ميزات السائل المنوي لأسماك البني (*Barbus sharpeyi*) وقابليتها للحفظ القصير الامد بالتبريد والطويل الامد بالتجميد الفائق

عمر عادل محمد سحر احمد البياتي كامل فياض المحمدي وفاء ايرام لطيف
احمد وهبي شاكر سعد صالح مهدي شذى عبد الجبار رافد فاضل التميمي

الملخص

أجريت هذه الدراسة لغرض تسجيل بعض ميزات حيامن سمك البني (*Barbus sharpeyi*) ودراسة قابليتها للحفظ القصير الامد بالتبريد والطويل الامد بالتجميد الفائق . أستعمل السائل المنوي لعشر اسماك بالغة مصادة من بحيرات الرضوانية الاصطناعية في محافظة بغداد في أثناء موسم التكاثر الربيعي لعام **2015** وجمع السائل المنوي بطريقة المساج دون استخدام مهدئات او هرمونات . ودرست صفات السائل المنوي التي شملت الحجم وتركيز الحيامن ومدة حركتها واختبرت مدى قابليتها للحفظ بالتبريد باستخدام نوعين من المحاليل المخففه وهما محلول **Zhang and Liu** المحور ومحلول **Hank's Balanced Salt** الخالي من عنصر الكالسيوم. أضيف الميثانول كمادة حافظة ضد اضرار التجميد بنسبة **10%**مع المحلول الاول والكليسيرول بالنسبة نفسها مع المحلول الثاني في الحفظ طويل الامد بالتجميد الفائق بالنايتروجين السائل (**196°–**م) وبالأعتماد على النسب المئوية للحركة ومعدلات درجاتها تم تحديد قابلية الحفظ والبقاء واختيار الافضل من المحاليل لكل من الحفظ بالتبريد او التجميد .تراوح حجم السائل المنوي مابين **0.25 – 3** مل وبمعدل **1.61** مل , وكان ذو لون ابيض حليبي . بلغ معدل تركيز الحيامن في الملي لتر الواحد (**$9\times.955\ 10^{8}$**) . تراوحت مدة حركة الحيمن بين **20– 120** ثانية وبمعدل **56** ثانية . أظهرت النتائج امكان حفظ الحيامن بالتبريد لمدة اقصاها ثلاثة ايام باستعمال محلول **Zhang and Liu** و ستة أيام بأستعمال محلول **Hank's** غير ان المحلول الاول تفوق على الثاني في حفاظه على حيوية الحيامن أعلى بدلالة معدل درجات حركتها ومدتها. كما كانت نتائج محلول **Hank's** الحاوي على الكليسيرول بنسبة **10%** افضل من نتائج محلول **Zhang and Liu** الحاوي على الميثانول بالنسبة نفسها في قابلية الحفاظ على الحيامن بعد التجميد والأذابة .

المقدمه

تعد اسماك البني (***Barbus sharpeyi***) من ألذ انواع الاسماك ألأقتصادية في العراق وسمك البني المسكوف يعد من الأغذية التراثية المحبذة لكن اليوم اصبح من النادر العثور عليه في الاسواق المحلية وبات وجوده وبقاؤه في بيئة المياه العراقية على المحك,مما يدعو الى القلق ويحث على العمل على انقاذ هذا النوع المهم من خطر الانقراض والحفاظ عليه وتكثيره , ولعل من اهم طرائق تكثير الاسماك والحفاظ على مصادرها الوراثية هو حفظ حيامنها واستخدامها فيما بعد في التكثير الاصطناعي والدراسة وحفظ تنوع الموارد الوراثية في البيئة المائية العراقية. يعتمد التكثير الاصطناعي للأسماك بشكل اساس على تخصيب البيض بالحيامن خارجياً,ولإتمام العملية بنجاح فأنه يجب ان يكون البيض والحيامن المستعمله بنوعية جيدة ومتوفرة في الوقت ذاته والمشكلة التي تواجه التكثير الاصطناعي

دائرة البحوث الزراعية، وزارة الزراعة، بغداد،العراق .

