دراسة نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* المعاملة بثلاث مواد حافظة Cryoprotectants في مرحلة المعيدة Gastrula

*محسن جواد كاظم **أسماء سامي إبراهيم *طارق صالح حسن ***حداوي محمد دحام
*وزارة العلوم والتكنولوجيا– دائرة البحوث الزراعية / بغداد–العراق
**كلية التربية/ابن الهيثم/جامعة بغداد/ بغداد–العراق
***كلية التربية الأساسية/ جامعة واسط / واسط–العراق

الخلاصة

تم في هذا البحث مراقبة نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpioL.* الناتجة من اجنة معاملة بالمواد الحافظة من اثر التجميد Cryprotectants الثلاث، ثنائي مثيل الكبريت DMSO والميثانول والكليسيرول بتراكيز مختلفة في مرحلة المعيدة Gastrula .

ظهر فرق معنوي ($p\leq0.05$) في معدل الوزن بين مجموعة السيطرة والأجنة المعاملة بتراكيز (5,10,15%) من DMSO في شهر (آيار 2006) ، في حين لم تظهر فروقات معنوية سواء في معدلات الطول والوزن في الشهرين التاليين (حزيران وتموز 2006) وهذا يتطابق مع معطيات استخدام الميثانول كمادة حافظة.اظهر استخدام الكليسيرول أن هناك فرقاً معنوياً($p \leq 0.01$) في الطول والوزن في الشهر الاول في حين كان الفرق المعنوي واضحاً في معدل الوزن فقط في الشهرين التاليين.

الكلمات المفتاحية : كارب اعتيادي ، يرقات ، مادة حافظة والمعيدة

Study of Growth of Young Carp Fish *Cyprinus carpio* L. that Which Treated with Three Cryoprotectants in Gastrula Stage

***Muhsin Jawad Kadhim, **Asmaa Sami Ibrahem, *Tarq Salah Hasan**
*****Haddawi Muhammad Dahaam**
*Ministry of Science and Technology /Agricultural Research Directorate/ Baghdad-Iraq
**Ibn Alhitham Education College /University of Baghdad/ Baghdad-Iraq
*** Principal Education College/ Wasset university/ Wasset-Iraq
E - mail: Nonomuhsin@yahoo.com

Abstract

In this research, the growth of young carp fish *Cyprinus carpio* L. which treated with three cryoprotectants (DMSO , Methanol , Glycerol) in different concentrations in gastrula stage was observed. In the first month (April 2006) there was significant differences ($P < 0.05$) in weight between the control group and the fish embryos treated with concentrations (5, 10, 15%) of DMSO, while there was no significant differences in the length , growth and weight of fish in (June and July 2006) and this agreement with the results of using methanol as cryoprotectant. Whereas, there was significant differences ($p <0.01$) in length and weight in the first month, but there was significant differences in the weight only in following months.

Key words: *Cyprinus carpio* , Larvae , Cryoprotectants and Gastrula

المقدمة

تعد تقنية الحفظ بالتجميد Cryopreservation التي يتم من خلالها حفظ الخلايا أو الأنسجة وحتى الكائنات بشكل حي واحدة من التقنيات التي تستخدم في الحفاظ على تلك المواد بشكلها الأصلي وبتراكيبها الوراثية دون تغير ولفترات طويلة (Chao and Liao, 2001).

ترتكز هذه التقنية على عوامل مختلفة منها نوع المادة الحافظة وتركيزها ومدة التعرض لها والمرحلة التكوينية Development stage للكائنات الحية ومعدلات التبريد وطريقة الحفظ وغيرها من العوامل ذات التأثير العميق في إنجاح هذه التقنية (Hagedorn *et al*.,1998). فالمادة الحافظة Cryoprotectant هي مادة كيميائية لها القدرة على اختراق اغشية الجنين وملئها وحماية مواد الجنين من ضرر التجميد عند تعرضها إلى درجات حرارية دون الصفر (Goudy and Moran, 1999). وعُرفت كذلك من قبل جو Gwo (2000) بأنها مركبات مضادة للتجميد Anti freez compounds تمنع انجماد ما بداخل الجنين عن طريق زيادة اللزوجة والارتباط بأواصر هيدروجينية قوية مع جزيئات الماء وتخفيف الالكتروليتات وبالتالي منع الضرر الذي يصيب الجنين.

