

الجدول (3) تاثير المخففات وموانع التجميد في في حيوية الحركة الفردية للنطف/ثانيةDuration Individual لنطف أسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	**A 379.44**	**A 371.11**	**A 341.66**	**A 306.66**	**A 252.22**
2	**AB 361.66**	**BC 336.66**	**BC 305.55**	**B 282.22**	**A 258.88**
3	**C 360.00**	**BC 335.55**	**BC 301.11**	**B 273.33**	**B 232.22**
4	**C 351.11**	**BC 338.33**	**C 295.55**	**C 264.44**	**B 235.55**
5	**AB 376.66**	**B 353.33**	**B 316.66**	**B 273.33**	**BC 230.55**
6	**BC 366.66**	**C 327.77**	**C 288.88**	**C 252.77**	**C 217.22**
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	**A 379.16**	**A 352.50**	**A 325.55**	**A 287.77**	**A 254.72**
MeoH	**B 363.61**	**A 346.94**	**B 310.83**	**A 280.55**	**B 234.16**
Glycerol	**B 355.00**	**B 331.94**	**C 288.33**	**B 258.05**	**B 224.44**
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

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

2- الأس الهيدروجيني pH للمني :

يتضح من نتائج البحث الحالية ان للمخففات تأثيرا معنويا (P<0-05) في هذه الصفة للشهر السادس والسابع والثامن والعاشر من أشهر الدراسة، بينما لم تتأثر هذه الصفة في الشهر التاسع بعد الإسالة من التجميد العميق ، وكان للمخفف الأول (MK) أقصى القيم (7.54, 7.41, 7.35, 7.32, 7.26) على التوالي ولجميعاشهر الدراسة ، ويعد الأس الهيدروجيني احد العوامل الهامة والمؤثرة في حياة النطف وحيويته لجميع أنواع الأسماك وهو مختلف باختلاف النوع ويكون الأس الهيدروجيني المثالي لأسماك الكارب بين 7- 8 (Duncan; 1955) . يتبين من الجدول (4) أن الأس الهيدروجيني لم يتأثر معنويا بموانع التجميد طيلة أشهر الدراسة، وقد سجل (DMSO) أعلى القيم (7.53, 7.41, 7.30,7.34, 7.22) على التوالي ولجميع أشهر الدراسة، وهذا يتفق مع ما أشار إليه الرديني (2002) من ان (DMSO) هي المادة الأكثر ملائمة لحفظ نطف اسماك الكارب العادي وجاءت أدنى القيم عند استعمال الجليسيرول ويعود السبب في ذلك الى كون الجليسيرول ساما لخلية النطفة بسبب اختراقه البطيء لها وإحداثه إجهادا ازموزيا عند ازالتة منها (Ashwood-Smith ;1986) .

ISSN 2072-3875

الجدول (4) تأثير المخففات وموانع التجميد في درجة الأس الهيدروجيني (pH) لنطف أسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 7.54	AB 7.41	AB 7.35	A 7.32	AB 7.26
2	A 7.53	AB 7.38	A 7.42	A 7.31	A 7.28
3	AB 7.47	AB 7.41	AB 7.33	A 7.27	AB 7.26
4	B 7.41	AB 7.34	B 7.26	A 7.24	AB 7.22
5	AB 7.52	A 7.44	AB 7.37	A 7.24	B 7.15
6	AB 7.48	B 7.32	B 7.28	A 7.24	B 7.15
مستوى المعنوية	*	*	*	NS	*
Cryo gene					
DMSO	A 7.53	A 7.41	A 7.34	A 7.30	A 7.22
MeoH	A 7.48	A 7.39	A 7.33	A 7.26	A 7.23
Glycerol	A 7.47	A 7.35	A 7.34	A 7.25	A 7.22
مستوى المعنوية	NS	NS	NS	NS	NS