تاريخ تسلم البحث:ت1/2016
تاريخ قبول البحث:أذار/2017

للأسماك في العراق هي عدم تزامن اطلاق البيض مع توفر الذكور المهيأة لأطلاق الحيامن . لذا فأن عمليات حفظ حيامن الاسماك المحليه سواء أكان قصير ام طويل الأمد مهم وحاسم في عمليات التكثير الأصطناعي . وقد تم تطوير العديد من طرائق حفظ الحيامن ولأنواع مختلفة من اسماك المياه العذبة و المالحة على حد سواء في دول مختلفة من العالم (12). لكن محليا" دراسات صفات السائل المنوي والحيامن على العموم قليلة واحدة منها دراسة دحام وجماعته (4) لبعض المواصفات الطبيعية للسائل المنوي لسبعة انواع من الاسماك المحلية . اما دراسة حفظ السائل المنوي بالتحديد فهي نادرة أذكرمنها دراسة البياتي وجماعته (2) في تأثير بعض المخففات في حركة حيامن اسماك الكارب ودراسة المختار وجماعته (3) للصفات الحياتية للسائل المنوي لأسماك البني وحفظه. أما الدراسة الحالية هذه فقد اتت بشكل اساس لأختبار قابلية حيامن اسماك البني في الحفظ طويل الامد بالتجميد الفائق بدرجة النيتروجين السائل (−196°م) وقصير الامد بالتبريد (4 °م) بالأضافة الى دراسة ميزات حيامنها , بهدف الحفاظ على هذا النوع من الاسماك و تنميته وضمان استخدامه بشكل مستدام .

المواد وطرائق البحث

جمع العينات ومعاملتها

صيدت الاسماك من بحيرات الرضوانيه الاصطناعية (بغداد – العراق) عشوائيا" بواسطة الشباك الخيشومية ونقلت الى احواض خزن كونكريتية للمدة (1–5 أيام) كان هذا في أثناء موسم التكاثر الربيعي للأسماك العراقيه وللمده من 23/ 3/ 2015 لغاية 5/30 / 2015 وفي درجة حرارة ماء تراوحت بين 18–22° م . تم أختيار الاسماك ذات الطول الاعلى من 25 سم لجمع السائل المنوي (جدول1), أذ تم عد طولها مؤشراً للبلوغ الجنسي حسب ما أشار اليه Coad (6). جمع السائل المنوي من السمكه بطريقة المساج والضغط الخفيف على المنطقة البطنيه لمنطقة قبل الفتحه التناسليه دون استخدام هرمونات او مهدئات ووضع في انابيب مدرجة ومعقمة . فحصت النماذج فحص اولي (اللون والكمية) وتم استبعاد العينات التي تحتوي على الملوثات مثل الدم , كما تم ترميزها وتخفيفها كتخفيف اولي بنسبة 1:1 بكل من محلولي Zhang and Liu وHank's وعلى انفراد لتلافي تأثير اي اختلاط للسائل المنوي الذي تم جمعة بالبول الذي يؤدي (أن حدث) الى فقدان حيوية الحيامن في السائل المنوي (9). نقلت في يوم الجمع نفسه الى المختبر بصناديق فلين مغطاة وحاويه على ثلج مجروش للحفاظ عليها بدرجة 4° م. أختير هذين المحلولين لأختبار مدى قابليتهما على الحفاظ على حيوية حيامن اسماك البني العراقية للأسباب المبينة ازاء كل منهما:–

1–المحلول المحور المعد من قبل لـ Zhang and Liu (13) لأنه مستعمل على نطاق واسع في حفظ حيامن اسماك الكارب بنجاح.

2–محلول Hank's Balanced Salt Solution الخالي من عنصر الكالسيوم الذي نصح به الدكتور Tiersch في كتابه (Cryopreservation in Aquatic Species) المستعمل بنجاح في حفظ حيامن اكثر من 100 نوع من اسماك المياه العذبة (12) . يبين جدول (2) يبين المواد الداخلة في تركيب المحلولين المستعملين في الدراسة وكمياتها .