ومن العوامل الاخرى المهمة في انجاح الحفظ بالتجميد العميق ، هو تأثير المرحلة التكوينية ، إذ ان هناك علاقة واضحة بينهما حيث وجد زهانك وجماعته(Zhang *et al*., 2003) ان ما يقارب 50% من الاجنة في المراحل التكوينية الممتدة من 7 الى 20 ساعة تهلك عند تعرضها للصفر المئوي لمدة من 20 دقيقة الى 20 ساعة في حين تتحمل هذه الاجنة وتقل هلاكاتها عند حفظها في مرحلة ضربات القلب للفترة ذاتها. كما اشار روبرتسون ولورنس (Robertson and Lawrence ,1988) الى ان المراحل غير المتمايزة مفضلة في هذه التقنية وذلك لعدم وجود اختلاف في نوعية وحجم الخلايا.

يعد البحث الحالي جزءاً من برنامج لتحديد قدرة الاسماك الناتجة عن اجنة معرضة لعوامل الحفظ بالتجميد العميق في البقاء والتطور والتحقق من التغيرات الحاصلة فيها مقارنة مع أقرانها الفاقسة طبيعياً.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة الحالية في مختبرات كلية العلوم للبنات للمدة من بداية شهر أيار ولغاية انتهاء شهر تموز 2006 . استخدمت يرقات اسماك الكارب الاعتيادي الناتجة عن أجنة في مرحلة المعيدة معاملة مسبقاً بالمواد الحافظة من ضرر التجميد Cryoprotectants وهي ثنائي مثيل الكبريت DMSO والكليسيرول والميثانول بتراكيز 5،10و15% كل على حدة وبمعدل 10 اسماك للمعاملة الواحدة وبمكررين.

وضعت اليرقات الفاقسة في حاضنات صغيرة ثم نقلت الى حاضنات اكبر عند نموها الى يافعات.

استخدم الميزان الحساس Souter ذو الأربع مراتب بعد الفارزة لقياس الوزن الفردي ومسطرة الطول القياسية لتحديد الطول الفردي كذلك.

غذيت اليرقات بعد انتهاء امتصاص كيس المح على صفار بيض مخفوق ولمدة 4 أيام بعدها غذيت على الحليب وفول الصويا ولمدة 15 يوم. تلا ذلك التغذية بمجروش العلف الاعتيادي لحين انتهاء التجربة. بلغ معدل درجة الحرارة 23.5 ° م

و تم اخذ قياس الطول والوزن شهرياً.

التحليل الإحصائي

استخدم تصميم اختبار الفرق المعنوي الأقل Least Significant Difference LSD لإيجاد الفروق المعنوية. تم اجراء التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS.

النتائج والمناقشة

يظهر جدول(1) عدم وجود فرق معنوي في معدل الطول القياسي بين مجموعة السيطرة control واليرقات الناتجة عن اجنة معاملة بتراكيز (5,10, 15%) من المادة الحافظة DMSO ، فيما ظهر فرق معنوي ($p\leq0.05$) في معدل الوزن بين مجموعة السيطرة والمعاملات المذكورة وذلك خلال الشهر الاول من التجربة (ايار) .

لم يظهر فرق معنوي سوءاً في معدلات الطول القياسي او الوزن بين مجموعة السيطرة والمعاملات المذكورة اعلاه في الشهرين التاليين (حزيران وتموز) من التجربة.

