

## 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 العشبى  
المحفوظ بالتجميد العميق CTENOPHORYNGODEN IDLLA

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) والمنى 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 كاربونات الصوديوم) والمخفف المحتوي على قاعدة سكرية (كلوكوز + Tris) وثلاثة مواد حافظة وممانعة تبلور وهي Dimethyl sulfa oxide (DMSO) والميثانول والجليسرول في الصفات الحيوية للمنى وتمثل بالاتي (نسبة الحركة الجماعية للنطف مدة حيوية الحركة الجماعية للنطف /ثانية ومدة الحركة الفردية للنطف /ثانية ودرجة الأس الهيدروجيني للمنى وحجم النطف المرصوصة % وإعداد النطف  $\times 10^9$  / مل<sup>3</sup>) من المنى المخلوط بعد الجمع من ذكور معروفة الصفات الوراثية ومن قطيع التكاثر المعد للتلقيح الاصطناعي الكارب العشبى في موسم التكاثر في أشهر آذار ونيسان ومايس للعام 2008 في مفسس الفرات في محافظة بابل , خفف للمنى بنسبة 1 : 10 حجم كلي للمخفف والمادة الحافظة بتركيز 10 % , تمت المعادلة لمدة 10 دقيقة ترفع ثم عبئ المنى المخفف في قصبات بلاستيكية حجم 0.25 مل<sup>3</sup> وإغلاق النهاية المفتوحة بمادة بولي فينيل 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 للمنى المحفوظ وان أفضل نسبة حركة جماعية للنطف بعد الإذابة والتنشيط عند استعمال المخفف الأول كركورا المطور والمخفف الثاني البلازما المنوية الصناعية (55.55 و 53.88 و 50.00 و 45.55 و 40.00) (56.11 و 54.44 و 50.00 و 45.55 و 38.88%) 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 و 53.61 و 50.55 و 47.77 و 42.22%) 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 التكاثر الاصطناعي لاسماك الكارب العشبى وذلك بتوفير المنى 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<sub>3</sub> and Glucose + Tris And three cryoprotectant agents Dimethyl sulfa oxide (DMSO) ME<sub>2</sub>SO 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  $\times 10^9$ /ml<sup>3</sup> 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 concluded from this study that long term cryopreservation at -196 °C can be successfully done. The present information will eventually help in selecting good extender M. K and A.S.P and with DMSO as cryogen for long term cryopreservation for improved artificial propagation in grass carp fish.

## المقدمة

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 المنى للأسماك بطريقة التجميد العميق (Cryopreservation) على درجات حرارة تصل -79 °م باستعمال الثلج الجاف والتجميد العميق على درجة حرارة -196 °م باستعمال النيتروجين السائل هي الأكثر شيوعاً في الوقت الحاضر ولهذه التقانة دور مهم في حل الكثير من المشاكل التي تواجه التكاثر الاصطناعي ونجاحه في جمع النواتج الجنسية من الذكور والإناث عندما تكون في أماكن متباعدة عن بعضها أو قد لا تكون متوفرة معاً في الوقت نفسه (5) وكذلك التغلب على مشكلة إنتاج كميات قليلة من المنى لبعض الأسماك (28) و(5) و(20) و(15) أو الاستفادة من المنى عندما يكون عالي الجودة بحل مشكلة ما يسمى شيخوخة النطف التي ينتج عنها انخفاض نوعية المنى (24) فضلاً عن أن هذه التقانات تقلل كلفة الاحتفاظ بالذكور على مدار السنة (6) وبذلك تقتصر الكلفة بالاحتفاظ بالإناث فقط فضلاً عن استعمالها في البرامج البحثية وخصوصاً عند إنتاج الهجن والاحتفاظ بالصفات المرغوبة وتطوير صفات أخرى (15) وكذلك تعمل هذه التقانة على تجنب آثار الأمراض التي تحدث بشكل مفاجئ أو الحوادث مثل التسرب النفطي (7) وهناك عوامل تتداخل في إنتاج هذه التقانة منها نوعية المنى المستعملة في التجميد (4) والمخفف الملائم ونسبه التخفيف (13) والمواد الحافظة 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 جيدة ومرغوبة ويساعد في نقل المنى للأسماك ذات الصفات الوراثية المرغوبة بسهولة ويسر إلى مناطق بعيدة بدلاً من نقل الأسماك في أحواض كبيرة ومكلفه يمكن حمل النطف المجمده في حاوية وتجهز المفاصل بالنطف على مدار السنة وعند الحاجة وأمكانية تكوين بنك للمنى 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 إلى عام 1853م إذ بحث العلماء آنذاك طرائق لحفظ الخلايا الجنسية الذكرية حية (15).