جدول 1: قياسات وأوزان الاسماك.

ت	الطول الكلي للجسم (سم)	محيط الجسم (العرض)(سم)	الوزن (كغم)
1	56	29	2.5
2	55.5	26.5	2.5
3	60	31	3
4	56	28	2.5
5	50	26	1.5
6	56	29	2
7	54	31	2
8	60	34	2.5
9	63	32	2.5
10	61	34	3

جدول 2:تركيب كل من محلولي Zhang and Liu و Hank's

مخفف (Zhang, 1991)		مخفف (Hank's balanced salt solution)	
المادة	الوزن او الكمية	المادة	الوزن او الكمية
Glucose (C6H12O6)	20 غم	Glucose (C6H12O6)	5.0 غم
Sodium Chloride (NaCl)	1.5 غم	Sodium Chloride (NaCl)	4 غم
Sodium Bicarbonate (NaHCo3)	0.25 غم	Sodium Bicarbonate (NaHCo3)	0.18غم
Distilled Water	500 مل	KCl	0.2 غم
		$MgSo_4$ 7 H2O	0.1 غم
		Na2HPo4	0.04 غم
		KH2Po4	0.03 غم
		Distilled Water	500 مل

التقدير النوعي للسائل المنوي

1- فحص حركة الحيامن (المده + النسبة): تم تفعيل الحيامن لفحص الحركه باستعمال 2 مايكروليتر من السائل المنوي + 50 مايكروليتر من ماء بحيرة الرضوانيه . تم الفحص بقوة تكبير X100 وتم اعطاء النسبة المئوية للحركه التقديرات التاليه { 0= بدون حركه اي الكل ميت, 1= 10%- 20 % متحرك , 2= 30%- 40 % متحرك , 3= 50%-60 % متحرك , 4=70% - 100%متحرك} والنوعية الجيدة التي بدرجة 4 او 70% فاكثر فقد استخدمت للتجميد والتي اقل فقد أهملت . اما مدة الحركه فقد تم قياسها بأستعمال عداد ثواني ونقطة انطلاق العد تم عدها عندما يصبح 75% من الحيامن متحركة وتم التوقف عن العد عندما يصبح 75% من الحيامن متوقفة عن الحركة (10) .

2- تركيز الحيامن (حيمن/ 1مل) في السائل المنوي تم باستعمال الشريحة الزجاجية الخاصة بعد الخلايا (الهيموسايتوميتر) وبعد تخفيف السائل المنوي بنسبة (3000:1) وبأستخدام المجهر المركب وبقوة تكبير 400× تمت قراءة التركيز ثلاث مرات ثم اخذ معدل تلك القراءات (4).

تخفيف السائل المنوي وحفظه بالتبريد

تم تخفيف السائل المنوي بنسبة جزء واحد من السائل المنوي الى خمسة اجزاء من المحلول المخفف (1: 5) وبنسبة (10:1) بكل من المخففين المشار اليهما انفاً وتم حفظهما في التبريد وذلك بوضعها في البراد بدرجة (4° م) ثم تم القيام بفحوص يوميه لمدة ونسبة الحركه لغاية ان تصبح الحركة بدرجة 0 (12).

تجميد السائل المنوي

1-استخدمت ثلاث عينات من السائل المنوي الذي حاز على درجة 4 لفحص الحركة لتجربة التجميد , وأختير الميثانول كمادة حافظه ضد التجميد بنسبة 10% لأضافتها للمحلولالاول (Liu) Modified Zhang والكليسيرول كماده حافظة ضد التجميد بنسبة 10% أيضا" لأضافتها للمحلول الثاني (Hank's). وأكمل التخفيف النهائي للسائل المنوي وليكون بنسبة 10:1 وبالمحاليل الحاوية على المادة الحافظة ضد التجميد.