عند استخدام الكليسيرول كمادة حافظة من اثر التجميد في معاملة اجنة الاسماك في مرحلة المعيدة، سجل تأثير تلك المادة من خلال جدول رقم (2) الخاص بقياسات نمو صغار الاسماك الناتجة من فقس تلك الاجنة، إذ ظهر فرق معنوي واضح بمستوى معنوية ($p\leq0.01$) بين مجموعة السيطرة والمعاملات (5,10%) سوءاً في معدلات الاطوال القياسية ام الاوزان في الشهر الاول من الدراسة. وفي الشهر الثاني من التجربة (حزيران)، اتضح عدم وجود فرق معنوي بين مجموعة السيطرة والمعاملات في معدلات الطول القياسي، في حين ظهر الفرق معنوياً ($p\leq0.01$) في معدلات الوزن بينهما.، اما في الشهر الاخير من التجربة (تموز) تطابقت البيانات مع ما سبقها في شهر حزيران.

يشير جدول (3) الخاص باستخدام الميثانول كمادة حافظة وتاثيرها في نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي ولمدة ثلاث الى عدم وجود فرق معنوي في معدل الطول القياسي بين مجموعة السيطرة والمعاملات الثلاث(5,10,15%) وبالمقابل ظهر فرق معنوي ($p\leq0.05$) بالنسبة لمعدلات الوزن وذلك في شهر أيار وهو الشهر الأول من التجربة .

أما في الشهرين الأخيرين من التجربة (حزيران وتموز) لم يلحظ فرق في معدلات الطول او الوزن بين مجموعة السيطرة والمعاملات الثلاث من المادة الحافظة الميثانول.

من معطيات جدول رقم 4 (جدول المقارنة بين المواد الحافظة الثلاثة في الطول والوزن) تبين في الشهر الأول من التجربة عدم وجود فرق معنوي في معدل الطول القياسي سواء بين التراكيز المتماثلة من المواد الثلاث ام المختلفة منها ، إذ بلغ أقصى معدل طول (3.3 سم) عند استخدام DMSO بتركيز (15%) في حين كان اقل معدل طول قياسي(2.3 سم) عند استخدام (10%) من المادة نفسها. اما معدل الوزن بين المواد الثلاث وتراكيزها المختلفة فقد اظهر عدم تسجيل فرق معنوي بينها، إذ كان اعلى معدل وزن (1.3 غم) باستخدام المادة الحافظة كليسيرول بتركيز (5%) ، وبالمقابل كان الحد الادنى لمعدل الوزن (1.1 غم) باستخدام المادتين الحافظتين DMSO والميثانول بتركيز 10% و 15% على التوالي.

في الشهر الثاني من التجربة (حزيران) وعند المقارنة سواء بين المواد او تراكيزها المختلفة ، اتضح ان لا فرق معنوياً في المعدلات القياسية للطول إذ كان اقصى معدل طول قياسي قد بلغ (7.5 سم) بتركيز (10%) من DMSO يقابله الحد الادنى (6.1 سم) عند استخدام الميثانول بتركيز (5%). وهذه الحال تنطبق على معطيات معدلات الوزن ، اذ لوحظ عدم وجود تباين فيها، حيث كان اعلى معدل وزن (41.1 غم) باستخدام المادة الحافظة ميثانول بتركيز (10%) يقابله الحد الادنى الذي كان (34.7 غم) عند تركيز(15%) من الـ DMSO . في شهر تموز(الاخير) من التجربة، لم يلحظ اختلاف مع ما سبقه من نتائج الشهرين الماضيين من التجربة سواءً في الطول او الوزن وكما هو في الجدول رقم (4) .

يرتبط نجاح الحفظ بالتجميد العميق سواءً للاجنة ام ما بعدها بعوامل عديدة يدخل ضمنها

المـــادة الحافظـــة والمرحلـــة التكوينيـــة (قيـــد الدراسة)(Ranaal,1990).