وكان الهدف من البحث دراسة تأثير ستة مخففات (Extender) المستعملة لحفظ منى أسماك الكارب العشبي وتقييم بعض المواد الحافظة (Cryogen) النافذة وغير النافذة لحفظ نطف أسماك الكارب العشبي ومدى تأثيرها في الصفة الحيوية للمنى وكفائته وفعاليتها لإجراء تقانات التكاثر الاصطناعي وتوفير المنى عندما تتوفر البيوض لتطوير عمليات التلقيح الاصطناعي.

## المواد وطرائق العمل

أجري البحث في مفسس شركة الفرات المحدودة لإنتاج الأسماك الذي يقع شمال مركز محافظة بابل حوالي 5 كم حيث يقوم بإنتاج 1.5 مليون إصبعية من الكارب العشبي وجمع المنى بعد وضع الذكور المعدة للجمع في أحواض خاصة وتم تحفيزها هرمونيا باستعمال مستخلص الغدة النخامية إذ طحنت خلاصه الغدة النخامية بهاون خزفي جاف وذويت بالمحلول الفسليجي (7 غم كلوريد الصوديوم في 1 لتر ماء) وبعد تسجيل أوزان الذكور المختارة والمعلمة من كل وجبه بواسطة ميزان 1364 MP وعلى ضوء الوزن حسب الجرعة اللازمة لكل ذكر إذ حقن 2 ملغم / كغم وزن حي وأعطيت بجرعة واحدة مع الجرعة الثانية للأنثى تمت مراقبه للذكور المحقونة وفحصها كل ساعتين وبعد 12 ساعة من الحقن تم جمع المنى من الذكور بطريقة التمسيد الخفيف على جدار البطن بعد مسك الذكر والسيطرة عليه جيداً بواسطة عامل متدرب ووضع على إسفنج ومسك باستعمال قطعة قماش بعد تجفيف الفتحة التناسلية وتم إفراغ المنى من الذكور في بيكرات بلاستيكية نظيفة جافة معقمة مدرجة لكل ذكر حسب الأوزان أو الأعمار، إما الضغط على منطقه البطن فيكون بين الزعفة البطنية والحوضية باتجاه الفتحة التناسلية (26) بعد جمع المنى وضع في أنابيب سعة 10 مل<sup>3</sup> في حاوية مبرده بداخلها ثلج مجروش لغرض تبريد المنى أثناء النقل إلى المختبر واستعمل لهذه التجربة المنى بطريقة الخلط ولغرض التعرف على المواصفات الحيوية المطلوبة في النطف المعدة للتبريد والتجميد العميق تم تخفيف المنى الطري على مرحلتين بالمخففات المستعملة في البحث وذلك لتقليل لزوجه المنى وزيادة انتشار النطف حيث كانت نسبة التخفيف 10:1 (منى: مخفف) ثم اخذ 0.1 مل من المنى المخفف وأضيف إلى 1 مل من المخفف فأصبحت 100:1 مل ثم اخذ 0.1 مل من المنى المخفف وأضيف إلى 1 مل فأصبح التخفيف 1000:1 وأجريت بعد ذلك فحوصات حركة النطف بواسطة المجهر بقوه تكبير X400 وذلك بوضع قطرة صغيرة من المنى 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 عملية 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 أعداد النطف  $\times 10^9$  / مل<sup>3</sup> من المنى بعد وصول