2-طريقة التجميد كانت كالتالي : وضعت العينات تحت مدة التعادل بدرجة (4°م) لمدة 30 دقيقة بعدها عبئت العينات في قصبات التجميد الفرنسية الصنع (شركة IMV) حجم 0.25 مل , رصت بعدها القصبات على حاملات خاصة وتركت لفترة في بخار النايتروجين (-80°م) على أرتفاع 3 سم عن سطح النايتروجين السائل ولمدة عشرين دقيقة بعدها غمرت في النايتروجين السائل (11) .

3-تمت اسالة القصبة المجمدة بماء درجة حرارته (37°م) لمدة 8 ثواني بعدها تم تنشيف القصبة وقص طرفيها و القطرة الاولى أهملت وأستعملت القطرة الثانية لفحص الحركة كما تم شرحه سابقاً (11) .

4- فحصت الحركة الفردية للحيامن من العينات المجمدة وعلى مدد متباعده (بعد 48 ساعة , بعد اسبوع , اسبوعين , ثلاثة واربعة اسابيع من الخزن في النايتروجين السائل).

النتائج والمناقشة

ميزات السائل المنوي

تراوحت كمية السائل المنوي المستخلص بطريقة المساج الطبيعية بدون استخدام هرمونات او مهدئات مابين 0.25 – 3 مل وبمعدل 1.61 مل , وكان لونة ابيض حليبي . بلغ معدل تركيز الحيامن في الملي لتر الواحد ($9\times.955$ 10^8) حيمن , مدة الحركة تراوحت بين 20- 120 ثانية وبمعدل تقريبي 56 ثانية . كانت كمية السائل المنوي التي حصلنا عليها طبيعياً مقاربة للكمية التي حصل عليها المختار وجماعته (3) في دراسته لصفات السائل المنوي لأسماك البني مع ان المشار اليه كان قد استخدم الحقن الهرموني بمستخلص الغدة النخامية, ويعزى قلة السائل المستحصل الى انه لم يعط الاسماك مدة كافية بعد الحقن الهرموني لكي يحصل على الاستجابة المرجوة من الهرمون , إذ ان المفروض وحسب ما توصل اليه كل من الاعرجي وصالح (1) زيادة كمية السائل المنوي المستحصل من الاسماك المعاملة هرمونياً. بالمقارنة مع معدلات كمية السائل المنوي لاسماك الكارب المرئاتي(mirror carp) المعامل بهرمونات الغدة النخامية الذي تحت تأثير المهدئ والذي بلغ 13. 26 مل في دراسة Akcay وجماعته (5) و35.30 مل في دراسة الاعرجي وصالح (1) لأسماك الكارب العادي مع نتائج الدراسة الحالية نستنتج ان الكميات التي حصلنا عليها من السائل المنوي قليلة جداً .لذا هناك حاجة الى العمل على زيادة كمية السائل المنوي المستحصلة من اسماك البني لتحسين تكاثره وانتاجه ،إذ لم يحظ سمك البني بأية عمليات إنتخاب وتحسين وراثي كالتي حظي بها سمك الكارب علما إنه لم تستعمل هرمونات لتحفيز الاسماك في الدراسة الحاليه لأعطاء المزيد من السائل المنوي . تم الحصول على معدل تركيز الحيامن اقل مما توصل الية كل من المختار وجماعته (3) و دحام وجماعته(4) . علماً إن معدل زمن حيوية الحيامن والبالغة 56 ثانية كانت متقاربة مع نتائج المختار واخرون (3), واقل من معدل زمن حركة الحيامن الذي توصل الية دحام وجماعته (4) البالغ 100 ثانية بالرغم من ان هذا المعدل

كان ضمن حركة بعض حيامن الدراسة الحالية , والحقيقة ان الاختلافات الفردية موجودة في كل الانواع لذا تتم اخذ اعداد كبيرة من العينات لتلافي تأثير الاختلافات الفردية وتكون النتائج اكثر واقعية .