من خلال الجـــداول(4,3,2,1) يتبـــين ان المادة الحافظة كليسيرول هي المادة الاكثر فاعليـــة في نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي في مرحلة المعيدة، في حين اظهر استخدام المادتين الحافظتين DMSO والميثانول تأثيرا اقل. ان لهذا التباين فـــي النتائج اسبابا يكون بعضها معروفاً وبعضها الاخـــر عير معروف.

فالكلسيرول كما اشار هارفي (Harvey,1983) يحمي البلاستوديرم أكثر من غيره ولذلك فهـــو لا يخترق جميع حجيرات الجنين بشكل متســـاو، كمـــا اشارت (Hagedorn *et al.*,1997) الى انه مـــن الأسباب الأخرى في التباين هو اخـــتلاف المرحلـــة التكوينيةً وان توزيع المـــاء والمـــواد الحافظـــة لا يتساوى في معدل نفاذيته في جميع اجزاء الجنـــين، فضلاً على ندرة المعلومات او الطرائق حول كيفية التغير في نفاذية طبقـــة المـــح Yolk syncytial layer(YSL) مع تقدم المرحلة التكوينية.

كما ان التشابه في نفاذية اجزاء البلاستوديرم للمـــاء يقابله اختلاف في النفاذية نفسها للمـــواد الحافظـــة ولهذا فهي تختلف عند استرداد الشكل الاصلي ممـــا يعنـــي وجـــود ضـــرر معـــين (Hagedorn *etal.*,1998)

ان تاثير المرحلة يبدو واضحاً فـــي دراســـتنا هـــذه خاصةً اننا تناولنا مرحلة مبكرة تعرضت من خلالها الاجنة الى مواد ذات سمية تختلف كل منهـــا عـــن الاخـــرى، إذ اشـــار (Schneider and Mazur, 1984) الى ان المراحل المبكرة من التكوين الجنيني حساسة جداً للتجميد وان الزيادة في نسبة البقاء مـــع تقدم المراحل التكوينية للاجنة يرتبط بتزايـــد عـــدد الخلايا وتشابه حجمها في المراحل المتأخرة والـــذي من شأنه ان يزيد من قدرة تحمل الجنين لصـــدمة التجميد بالقياس للمراحل المبكرة التي تكـــون فيهـــا الخلايا كبيرة الحجم قليلة العدد. واشار (Magyary *et al.*, 1996) الى ان الاختلاف في نســـبة البقـــاء يزداد مع تقدم المرحلة التكوينية، اذ غالباً ما يحصل تكسر في الجنين خلال المراحل الجنينية المبكـــرة، بينما تزداد مكونات الجنـــين ومنهـــا كميـــة المـــح والقطرات الدهنية في المراحل المتأخرة.

ان الاضرار الرئيسة التي تصيب الجنـــين بعد التجميد هي فقدانه لحيويته بشكل جزئي نتيجـــة الخلل الذي يصيب الفعالية الانزيمية فـــي داخلـــه ، وهذا ما ينتج عنه خلل في الوظيفة الايضـــية. اذ ان المادة الحافظة ثنائي مثيل الكبريت تغير طبيعة انزيم الفركتوز فوسفيت Fructose Phosphate وبذلك تؤدي الى تعطل عملية تحلل الســـكر Glycolysis ، فيما تعمل المادة الحافظة الكليسيرول على تثبيط ايض الكلوكوز ويحفز التمثيل اللاهوائي للكلوتامين Glutamine والذي من شأنه تقليل نسبة فقس اجنة الاسماك بعد عملية الاسالة (Robles *et al* . 2004). يعزى سبب انخفـــاض نســـبة فقـــس الاجنة في المراحل المبكرة الى النشاط الانزيمـــي ، اذ يتزامن تطور هذا النشاط مع تطـــور المرحلـــة التكوينية (Cabrita *et al.*, 2003). لذا يلاحظ في الدراسة الحالية ان نسبة الفقس في مرحلة ضربات القلب كانت اعلى من تلك التي في مرحلة المعيدة.

جدول (1) : قياسات نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* الناتجة من معاملة الاجنة بمادة DMSO في مرحلة المعيدة.