المني الطري والموضوع في أنابيب اختبار داخل الثلج المجمد في حاوية خاصة (ترمس) وفي غرفه مبرده وتم وضع المواد المستعملة في التبريد والمخففات في ثلاجة وعلى درجة -5 م لتلافي حصول تفاوت حراري بين المنى والمواد المستعملة في التبريد نظرا لحساسية النطف للحرارة والصدمة الحرارية (25) بعد ذلك تم تخفيف المنى 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 المنى المخفف على 5 م لمدة 10 دقائق للتعاقد بعد أن تم ترقيم وتعليم المخففات الستة المستعملة في التجربة للكرب العادي . بعد مده التعاقد تم تعبئه المنى المخفف في قصبات بلاستيكية (Straw) ذات حجم 0,25 ، أجريت عمليات التجميد العميق بالاستعانة والفحص في قسم التلقيح الاصطناعي التابع للشركة العامة لخدمات الثروة الحيوانية في أبي غريب وتمت الإسالة في حمام مائي على درجة 35 م لمدة 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)

الماده	المخفف				
	الأول	الثاني	الثالث	الرابع	الخامس
	M.K كركورا المطور	ASP البلازما المنوية الصناعية	K كركورا	I.M الوسط غير المحرك	كلوكوز+املاح الصوديوم
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	—
Glucose	—	—	—	—	6.00
					1.83
					22.00

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

## 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) إذ حقق المخفف الأول أفضل نسبة حركة جماعية (55.55 و 53.88 و 50.00 و 45.55 و 40.00%) 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 تحاكي التركيب الفسلجي للبلازما المنوية ويوفران محلول دارئ (Buffer) وهما ملائمان لحفظ نطف اسماك الكارب واسماك Tench واسماك Piracan juba (21) ، فضلا عن أنهما يحافظان على الضغط الازموزي بين المخفف والبلازما المنوية مما يثبط حركة النطف أثناء التخفيف والخزن والمحافظة على النطف دون ان تستنزف طاقتها المخزونة فيها (11) ويحتويان على Mg وNa المسؤولين 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 المنوية لحركة النطف ، إذ حقق المانع DMSO أعلى النسب ولجميع أشهر الدراسة (55.00 و 53.61 و 50.55 و 47.77 و 42.22%) على التوالي تلاه الجليسيرول إذ كانت نسب الحركة (52.50 و 50.00 و 46.66 و 43.33 و 39.72%) 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 كركورا الأطلسي .

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

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
<b>Extender</b>					
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	**	**	**	**	**
<b>Cryo gene</b>					
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 معنويًا فيما بينها. \*\* (P<0.01)

يتبين من 3 : إن هنالك تباين معنوي (P<0.01) في حيوية الحركة الجماعية للنفط من الشهر السادس إلى العاشر إذ حقق المخفف 4 الوسط غير المحرك أعلى المدد (235.55 و 232.22 و 223.33 و 223.33 و 215.55 /ثانية) ويعتقد إن سبب التفوق هو احتوائه على البوتاسيوم الذي ينشط حركة النفط أثناء التخفيف والتجميد وبذلك تبقى النفط محافظة على الطاقة المخزونة (ATP) في خلية النفط مما أدى إلى زيادة مدة حيوية النفط المتحركة وهناك علاقة قوية بين الحركة والإخصاب والفقس (28) وقد جاءت نتائج هذه الدراسة قريبة لما توصل إليه (3) إذ كانت مدة الحيوية 250 ثانية لأسماك الكارب المرآتي .

ويتضح من نفس الجدول إن هنالك تباين معنوي (P<0.01) في حيوية النفط لجميع أشهر الدراسة عدا الشهر العاشر إذ لم تتأثر هذه الصفة بموانع التجميد المدروسة وحقق DMSO أطول المدد لبقاء الحركة الجماعية (240.55 و 235.00 و 225.00 و 213.88 و 201.11 /ثانية) على التوالي بعد الإسالة من التجميد العميق وربما يعود سبب التفوق إلى ملائمة لطف هذا النوع من الأسماك لمحافظة على بيوت الطاقة وعليها تعتمد الحيوية والحركة كونها مصدر الطاقة في خلية النطفة إما الميثانول الذي حقق أدنى القيم (227.77 و 222.22 و 211.66 و 204.44 و 192.22 /ثانية) على التوالي فهو يتفق مع ما اكده (22) الذي أشار إن للميثانول تأثيراً ساماً على سلامة الغشاء البلازمي وفعالية بيوت الطاقة مقارنة مع DMSO والجلسيرول كما إن فاعليته كانت قليلة كمادة حافظة على أسماك التراوت قوس قزح الطرية والمجمدة (16) .