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

3- حجم النطف المرصوصة PCV

يتبين من الجدول (5) أن للمخففات المدروسة تأثيرا معنويا ($P<0.01$) للشهر السابع والثامن والتاسع والعاشر بينما لم تتأثر هذه الصفة معنويا في الشهر السادس من الدراسة وكان للمخفف الأول MK أعلى النسب (48.55, 46.11 58.22, 53.55, 51.88,)% على التوالي ولجميع اشهر الدراسة ، ويعود السبب في ذلك إلى ملائمة هذا المخفف لما يحتويه من ايونات ومركبات لها القدرة على الارتباط بالمواد الثقيلة ذات الأثر الضار على النطف وما يحدثه من تساوي الضغط مع البلازما المنوية والذي يؤدى دوره في المحافظة على النطف (Cosson and Linhart ;1996) كان لموانع التجميد تأثيرا متباينا على حجم النطف المرصوصة ($P<0.05$) في الشهر السابع من الدراسة و ($P<0.01$) في الشهر السادس والثامن والتاسع ولم تتأثر هذه الصفة معنويا في الشهر العاشر، وقد حقق DMSO أعلى النسب (58.00, 55.16, 50.55, 45.72, 39.05) تلاه الميثانول (55.61, 52.16, 48.72, 44.11, 38.27) % على التوالي ولجميع اشهر الدراسة ، ويعتقد ان سبب تفوقة (DMSO) يعود الى محافظته على الغشاء البلازمي لخلية النطفة من خلال نفوذيته العالية لجدار الخلية وقلة سميته موازنة ببقية موانع التجميد المدروسة

ISSN 2072-3875

الجدول (5) تأثير المخففات وموانع التجميد في حجم النطف المرصوصة (PCV %) لنطف أسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 58.22	A 53.55	A 51.88	A 48.55	A 46.11
2	A 58.77	A 54.33	A 52.11	AB 45.44	B 39.66
3	A 56.44	A 55.33	AB 50.11	A 46.78	AB 42.00
4	A 56.11	B 45.77	C 41.11	C 36.33	C 34.33
5	A 57.00	A 55.11	AB 50.11	B 42.77	C 34.11
6	A 56.11	A 53.11	B 48.00	B 42.88	C 34.77
مستوى المعنوية	NS	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 58.00	A 55.16	A 50.55	A 45.72	A 39.05
MeoH	B 55.61	B 52.16	B 48.72	A 44.11	A 38.27
Glycerol	C 53.61	B 51.27	B 47.38	B 41.55	A 38.16
مستوى المعنوية	**	*	**	**	NS

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

4- التركيز (إعداد النطف 10^9x/ملم من المني)

يلاحظ من الجدول (6) ان للمخفات تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في تركيز النطف ولجميع أشهر الدراسة وكان للمخفف الأول أعلى الاعداد (5.37, 5.15, 4.97, 4.72, 4.42) على التوالي بينما كانت أوطئ الإعداد عند استعمال الوسط غير المحرك ، ويعود السبب في تفوق المخفف الاول في ذلك الى ملائمته لهذا النوع من الأسماك وهذا يتفق مع ما توصل إليه دحام وجماعية (2005) من ان تركيز النطف (1- 37) × 10^9 ملم^3 من المني يتضح من نتائج البحث أن لموانع التجميد تأثيرا عالي المعنوية (P<0.01) في إعداد النطف وكان DMSO قد حقق أعلى الإعداد حيث بلغ (3.78 5.21, 5.17, 4.61, 4.27,) تلاه الميثانول حيث بلغ (5.22, 4.75, 4.45, 4.13, 3.60) وكانت أدنى النسب عند استعمال الجليسيرول كمانع تجميد حيث بلغ (4.93, 4.63, 4.43, 3.87, 3.41) اذ يعتقد Leung (1991) إن الجليسيرول ذا سمية عالية لمعظم أنواع الأسماك وانه يسبب تغير في السيوله للغشاء البلازمي وتقلل قدرتهم في التوصيل الكهربائي وتكوين مركبات أخرى ناتجة عن تفاعله مع المواد داخل الخلية مما يسبب تدميرها (Hammersted et al ; 1990) .