المعاملات%	شهر أيار 2006		شهر حزيران 2006		شهر تموز 2006	
	معدل الطول القياسي (سم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي(سم) ± الانحراف القياسيSD	معدل الوزن (غم)±الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي (سم)±الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ±الانحراف القياسي SD
control	4.5 ± 0.181	2.3 ± 0.091	7.7 ± 0.279	44 ± 0.853	16.3 ± 0.067	92.4 ± 0.651
%5	3.1 ± 0.067	1.2 ± 0.112	6.7 ± 0.704	38 ± 0.763	11.2 ± 0.959	88.4 ± 0.53
%10	2.3 ± 0.073	1.1 ± 0.095	7.5 ± 0.698	37.7 ± 0.709	10.8 ± 1.122	89.8 ± 0.94
%15	3.3 ± 0.067	1.2 ± 0.067	7.3 ± 0.284	34.7 ± 1.113	10.3 ± 0.982	87.6 ± 0.703
L.S.D بدرجة ثقة 99%** 95%*	غ . م	1.2511*	غ . م	غ . م	غ . م	غ . م

جدول (2) : قياسات نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي Cyprinus Carpio الناتجة من معاملة الاجنة بمادةGlycerol في مرحلة المعيدة.

المعاملات %	شهر أيار 2006		شهر حزيران 2006		شهر تموز 2006	
	معدل الطول القياسي (سم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي(سم) ± الانحراف القياسيSD	معدل الوزن (غم)±الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي (سم)±الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم)±الانحراف القياسي SD
Control	4.5 ± 0.181	2.3 ± 0.091	7.7 ± 0.279	44 ± 0.853	16.3 ± 0.067	92.4 ± 0.651
%5	3.1 ± 0.086	1.3 ± 0.1	6.4 ± 1.033	36.4 ± 0.809	8.4 ± 0.633	83.4 ± 0.369
%10	2.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	7.3 ± 0.553	35.1 ± 1.075	10.5 ± 0.973	77.2 ± 0.901
L.S.D بدرجة ثقة 99%** 95%*	2.50068**	1.8086**	غ . م	16.8692**	غ . م	12.7347**

جدول (3) : قياسات نمو صغار اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus Carpio* الناتجة من معاملة الاجنة بمادة Methanol في مرحلة المعيدة

المعاملات	التركيز %	شهر أيار 2006		شهر حزيران 2006		شهر تموز 2006	
		معدل الطول القياسي (سم)±الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي (سم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي (سم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD
DMSO	%5	3.1 ± 0.067	1.2 ± 0.112	6.7 ± 0.704	38 ± 0.763	11.2 ± 0.959	88.4 ± 0.53
	%10	2.3 ± 0.073	1.1 ± 0.095	7.5 ± 0.698	37.7 ± 0.709	10.8 ± 1.122	89.8 ± 0.94
	%15	3.3 ± 0.067	1.2 ± 0.067	7.3 ± 0.284	34.7 ± 1.113	10.3 ± 0.982	87.6 ± 0.703
Glycerol	%5	3.1 ± 0.086	1.3 ± 0.1	6.4 ± 1.033	36.4 ± 0.809	8.4 ± 0.633	83.4 ± 0.369
	%10	2.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	7.3 ± 0.553	35.1 ± 1.075	10.5 ± 0.973	77.2 ± 0.901
Methanol	%5	3.1 ± 0.042	1.1 ± 0.073	6.1 ± 0.734	37 ± 0.852	11.2 ± 0.898	90.2 ± 0.813
	%10	2.8 ± 0.108	1.2 ± 0.073	7.1 ± 0.655	41.1 ± 0.855	10.7 ± 0.611	88.7 ± 1.113
	%15	3 ± 0.042	1.2 ± 0.042	7.1 ± 0.874	40.6 ± 0.652	10.3 ± 0.946	87.8 ± 0.811
L.S.D بدرجة ثقة 99 % ** بدرجة ثقة 95 % *		غ . م	غ . م	غ . م	غ . م	غ . م	غ . م

جدول (4) : مقارنة قياسات نمو صغار اسماك الكارب *Cyprinus carpio* الناتجة من اجنة معاملة بالمواد (DMSO) , Glycerol , Methanolفي مرحلة المعيدة.