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

العوامل المدروسة	الشهر السادس	الشهر السابع	الشهر الثامن	الشهر التاسع	الشهر العاشر
<b>Extender</b>					
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	**	**	**	**	**
<b>Cryo gene</b>					
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 معنويًا 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 نفسه) ، اذ حقق المخفف 4 الوسط غير المحرك أطول المدد (351.11 و 341.11 و 330.00 و 324.44 و 305.55 / 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 تبعاً لها وهي تزداد وتقل تبعاً لها .

ويبين 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 و 339.44 و 320.00 و 280.55 و 243.88 / ثانية) على التوالي وسبب تفوق DMSO (350.00 و 339.44 و 320.00 و 280.55 و 243.88 / ثانية) على التوالي وذلك لمحافظة على بيوت الطاقة والتي يعتمد عليها في حركة النطف (21) .

جدول 4 : تأثير المخففات وموانع التجميد في حيوية الحركة الفردية للنطف / ثانية لأسماء الكارب العسبي 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 (7.50 و 7.50 و 7.44 و 7.40) على التوالي ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه (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 للمني المسال بعد التجميد العميق وقد سجل (DMSO) أعلى القيم (7.51 و 7.50 و 7.46 و 7.42 و 7.39) بالمقارنة مع النوعين الآخرين .

جدول 5 : تأثير المخففات وموانع التجميد في درجة الأس الهيدروجيني لأسماء 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 معنويًا فيما بينها. \* (P<0.05)

إن لنوع المخفف تأثيرًا عاليًا معنويًا (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 و 57.11 و 54.33 و 47.88 و 40.44٪) على التوالي ، وهذا ما يتفق مع ما توصل إليه (1) من إن ASP أفضل المخففات موازنة مع المخففات الأخرى .

وأظهرت النتائج إن هذه الصفة قد تأثرت معنويًا عند مستوى (P<0.01) إذ سجل DMSO أعلى النسب لهذه الصفة (57.66 و 56.22 و 52.66 و 50.11 و 45.00٪) على التوالي في حين كان أدنى مستوى عند استعمال الميثانول وقد جاء الجليسيرول وسطًا بين الاثنين ، ربما يعزى سبب تفوق DMSO إلى ملائمة لطف أسماك الكارب ونتائج الدراسة تتفق مع ما توصل إليه (18) .

جدول 6 : تأثير المخففات وموانع التجميد في حجم النطف المرصوصة لأسماء 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 معنويًا 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 و 5.25 و 4.77 و 4.35 و  $3.58 \times 10^9$  نطفة /ملم من المنى) لأشهر الدراسة من السادس الى العاشر على التوالي ، في حين كانت أدنى الإعداد عند استعمال المخفف 4 الوسط غير المحرك وكانت الإعداد (4.66 و 4.47 و 4.45 و 4.04 و  $3.61 \times 10^9$  /ملم من المنى) ، وان السبب قد يكون في تفوق ASP هو في محاكاته الى السائل المنوي لاحتوائه على مكونات تثبط الحركة وتحدث محلول دارى يحافظ على النطف من صدمة التخفيف والتجميد والصدمة الازمولية والتي تسبب تناقص إعداد النطف بعد التجميد مباشرة (9) .

كان لموانع التجميد المدروسة تأثيرا عالي المعنوية ( $P<0.01$ ) على إعداد النطف وقد حقق DMSO أعلى تلك الإعداد (5.38 و 5.21 و 4.92 و 4.60 و  $4.08 \times 10^9$  /ملم من المنى) بينما كانت ادنى 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  $\times 10^9$  /ملم<sup>3</sup> من المنى 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. (\*\*  $P<0.01$ ) .

## المصادر

- 1- الرديني , محسن جواد كاظم ،(2002). حفظ المنى لأسماك الكارب العادي (*Cyprinus carpio*) بطريقة التجميد العميق رسالة ماجستير. كلية الزراعة ,جامعة الانبار , ص 67 .
- 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 obi., 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 salar*): 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- Herraes, 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 cryoprotectant 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 motility of fresh and demembrated 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. Frietas, T,F and, Oliveira ,A.V.(2006). Extender and cryoprotectant for cooling and freezing 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 . Maise 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 larval 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 dimethyl sulfoxide on osmotic pressure and survival rate of the sperm of several fresh water species. Acta. Hydrobiol. Sci. 18(4): 297-302.