اختبار قابلية الحيامن للحفظ القصير الامد بالتبريد بدرجة 4^{o} م

أظهرت نتائج حفظ الحيامن باستخدام مخففين مختلفين (محلولZhang and Liu المحور ومحلول Hank's) امكانية حفظ الحيامن لمدة اقصاها ثلاثة ايام باستعمال محلول Zhang and Liu و ستة أيام باستعمال محلول Hank's غير ان المحلول الاول تفوق على الثاني في حفاضة على حيوية حيامن اعلى بدلالة معدل درجة حركة الحيامن ومدتها وكما يظهر في الجدولين 3 و4 وموضح في شكل 1. وقد يعود السبب في التباين بين المحلولين الى أختلاف المواد الداخلة في تركيبهما , ففي حين يحتوي المحلول الاول على تركيز اعلى من الكلوكوز الذي يعد مصدراً للطاقة يمتاز المحلول الثاني بخاصية الدارئ التي تبقيه متوازناً مدة اطول . ففي دراسة للبياتي وجماعته (2) قاموا فيها بتجربة مخففات عديدة على ثلاثة انواع من اسماك الكارب وجدوا بأن بقاء الحيامن متحركة لأطول مدة ممكنة بالتبريد يعتمد على نوع السمكة وتركيب المخفف , أذ تفوقت حيامن اسماك الكارب العادي على كل من العشبي والفضي ببقائها تسعة ايام بالتبريد بأستخدام مخفف V2f في حين لم تبق عينات السيطرة (غير المخففة) لأكثر من يومين . اما أسماك البني فقد وجد المختار وجماعته (3) امكان بقاء حيامنها محفوظة (بدون تخفيف) بالتبريد لمدة خمسة ايام. ووجد Telea وجماعته (8) امكانية حفظ السائل المنوي لأسماك الفرخ الرامح(pike perch) لمدة سبعة ايام بالتبريد وبدون اي تخفيف . والحقيقة ان اختيار حفظ الحيامن بالتبريد وبدون تخفيف يعتمد بشكل اساس على الحرص على طريقة جمع السائل المنوي بشكل خالي من التلوث بالبول الذي ان حصل يؤدي الى خفض حيوية الحيامن بشكل سريع وتهديد قابليتها على البقاء حية والأخصاب وخاصة في حالة الجمع بالمساج ودون استخدام مهدئات . ففي حالة المختار وجماعته (3) كانت الاسماك تحت تأثير المهدئ وفي حالة Telea وجماعته(8) تم جمع السائل المنوي بالقسطرة. تم استخدام نسبتي تخفيف جزء واحد من السائل المنوي الى خمسة اجزاء من المخفف وجزء الى عشرة وبكلا المخففين (جدولين 3 و4) . نسب التخفيف المستخدمة غالبا" هي 1: 4 وهناك بعض الباحثين استخدموا نسب تخافيف وصلت الى 1: 50 بنجاح في تخفيف السائل المنوي العالي التركيز لبعض الأسماك (7). إذ ان التراكيز العالية للحيامن تقلل بالأخص فرص نجاة الحيامن في أثناء عمليات التجميد . وعلى العموم تحتاج العينات التي تجمع بطريقة المساج الى تخافيف اكبر من تلك التي تجمع بالقسطرة او بعزل الخصية وسحقها (12). مما سبق يمكن الاستنتاج بامكان حفظ حيامن سمك البني بالتبريد وباستخدام كلا المخففين المشار اليهما ومع افضلية محلولZhang and Liu للحفظ القصير لأحتفاظة بحيوية حيامن اعلى من Hank's الذي يمكن استخدامة لمدة اطول والتي تصل لغاية ستة ايام .