المعاملات%	شهر أيار 2006		شهر حزيران 2006		شهر تموز 2006	
	معدل الطول القياسي (سم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم) ± الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي(سم)± الانحراف القياسيSD	معدل الوزن (غم)±الانحراف القياسي SD	معدل الطول القياسي (سم)±الانحراف القياسي SD	معدل الوزن (غم)±الانحراف القياسي SD
Control	4.5 ± 0.181	2.3 ± 0.091	7.7 ± 0.279	44 ± 0.853	16.3 ± 0.067	92.4 ± 0.651
%5	3.1 ± 0.042	1.1 ± 0.073	6.1 ± 0.734	37 ± 0.852	11.2 ± 0.898	90.2 ± 0.813
%10	2.8 ± 0.108	1.2 ± 0.073	7.1 ± 0.655	41.1 ± 0.855	10.7 ± 0.611	88.7 ± 1.113
%15	3 ± 0.042	1.2 ± 0.042	7.1 ± 0.874	40.6 ± 0.652	10.3 ± 0.946	87.8 ± 0.811
L.S.D بدرجة ثقة 99%** %95*	غ . م	1.2411*	غ . م	غ . م	غ . م	غ . م

References

Cabrita,E.;Robles,V.;Chereguini,O. W.; llas,J. and Herraez,P. ,(2003) Effect of Different Cryoprotectants and Vitrification Solution on the Hatching Rate of Turbot Embryos.(*Scophthalmus maximus*) Cryobiology, 47,204 -213.

Chao, N.H. and Liao, I.,(2001) Cryopreservation of Finfish and Shellfish Gametes and Embryos . Aquaculture, 197, 161-189.

Hagedorn,M.;Kleinhans,F.;Artemov,D. and Pilatus,U. ,(1998)Characterization of a Major Permeability Barrier in Zebrafish Embryo.Biol.Reprod.,59,1240-1250.

Hagedorn,M.;Kleinhans,F.;Artemov,D. and Pilatus,U. ,(1998)Characterization of a Major Permeability Barrier in Zebrafish Embryo.Biol.Reprod.,59,1240-1250.

Harvey,B.,(1983) Cooling of Embryonic Cells, Isolated Blastoderms and ant -act Embryos of Zebrafish (*Brachydanio rerio*) to -196C .Cryobiology, 20, 440-447.

Goudy,A. and Moran, B. ,(1999) Apilot Haddock Hatchery for Massachusetts. Mader ,111-119.

Gwo,J. , (2000) Cryopreservation of Sperm of Some Marine Fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch. T. R. and Mazik, P. M. (Eds). World Aquaculture Society, Baton Rouge Louisiana, 138-160.

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.

Robertson, S.; Lawrence, A.; Nell, W. ; Arnold, C. and McCarty, G. ,(1988)Toxicity of the Cryoprotectants Glycerol, Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol, Sucrose, and Sea Salt Solutions to the Embryos of Red Drum. Prog. Fish-Cult., 50,148-154.

Rana, K.; Muiruri, B.; McAndrew, B. and Gilmour, A. , (1990) The Influence of Diluents Equilibration Time, and pre-Freezing Storage Time on the Viability of Cryopreserved *Oreochromis niloticus* Spermatozoa. Aqua. and Fishe. Management, 21, 25-30.

Robles, V.;Cabrita, E.;Cunado,S.and Herraeze, P. , (2004) Effect of Avitrivfication Protocol on the LDHand 6GPDH Activties and the Hatching Rate of Zebra Fish and Turbot Embryo .Theriogenology, 61, 1367-379.

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.

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.