الجدول(6)تأثير المخففات وموانع التجميد في إعداد النطف× 10^9 /ملم^3 من المني (التركيز) نطف أسماك الكارب العادي.

الصفات المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
Extender					
1	A 5.37	A 5.15	A 4.97	A 4.72	A 4.42
2	A 5.40	AB 4.95	B 4.71	B 4.34	B 3.73
3	AB 5.23	A 5.15	AB 4.82	AB 4.55	B 4.01
4	C 4.42	C 4.17	D 3.68	D 3.28	D 3.01
5	B 5.01	B 4.85	C 4.38	C 3.72	D 3.24
6	A 5.31	B 4.84	C 4.42	C 3.93	D 3.17
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**
Cryo gene					
DMSO	A 5.21	A 5.17	A 4.61	A 4.27	A 3.78
MeoH	A 5.22	B 4.75	B 4.45	A 4.13	B 3.60
Glycerol	B 4.93	B 4.63	B 4.43	B 3.87	C 3.41
مستوى المعنوية	**	**	**	**	**

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

ISSN 2072-3875

نستنتج من الدراسة الحالية

1- امكانية نقل مني الاسماك ذات سلالات جيدة من خارج البلد لغرض تحسين السلالات الموجودة وبارخص الاسعار .

2- تعتبر هذه التقنية من التقانات السليمة من ناحية خلوها من بعض المسببات المرضية التي قد تنقل مع الاصبعيات في حالة نقلها من خارج البلد .

3- امكانية نقل اعداد كبيرة من المني واستعمالها في نفس السنة لاحداث تغيير جذري في سلالة معينة .

المصادر :

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

الشماع ، عامر علي (1999) . الثروة السمكية في اهوار جنوب العراق وسبل حمايتها وتنميتها . مؤتمر مجالس البحث العلمي العربية ، بغداد، 63 صفحة.

دحام، حداوي محمد، نمير محمود حلمي، حازم جواد كاظم، خلود عبد الحسين.(2005) . بعض المواصفات الطبيعية للمني لسبعة انواع من الأسماك ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 18 العدد 2 : 37-43.

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

Ashwood-Smith,M.,1986.The cryopreservation of human embryos. Hum. Reprod., 1: 319-332.

Ashwood-Smith,M.1980. Low temperature preservation of cells, tissue and organ. Cited by: Suquet, et al., 2000.

Billard, R., 1992. Reprodution in rainbow trout, sex differentiation, dynamics of gametogenesis , biology and preservation of gametes. Aqua. 100: 263-298.

Billard, R., 1990. Artificial insemination in fish. In G.E.

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

Bromage, N.1995. Broodstock 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.

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

Cosson, J. and Linhart, O. 1996. Paddlefish (*Polyodon spathula*) spermatozoa; effects of potassium and PH on motiliy. Folia Zoologica (45) 361-370.

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

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 Montgomery, 2000.

Hammersted, R.; Graham, J. and J. Nalon, 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive . J. Androl. 11:73-88.

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

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

ISSN 2072-3875

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.

Leung, L. 1991. Principles of biological cryopreservation. Therio., 48:589-603.

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

Morisawa, M. and K. Suzuki, 1980. Osmolality and Potassium : Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Sci., 210:1145-1147.

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.

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

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.

Rana, K.; Muiruri, R.; McAndrew, B. and A. Gilmour, 1990. The influence of diluents, equilibration time and pre-freezing storage time on the viability of cryo preserved *Oreochromis niloticus* L. spermatozoa. Aqua. Fish. Mgmt., 21:25-30.

Rottmann, R.W., Shireman, J.V., Chapman, F.A. 1991. Determining Sexual Maturity OF Broodstock for Induced Spawning of fish SRAS Puplication No. 89,423-426 pp.

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

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

Woynarovich, E. and L. Horvath, 1980. The artificial propagation of warm-water fin fishes. a manual for Extension .FAO, Rome.183PP.

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.

ISSN 2072-3875