جدول 3 : زمن حيوية حيامن اسماك البني المحفوظة بالتبريد باستعمال محلول Zhang and Liu المحور

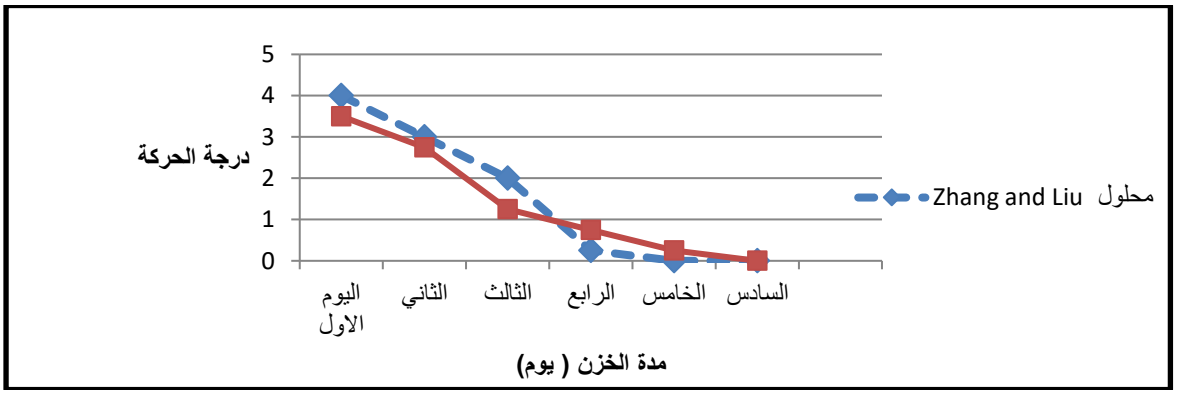
ت	نسبة التخفيف	الحركة الفردية بعد التخفيف	الحركة الفردية بعد 24 ساعة تبريد	الحركة الفردية بعد 48 ساعة تبريد	الحركة بعد 72 ساعة تبريد	الحركة بعد 6 ايام تبريد

		الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)
1	5:1	4	28	3	45	3	90	2	45	0	0
2	5:1	4	120	2	31	0	0	0	0	0	0
3	5:1	4	20	4	50	4	40	0	0	0	0
4	10:1	4	90	3	35	1	25	0	0	0	0
	المعدل	4	64.5	3	40.25	2	38.75	0.5	11.25	0	0

جدول 4: زمن حيوية حيامن اسماك البني المحفوظة بالتبريد باستعمال محلول Hank's

ت	نسبة التخفيف	الحركه الفرديه بعد التخفيف		الحركة الفردية بعد 24 ساعة تبريد		الحركة الفردية بعد 48 ساعة تبريد		الحركة بعد 72 ساعة تبريد		الحركة بعد 6 ايام تبريد		الحركة بعد 7أيام تبريد	
		الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)	الدرجة	المدة (ثانية)
1	5:1	4	31	4	45	3	45	3	45	2	30	0	0
2	5:1	3	31	2	40	1	20	0	0	0	0	0	0
3	5:1	3	90	2	40	0	0	0	0	0	0	0	0
4	10:1	4	40	3	25	1	0	0	0	0	0	0	0
	المعدل	3.5	48	2.75	37.5	1.25	16.25	0.75	11.25	0.5	7.5	0	0

شكل 1 :مقارنة بين محلولي Zhang and Liu و Hank's في قابليتهما على حفظ حيامن البني بدلالة مدة بقاء الحيامن حية و درجة حركتها .



اختبار قابلية الحيامن للحفظ طويل الامد بالتجميد الفائق بالنايتروجين السائل (-196°م)

تتعرض الحيامن في أثناء عملية التجميد الى الاضرار نتيجة انخفاض درجة الحرارة (صدمة البرودة) ولأسباب مختلفة , فقد يحدث الضرر من تغيير درجة الحموضة (pH) او من بلورات الجليد المتكونة داخل الحيمن والتي قد تسبب ضرر في بنية وتركيب الحيمن, او قد يحصل بفعل التجميد زيادة تركيز السوائل خارج الحيمن الذي يؤدي الى جفاف الحيمن لنضوح السوائل خارجة بفعل عملية الارتشاح . والوسيلة لتلافي من هذه التأثيرات هو استخدام مادة حافظة ضد التجميد (cryoprotectant) مناسبة وطريقة تجميد جيدة , ولسوء الحظ فأن اغلب المواد المستعملة ضد التجميد سامة للحيامن يعد اختيار النوع والتركيز المناسبين مهماً وحاسماً لنجاح عملية التجميد والحفظ (12). اظهرت النتائج

الموضحة في الجدول رقم 5 افضلية محلول Hank's الحاوي على الكليسيرول بنسبة 10% كمادة حافظة ضد اضرار التجميد على محلول Zhang الحاوي على الميثانول بالنسبة نفسها , وجرت سابقاً العديد من الدراسات وعلى حيامن انواع مختلفة من الاسماك لأختيار التركيز والمادة الحافظة المناسبة ومنها دراسة (11) على حيامن سمكة (*Ptychocheilus incius*) التي اختبر فيها تأثير عدة مواد حافظة ضد التجميد وهي الـ (glycerol, methanol, Dimethyle sulfoxide, Dimethyl acetamide) على حركة الحيامن قبل وبعد التجميد وبتركيزين (5 و 10 %) لكل منهما ومضافة الى محلول Hank's , اظهرت النتائج ايضاً تفوق الكليسيرول 10 % على بقية المواد.وفي دراسة مشابهة أجراها Akcay وجماعته (5) أختبر فيها ثلاث مخففات مختلفة وثلاثة مواد حافظة مختلفة وهي (glycerol, DMA, DMSO) التي استخدمت بتركيز 15% , اظهرت نتائجه ايضاً تفوق الكليسيرول على بقية المواد . نستنتج من هذا أن محلول Hank's الحاوي على الكليسيرول كمادة حافظة ضد التجميد بنسبة 10% افضل من محلولZhang and Liu الحاوي على الميثانول بالنسبة نفسها في اختبار التجميد الفائق ،إذ استطعنا بواسطته الحصول على نسبة حركة للحيامن بلغت 55 % بعد التجميد والاذابة وهي نسبة تعد ممتازة في عمليات التلقيح والأخصاب كما استمرت هذه النسبة طيلة مدة الدراسة .خلصت الدراسة الى أمكان حفظ حيامن اسماك البني حفظ قصير الامد بالتبريد ويفضل استخدام محلول Zhang and Liu لهذا الغرض وحفظ طويل الامد بالتجميد الفائق ويفضل استخدام محلول محلول Hank's الحاوي على الكليسيرول بنسبة 10% .

جدول 5: حيوية حيامن أسماك البني بعد التجميد والإسالة وبدلالة نسبة الحركة

ت	نوع المخفف	نسبة التخفيف	الحركة الفردية بعد التخفيف النسبة + الدرجة		الحركة بعد التجميد والاسالة بعد 48 ساعة	الحركة بعد الاسبوع الاول من التجميد	الاسبوع الثاني	الثالث	الرابع
1	Zhang +10% Methanol	10:1	%90	4	%40	%5	%5	%5	%5
2	Hank's + 10% Glycerol	10:1	%95	4	%20	%10	%10	%10	%10
3	Hank's + 10% Glycerol	10:1	%70	4	%60	%55	%55	%55	%55

المصادر

1- الاعرجي , عباس سعد و صالح خليل ابراهيم (2009), العوامل المؤثرة في صفات السائل المنوي لأسماك الكارب العادي . مجلة الفرات للعلوم الزراعية.1(2) :123-128.

2- البياتي , نمير محمود ؛ , فارس فيصل، ابراهيم ؛, حازم جواد ,العبيدي و خلود جميل ،الجشعمي (2002) , تأثير بعض المخففات في حركة الحيامن لثلاثة انواع من اسماك الكارب.مجلة الزراعة العراقية,8(1):40-45. .

3- المختار , مصطفى احمد ؛ ساجد سعد النور, و فالح موسى الزيدي (2008). , ملاحظات اولية حول الصفات الحياتية للسائل المنوي لأسماك البني *Barbus sharpeyi* (Gunther,1874) مع الحقن الهرموني والحفظ . المجلة العراقية للأستزراع المائي ,. 5(1): 29-32 .

4- دحام , حداوي محمد ؛ نمير محمود، حلمي ؛ حازم جواد، كاظم وخلود جميل عبد الحسين (2005). بعض المواصفات الطبيعية للسائل المنوي لسبعة انواع من الاسماك المحلية . مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية ,

. **43–37** :(**2**) **18**

5– Akcay E. ; Y. Bozkurt and N. Tekin (2004). Cryopreservation of Mirror Carp Semen, Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28: 837-843.

6– Coad, W. (2010). Fresh Water Fishes of Iraq. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria, No. 39.

7– Paniagua-Chavez C.; J. Buchanan and T. Tiersch (1998). Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. J. of Shellfish Research 17: 231-237. (Cited from Tiersch and Green, 2011), P. 650.

8– Telea, A. ; I. Grozea; D. Banatean, and G. Korbuly (2008). Pikeperch milt preservation on short and medium periods. Buletin USAMV-CN, 65 (1-2).

9– Tiersch, T. R; W. R. Wayman; C.R. Figiel; O. T. Gorman; J. H. Williamson and G.J. Carmichael (1997). Field collection, handling and storage of sperm of the endangered razorback sucker. North American Journal of Fisheries Management, 17:167-173.

10– Tiersch, T. R and P.M. Mazik (2000). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana, USA.

11– Tiersch, T. R; C.R. Figiel; W. R. Wayman; J. H. Williamson; O. T. Gorman and G.J. Carmichael (2004). Cryopreservation of sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow. North American J. of Aquaculture, 66:8-14.

12– Tiersch, T. R. and C. Green (2011). Cryopreservation in Aquatic Species, 2nd edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge , Lousiana, USA.

13– Zhang, X and Liu (1991). Study of cryopreservation of fish spermatozoa. 1. Methods of freezing and thawing. Acta. Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis, 15: 59-63.

Iraqi J. Agric. Res. Vol.22 No.1 pp.167-175 June/2017

SPERM CHARACTARISTICS FOR BUNNI FISHES *(Barbus SHarpeyi*) AND ITS ABILITYFOR SHORT COLD PRESERVATION AND LONG-TERM CRYOPRESREVATION

O. A. Mohammed S. A. Al- Bayatti K. F. Al-Mohammedi
W. Y. Latef A.W. Shaker S. S. Mahde
Sh. A. Al-Alalli R. F. Al- Tameemi

ABSTRACT

This investigation is aimed to study the sperm characteristics of Buni fishes(*Barbus sharpeyi*) and its capability for short period storage in refrigeration and long-term cryopreservation under liquid Nitrogen at (-196ºC).Sperms were obtained from ten mature fishes captured from Alrathwaneya pond- Baghdad during the spring spawning season for 2015. The semen was collected by manual abdominal stripping without using any hormones or anesthetics. The tudied characteristics included semen's size, sperm concentrations and its motility duration. The sperms capability to withstand cold preservation by using two solutions, which were (The Modified Zhang and Liu versus Calciun-free Hank's Balanced Salt Solution) were tested. Methanol at 10% was added to the first solution as anti-freezing preservative and the Glycerol at the same rate for the second, for long-term cryopreservation under liquid nitrogen experiment. The preservation capability, the best solution for short -term cold and long-term cryopreservation was selected according to the sperm motility rate and degree during cooling and freezing and post thawing processes.

The semen volume ranged between (0.25-3ml) and averaged 1.61ml. White milky in color, the sperm concentration average reached ($9.55\ 9\times10^{8}$) per ml. The motility duration ranged between (20-120 seconds) with an average of 56 second. The obtained results showed sperms capabilities to be preserved in refrigeration with Zhang and Liu solution maximum period of 3 days and 6 by Hank's solution. The Zhang and Liu solution showed better sperm viability compared to Hank's solution considering the means of motility degrees and durations. The Hank's solution with 10% glycerol was better in long term cryopreservation over Zhang and Liu solution with 10% methanol.

Directorate of Agric. , Res. Ministry of Agric. , Baghdad,Iraq.